

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Regulação dos genes *groES* e *groEL*
em *Caulobacter crescentus*

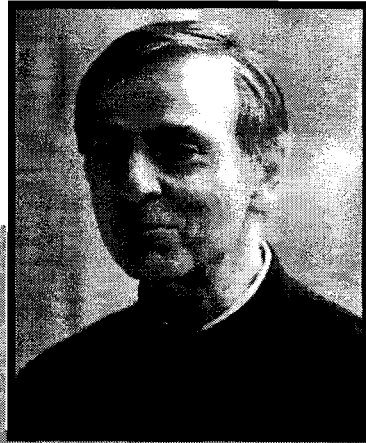
Marcelo Avedissian

Orientadora: Profa. Dra. Suely Lopes Gomes

Tese de Doutorado apresentada
ao Departamento de Bioquímica,
Instituto de Química, Universidade
de São Paulo.

SÃO PAULO
1996

Ao meu Pai (*in memoriam*), minha Mãe e meu irmão, Arthur, pelos valores, apoio e mostrarem que sempre há mais a aprender.



*“A ausência da
evidência não significa
evidência da ausência.”*

CARL SAGAN
Astrônomo americano

AGRADECIMENTOS

À Professora Suely Lopes Gomes, pela oportunidade e confiança creditadas e, principalmente, pela orientação saudável e intensa dedicação na condução e execução deste trabalho.

Ao Professor José Carlos da Costa Maia (*in memoriam*), pelo constante interesse e, talvez mesmo sem perceber, ensinar muito o que é ciência.

À Marilis V. Marques, pela constante colaboração, idéias, pequena e grandes discussões mas acima de tudo pela amizade.

À Regina L. Baldini, pela super-ajuda “sítio-dirigida” na fase final deste trabalho e também pelo interesse em se “estressar” (só um pouco) com *groE* e *Caulobacter*. Sucesso !

À Débora Colombi, pela amizade, ajuda em muitos experimentos e divertida convivência na bancada, apesar de são-paulina !

À Adriana, Ana Cláudia, Cíntia, Flávio, Julio, Rosane, e mais recentemente, Luciano, Lucivanda e Vitor, pela amizade, pelo clima agradável essencial para se realizar um bom trabalho e também pelos momentos nem sempre muito “científicos”.

À professora Aline Maria da Silva e todos em seu laboratório, pela diponibilidade do espaço e aparelhos na hora do socorro e, é claro, pela s festinhas.

À Marli, Sr. José Lino, Denis, Mario e Camilo, pela amizade e grande ajuda na parte técnica.

Aos Professores do departamento de bioquímica e todos os colegas, pela utilização dos equipamentos e ajuda nas mais diversas situações.

Às agências financiadoras CNPq, FAPESP e FINEP pelo suporte financeiro.

ÍNDICE

Abreviaturas.....	i
Resumo.....	iii
Abstrat.....	iv
I - Introdução	1
1 - O ciclo celular de <i>Caulobacter crescentus</i>	1
2 - Choque térmico e o papel das chaperoninas.....	3
3 - Regulação da expressão dos genes de choque térmico	6
4 - Objetivos	9
II - Materiais e Métodos	10
1 - Reagentes	10
1.1 - Enzimas.....	10
1.2 - Material radioativo.....	10
1.3 - Oligonucleotídeos sintéticos.....	10
2 - Linhagens e vetores	11
2.1 - Linhagens	11
2.2 - Vetores	11
2.3 - Meios de cultura para crescimento e manutenção de culturas em estoque.....	11
2.4 - Tampões e soluções.....	12
3 - Preparação de DNA	12
3.1 - Preparação de DNA genômico de <i>Caulobacter</i>	12
3.2 - Isolamento de plasmídeo em pequena escala.....	13
3.3 - Isolamento de plasmídeo em grande escala	14
3.4 - Isolamento de DNA simples fita de fago M13	14
3.5 - Preparação em grande escala do DNA da forma replicativa dos clones recombinantes de M13.....	14
4 - Extração de RNA	16
5 - Eletroforese em gel de agarose.....	16
5.1 - Gel de DNA.....	16
5.2 - Gel de RNA.....	17
6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida.....	17
6.1 - Gel de DNA.....	17
6.2 - Gel de poliacrilamida-uréia para sequenciamento.....	17
6.3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS.....	17
7 - Isolamento de fragmentos de DNA por eletroeluição	18
8 - Marcação de sonda de DNA com [α - ³² P] dATP.....	18
9 - Transferência de DNA para filtro de náilon e hibridação com sonda marcada (“Southern blot”).....	19
9.1 - Transferência.....	19
9.2 - Hibridação.....	19
10 - Transferência de RNA para filtro de náilon e hibridação com sonda marcada (“Northern Blot”).....	19

10.1 - Transferência	19
10.2 - Hibridação.....	20
11 - Ligação de inserto a vetores de clonagem e de sequenciamento	20
11.1 - Ligação.....	20
11.2 - Desfosforilação.....	20
12 - Método de obtenção de subclones deletados.....	20
13 - Preparação de células competentes e experimento de transformação.....	21
13.1) Preparação de células competentes.....	21
13.1.1) Procedimento descrito por Hanahan	21
13.1.2) Procedimento usando CaCl ₂	22
13.2) Experimento de transformação	22
14 - Crescimento e transfecção de <i>E. coli</i> JM 101 e TG-1	22
15 - Análise do DNA simples fita recombinante em gel de agarose.....	23
16 - Sequenciamento do DNA.....	23
16.1 - Klenow	23
16.2 - Sequenase	24
17 - Ensaio de atividade do promotor utilizando-se o gene repórter de transcrição de β -galactosidase.....	24
17.1 - Construção do vetor para o ensaio.....	24
17.2 - Conjugação de <i>Caulobacter</i>	25
17.3 - Ensaio com β -galactosidase	25
18 - Sincronização de células de <i>Caulobacter crescentus</i>	26
19 - Marcação de proteínas <i>in vivo</i> com pulsos de [³⁵ S]- metionina.....	26
20 - Ensaio de Imunoprecipitação	26
21 - Ensaio para determinação de início de transcrição.....	27
22 - Reação de polimerização em cadeia (PCR).....	28
23 - Isolamento de proteínas e transferência para membrana de nitrocelulose ("Western Blot").....	28
24 - Transformação por eletroporação e isolamento de clones por recombinação homóloga.....	29
25 - Preparação de mutações sítio-dirigidas.....	30
25.1 - Preparação do fago M13.....	30
25.2 - Incorporação de uridina	31
25.3 - Reação de mutagênese.....	31
III - Resultados	33
1 - Isolamento e caracterização do operon <i>groESL</i> de <i>Caulobacter</i>	33
1.1 - Construção e análise do banco genômico parcial	33
1.2 - Isolamento da extremidade 3' de <i>groEL</i> por recombinação homóloga....	35
1.3 - Sequenciamento do operon <i>groESL</i>	35
2 - Análise do padrão de expressão de <i>groES</i> e <i>groEL</i> através de "Northern blot"	40
3 - Análise do acúmulo de GroEL através de "Western blot"	43
4 - Determinação dos inícios de transcrição do operon <i>groESL</i>	47
5 - Estudo da região promotora do operon <i>groESL</i>	47

5.1 - Construção de fusões de transcrição e ensaios de atividade do promotor.....	47
5.2 - Controle temporal da expressão de GroESL.....	52
6 - Análise dos níveis de transcrição de <i>groESL</i> nas cepas NA1000 selvagem e LS2293 (<i>hrcA</i>).....	56
7 - Transitoriedade da resposta ao choque térmico.....	56
IV - Discussão.....	60
V - Conclusões e Perspectivas	67
VI - Bibliografia	69
<i>Curriculum vitae</i>.....	77

ABREVIATURAS

ATP:	Adenosina trifosfato
ATPase:	Adenosina trifosfatase
BCIP:	5'- Bromo, 4'- Cloro, 3'- indolil fosfato
BSA:	Albumina acetilada de soro bovino
cAMP:	Adenosina monofosfato cíclico
cpm:	Contagens por minuto
dATP, dCTP, dGTP e dTTP:	2'-desoxirribonucleotídeo-5'-trifosfato de adenosina, citidina, guanidina e timidina, respectivamente.
DEPC:	Dietilpirocarbonato
DNA:	Ácido desoxiribonucléico
DO:	Densidade óptica
DTT:	Ditiotreitol
EDTA:	Ácido etilenodiaminotetracético
g:	aceleração da gravidade
IPTG:	Isopropil β -D-galactopiranosídeo
kb:	Quilobases
kDa:	Quilodáltons
min:	minutos
ml:	mililitro
MOPS:	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
mRNA:	Ácido ribonucléico mensageiro
NBT:	Nitro-azul de tetrazólio
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
pb:	Pares de bases
PCR:	Reação de polimerase em cadeia
PEG	Polietilenoglicol
pfu:	Unidades formadoras de placas
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
RNA:	Ácido ribonucléico
RNase:	Ribonuclease
RNasin:	Inibidor de RNase
rpm:	Rotações por minuto
SDS:	Dodecil sulfato de sódio

TAE:	Tris Acetato EDTA
TBE:	Tris Borato EDTA
TCA:	Ácido tricloro acético
TEMED:	N,N,N',N' Tetrametiletilenodiamina
Tris:	Tris-(hidroxometil)-aminometano
v:	Volume
x:	Veze concentrado
X-gal:	5-bromo 4-cloro 3-indolil β -D-galactosídeo

RESUMO

Os genes de choque térmico *groES* e *groEL* de *Caulobacter crescentus* foram isolados utilizando-se os genes homólogos de *E.coli* como sonda e por sequenciamento demonstrou-se que estes genes estão organizados na forma de um operon em um fragmento de DNA de aproximadamente 2,5 kb, contendo também sua região regulatória.

"Northern blots" de RNA total de células crescidas a 30°C ou submetidas a choque térmico mostraram a presença de um único RNA de tamanho aproximado de 2,3kb, altamente induzido por choque térmico, permanecendo em altos níveis mesmo após longos períodos de choque térmico. Amostras de RNA total de células sincronizadas, de diferentes estágios do ciclo celular de *Caulobacter*, foram também analisadas mostrando que os níveis do mRNA *groESL* variam durante o ciclo, apresentando um máximo na célula prédivisória.

Análises através de "Western blot" mostraram uma pequena variação nos níveis da proteína GroEL ao longo do ciclo celular, sendo os tempos 60 e 120 minutos, respectivamente, os pontos de mínimo e máximo acúmulo da proteína concordando com os resultados obtidos em "Northern blots". O mesmo tipo de análise foi feito com extratos totais obtidos a partir uma população mista de células crescidas a 30°C e submetidas a choque térmico, observando-se o acúmulo da proteína até 60 minutos depois do choque térmico, com aumento da ordem de 5 vezes nos níveis de GroEL, níveis estes que diminuem lentamente a partir deste ponto.

Os inícios de transcrição foram determinados em experimentos de "primer extension" utilizando-se RNA total de células incubadas 30°C e de células submetidas a diferentes condições de choque térmico. Dois possíveis sítios de início de transcrição foram determinados nas posições -119 e -88 do ATG da metionina iniciadora de *groES*, sendo as regiões -10 e -35 dos promotores correspondentes (P1 e P2) identificadas. Somente a transcrição iniciando a partir de P2, que apresenta características de um promotor transcrito pelo σ^{32} , aumenta durante o choque térmico.

Fusões de transcrição com o vetor repórter *placZ/290* e a região 5' regulatória do operon *groESL* foram construídas para identificar as sequências responsáveis pelo controle por choque térmico e pelo controle temporal. Fusões de transcrição contendo deleções na região 5' do operon mostraram que sequências a montante do promotor P2 não são necessárias para a indução por choque térmico ou para o controle temporal. Fusões de transcrição contendo mutações sítio-dirigidas na repetição invertida, encontrada a 3' do promotor P2, antes do gene *groES*, revelaram que este elemento, conhecido como CIRCE, regula negativamente a expressão de *groESL* a 30°C e mutações neste elemento levam à perda do controle temporal deste operon.

ABSTRACT

The heat shock genes *groES* and *groEL* of *Caulobacter crescentus* were isolated using the homologous genes of *E.coli* as a probe. DNA sequence analysis has shown that these genes are organized as an operon in a fragment of about 2.5kb, which includes the 5' regulatory region.

Northern blot analysis of total RNA from cells grown at 30°C or heat shocked treated has shown the presence of a single mRNA species for *groESL*, of approximately 2.3kb in size, which presented increased levels even after long periods of heat shock. Samples of total RNA from synchronized cells, corresponding to different stages of the *Caulobacter* cell cycle, were also analysed, showing that the amount of *groESL* mRNA varies during the cycle, with maximum levels in predivisional cells.

Western blot analysis of GroEL levels in *Caulobacter* has shown that the amount of the protein decreases during the first 60 minutes of *C.crescentus* cell cycle and then starts to increase again. These results corroborate the data obtained with Northern blot analysis. A similar experiment was performed after exposing a mixed population of *C.crescentus* cells to different times of heat shock at 40°C. Western blot of extracts of these cells showed a fivefold increase in the levels of GroEL after 60 minutes of heat shock, which then begins to decrease.

Primer extension experiments were performed using total RNA from cells incubated at normal growth temperature or after heat shock treatment. Two possible transcription start sites were determined at positions -119 and -88 from the ATG of the *groES* initiator methionine and the -10 and -35 regions of the corresponding promoters (P1 and P2) were identified. Only transcription initiating from the P2 promoter, which has characteristics of a σ^{32} promoter, increases during heat shock.

Transcription fusions with the reporter vector *placZ/290* and the 5' regulatory region of the *groESL* operon were constructed in order to identify the sequences responsible for heat shock and cell cycle control. Deletion analysis in the 5' region of the operon showed that no sequences upstream of the P2 promoter are necessary for heat shock induction or for temporal control. Site-directed mutagenesis in the inverted repeat found 3' of the P2 promoter, in front of the *groES* gene, revealed that this element, also known as CIRCE, negatively regulates *groESL* expression at 30°C and mutations in it lead to loss of temporal control of this heat shock operon.

I - INTRODUÇÃO

O controle da expressão gênica representa um dos pontos centrais para a compreensão dos mecanismos de diferenciação celular. Em geral todos os organismos apresentam alterações nos padrões de expressão gênica como resultado de estímulos externos ou programas de desenvolvimento, como diferenciação e divisão celular.

Em microrganismos, certas modificações nas condições do meio ambiente como disponibilidade de nutrientes, temperatura, condições osmóticas entre outros, são capazes de desencadear grandes modificações nos padrões de síntese protéica levando a alterações fisiológicas e metabólicas da célula. O ciclo de vida de diversos microrganismos pode ser utilizado para o estudo dos mecanismos de diferenciação celular. A esporulação em *Bacillus subtilis* ou a formação de agregados multicelulares em resposta à carência nutricional em *Dictyostelium discoideum* são dois exemplos bastante estudados. A divisão celular assimétrica em *Caulobacter crescentus* também apresenta-se como um fenômeno apropriado aos estudos de diferenciação celular e regulação da expressão gênica.

1 - O ciclo celular de *Caulobacter crescentus*.

A bactéria gram-negativa *Caulobacter crescentus* apresenta um ciclo de vida bastante interessante, dando origem por divisão celular, a duas células-filhas distintas tanto morfológica quanto bioquimicamente (fig.1). A célula talo e a célula móvel, formadas após a divisão celular, apresentam programas genéticos diferentes, sendo que determinados processos, como a formação do flagelo e da maquinaria quimiotática, são regulados de forma temporal e espacial ao longo do ciclo de vida da bactéria. *Caulobacter crescentus* é de fácil manipulação, tanto bioquímica como geneticamente, e populações homogêneas de células talo ou móveis podem ser facilmente obtidas, podendo, em meio adequado, prosseguir no ciclo celular de forma sincrônica. A regulação da diferenciação celular e os mecanismos envolvidos no controle do ciclo celular de *Caulobacter* foram recentemente revistos (Brun *et al.*, 1994; Gober e Marques, 1995).

A célula móvel é quimiotaticamente competente, possui um único flagelo polar e é incapaz de replicar seu DNA até diferenciar-se em célula talo. A transição de célula móvel para célula talo envolve a perda do flagelo para o meio, perda dos pili (estruturas envolvidas na infecção por certos vírus) e a formação do talo, que é um prolongamento da membrana e parede celular, no mesmo polo da célula previamente

ocupado pelo flagelo. Nesta nova célula talo ocorrem também mudanças na estrutura do cromossomo e o início da replicação do DNA. A célula talo cresce até tornar-se uma célula prédivisional, sendo um novo flagelo montado no polo da célula oposto ao talo, ocorrendo a seguir a divisão celular. A célula móvel recém-formada passa por um período silencioso para a replicação do DNA até diferenciar-se novamente em célula talo. A célula talo por sua vez é capaz de iniciar a replicação do seu cromossomo logo após a divisão celular. Diversos mecanismos identificados até o momento são responsáveis pela assimetria expressa na célula prédivisional tais como: controle da replicação do DNA, regulação da transcrição de genes durante o ciclo celular, bem como expressão e localização de proteínas específicas.

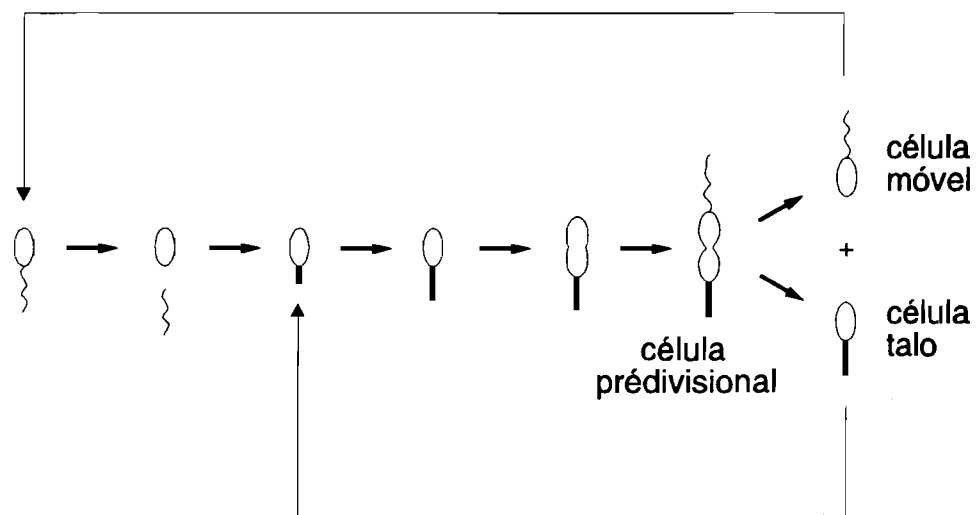


Figura 1 - Diagrama representando o ciclo celular de *Caulobacter crescentus*.

A formação e a montagem do flagelo estão entre os processos mais bem estudados durante o ciclo celular de *Caulobacter*. A expressão dos genes envolvidos neste processo ocorre de forma ordenada e hierárquica, em uma cascata regulatória onde os produtos de genes no topo da hierarquia são necessários à expressão de genes subsequentes (Brun *et al.*, 1994; Gober e Marques, 1995). Recentemente um gene,

denominado *ctrA* (cell cycle transcriptional regulator), foi isolado e caracterizado (Quon *et al.*, 1996). A proteína CtrA codificada por este gene faz parte de um grupo de proteínas regulatórias sensíveis à sinais internos e externos envolvidos no controle do ciclo celular. A própria regulação da expressão deste gene durante o ciclo de *Caulobacter* bem como a fosforilação da proteína por ele codificada parecem constituir os mecanismos pelos quais CtrA atuaria na transcrição de promotores específicos, controlando a expressão dos genes necessários nos estágios iniciais da biogênese do flagelo sendo portanto um gene de classe I na hierarquia. Os genes expressos a seguir na biogênese do flagelo, denominados genes de classe II, codificam as proteínas correspondentes às estruturas basais do flagelo, proteínas envolvidas na montagem do flagelo e também fatores de transcrição. As regiões promotoras de diferentes genes de classe II possuem sequências comuns (Stephens e Shapiro, 1993) sugerindo a existência de um fator específico, como CtrA, responsável pelo início da cascata regulatória (Quon *et al.*, 1996). Experimentos que bloqueiam a replicação do cromossomo levam à inibição da transcrição desses genes. A expressão dos genes de classe II é absolutamente necessária para a expressão dos genes flagelares de classe III e classe IV, expressos mais tardiamente durante o ciclo celular. Da mesma forma, mutações que impedem a expressão de genes de classe III bloqueiam a transcrição dos genes de classe IV. Os genes pertencentes a estas classes codificam as demais proteínas estruturais componentes do corpo basal e gancho, e as flagelinas que compõem o filamento, respectivamente. Os promotores dos genes de classe III e IV têm organização estrutural semelhante e necessitam do fator σ^{54} , codificado pelo gene *rpoN* (gene de classe II), para sua transcrição. Os diferentes elementos regulatórios encontrados nos promotores dos genes dessas duas classes parecem ser os responsáveis pelo controle temporal de sua expressão. Regulação do tipo negativa, impedindo a expressão de proteínas não mais necessárias, também parece fazer parte do controle deste processo (Xu *et al.*, 1989; Wingrove e Gober, 1994; Benson *et al.*, 1994).

2 - Choque térmico e o papel das chaperoninas.

A resposta de uma célula ao choque térmico, entendido como um aumento rápido da temperatura do meio externo, está entre os sistemas genéticos mais conservados ao longo da escala evolutiva (Lindquist e Craig, 1988). Todos os organismos, de bactérias até células de mamíferos, respondem ao estresse de temperatura sintetizando um grupo específico de proteínas conhecidas como proteínas de choque térmico (Hsps). Assim como a natureza da resposta, as proteínas de choque térmico apresentam alto grau de conservação em termos evolutivos, sugerindo uma

função comum para estas proteínas em todos os organismos. A rapidez e transitoriedade da resposta ao choque térmico está associada ao seu papel de proteção da célula frente ao estresse.

Duas famílias de proteínas de choque térmico são mais estudadas e têm suas funções melhor compreendidas: a família das HSP 60 e das HSP 70. As HSP 60 correspondem à GroEL, presente nos procariotos, e as proteínas homólogas Hsp60 encontradas no citosol, mitocôndrias e cloroplastos de células eucarióticas. A família das HSP 70 inclui a DnaK de procariotos e as Hsp70 nas formas citosólica, mitocondrial e do retículo endoplasmático. A função dessa classe de proteínas envolve basicamente a montagem e enovelamento de polipeptídeos na célula. Muitas proteínas de choque térmico são também sintetizadas a temperaturas normais de crescimento da célula. O papel dessas proteínas de choque térmico na fisiologia normal da célula vem sendo diretamente relacionado à formação de proteínas, desde sua síntese como cadeias polipeptídicas, até sua montagem final e aquisição da conformação ativa (Craig *et al.*, 1993). Algumas dessas proteínas, como GroEL e DnaK, e seus correspondentes em eucariotos, HSP60 e HSP70, respectivamente, foram denominadas chaperoninas por participarem na montagem e manutenção da estrutura final de polipeptídeos recém-sintetizados na célula (Van Dyk *et al.*, 1989 & Kawasaki *et al.*, 1990), assim como em mecanismos de transporte e exportação de proteínas (Phillips *et al.*, 1990). Trabalhos realizados com superexpressão de *groEL* descrevem a supressão de mutações termossensíveis como no caso da proteína DnaA (Fayet *et al.*, 1986 & Jenkins *et al.*, 1986) e também sua cooperação na produção de proteínas heterólogas em *E.coli* modificando a solubilidade e acúmulo da proteína expressa (Bochkareva *et al.*, 1992).

O gene *groEL* de *E.coli* forma um operon com outro gene de choque térmico, *groES*, sendo denominados de genes *groE* (Hemmingsen *et al.*, 1988). Os genes *groE* de *E.coli* foram inicialmente identificados através da supressão de mutações que impediam a replicação do bacteriófago λ (Georgopoulos *et al.*, 1973) ou T4 (Georgopoulos *et al.*, 1972 e Coppo *et al.*, 1973) na célula hospedeira. A análise de diferentes mutantes que impediam o crescimento de bacteriófagos mostraram que os produtos dos genes *groE* estavam envolvidos em estágios específicos da montagem da partícula viral (Hocking e Egan, 1982; Zweig e Cummings, 1991). A partir de então GroES e GroEL vêm sendo identificadas em todos os modelos estudados, mostrando serem essenciais e possuir um alto grau de conservação na escala evolutiva, revelando sua importância para a vida normal da célula.

Os genes *groEL* e *groES* já foram isolados em diversos organismos procariotos, bem como seus homólogos, *hsp60* e *cpn10*, de mitocôndrias e cloroplastos nos eucariotos, permitindo o estudo de sua regulação e também da função da proteína. Em *E.coli* os genes *groES* e *groEL* encontram-se organizados na forma de um operon, sendo *groES* o primeiro gene. GroES e GroEL apresentam, em geral, aproximadamente 97 e 545 resíduos de aminoácidos, com peso molecular calculado da ordem de 10 kDa e 58 kDa, respectivamente. Em eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS, os monômeros de GroES e GroEL migram como polipeptídeos de 15 kDa e 65 kDa. GroEL nativa possui 14 subunidades iguais organizadas em dois anéis sobrepostos de 7 subunidades cada (Hendrix 1979 e Hohn *et al.*, 1979). GroEL possui uma fraca atividade de ATPase (Chandrasekhar *et al.*, 1986) e requer o íon potássio para sua atividade de enovelamento do substrato (Viitanen *et al.*, 1990).

O mecanismo de ação de GroEL vem sendo bastante estudado, tendo sido proposto um modelo segundo o qual o enovelamento de proteínas ocorreria através de sucessivos passos de ligação de GroEL com o substrato (Martin *et al.*, 1991). Esse processo envolveria o consumo de ATP, que seria hidrolisado fornecendo a energia necessária para o desligamento de GroEL da proteína substrato. Em presença de Mg-ATP ou Mg-ADP GroEL e GroES podem formar complexos. GroES funciona como co-chaperonina, formando um anel de 7 subunidades idênticas e regulando a atividade de ATPase de GroEL. Na ausência de substrato GroES inibe a atividade de ATPase de GroEL (Chandrasekhar *et al.*, 1986; Viitanen *et al.*, 1990; Martin *et al.*, 1991). O papel de GroES parece ser o acoplamento da atividade de ATPase de GroEL com o enovelamento correto do substrato, uma vez que GroEL isoladamente é capaz de liberar o polipeptídeo hidrolisando ATP (Laminet *et al.*, 1990, Viitanen *et al.*, 1991) mas sem produzir a montagem correta do substrato (Martin *et al.*, 1991; Mendoza *et al.*, 1991; Zhi *et al.*, 1992).

A participação de outras proteínas como DnaK (análoga a HSP70 de eucariotos), DnaJ e GrpE em sequência com GroEL na montagem de polipeptídeos está sendo investigada. DnaK também possui atividade de ATPase que, em alguns casos, é estimulada pela ligação ao polipeptídeo (Flynn *et al.*, 1989). Tanto DnaK como DnaJ podem ligar-se a polipeptídeos nascentes com diferentes afinidades sendo que DnaJ também modula a atividade de ATPase de DnaK. Em conjunto, DnaK/DnaJ podem atuar prevenindo a formação de agregados ou conformações incorretas de proteínas permitindo também a translocação das mesmas por membranas (Craig *et al.*, 1994). A função de GrpE isoladamente não é clara mas sua função está relacionada à liberação do polipeptídeo ligado (Georgopoulos 1992). Em eucariotos, a Hsp70 é

necessária para a translocação de proteínas para mitocôndrias e retículo endoplasmático. Em *Saccaromyces cerevisiae* já foi demonstrada a importância da Hsp70 nesses processos através de mutantes que mostraram acúmulo do precursor mitocondrial da subunidade β da F1-ATPase não importado (Deshaies *et al.*, 1988). O papel das chaperoninas durante o choque térmico está relacionado à sua capacidade de interação com polipeptídeos desnaturados que seriam acumulados durante o estresse bem como com a regulação da resposta ao choque térmico, como veremos a seguir.

3 - Regulação da expressão dos genes de choque térmico.

A indução das proteínas de choque térmico ocorre principalmente ao nível da transcrição, através de fatores específicos como o fator σ^{32} de *E.coli* e o fator de transcrição HSF (“heat shock factor”) de eucariotos. O HSF é expresso constitutivamente nas células eucarióticas sob temperaturas normais de crescimento e adquirem a capacidade de reconhecer e se ligar a sequências específicas nos promotores dos genes de choque térmico denominadas HSE (“heat shock element”) após o aumento de temperatura. Estes elementos consistem de repetições da sequência de nucleotídeos NGAAN arranjadas de forma de repetições invertidas ou não, na região 5’ regulatória dos genes de choque térmico. Em levedura, o HSF está constitutivamente ligado ao DNA e a ativação parece ocorrer por fosforilação do fator (Sorger e Pelham, 1988). Nas células de mamíferos a ativação do HSF durante o choque térmico, requer uma mudança conformacional induzida pelo calor, permitindo a formação de trímeros capazes de ligarem-se ao HSE (Rabindran *et al.*, 1993; Sarge *et al.*, 1993). A fosforilação também parece ter papel importante no processo de ativação do HSF modificando sua afinidade pelo HSE (Mivechi *et al.*, 1994) e capacidade de ativar a transcrição (Larson *et al.*, 1988; Sanger *et al.*, 1993).

A transcrição em procaríotos requer a presença de uma classe de proteínas específicas, os fatores σ , que se ligam reversivelmente à RNA polimerase (revisado por Helmann e Chamberlin, 1988), conferindo especificidade no reconhecimento da região promotora. A RNA polimerase é formada por 4 subunidades: $\alpha_2\beta\beta'$. Essas subunidades interagem com o fator σ formando a holoenzima, capaz de reconhecer o promotor do gene e iniciar a transcrição. Após a iniciação da transcrição o fator σ é liberado e a cadeia de RNA é sintetizada (Travers e Burges, 1969). O término da transcrição ocorre pela interação da RNA polimerase com estruturas terminadoras de RNA ou fatores de terminação específicos (von Hippel *et al.*, 1984). Diferentes fatores σ estudados mostraram, após alinhamento e comparação das sequências de aminoácidos, conservação estrutural da proteína dividida em 4 domínios, sugerindo um

papel comum para os diferentes fatores. Estudos posteriores indicaram que dois destes domínios da proteína devem fazer contato direto com sequências específicas nos promotores localizadas a -10 e -35 nucleotídeos do início de transcrição. Desta forma diferentes fatores σ são capazes de reconhecer diferentes regiões -10 e -35, possibilitando a transcrição a partir de promotores específicos. A maior parte dos genes em bactérias são transcritos por um fator σ principal como o σ^{70} em *E.coli* (Hawley e McClure, 1983) e o σ^{43} em *Bacillus subtilis* (Graves e Rabinowitz, 1986). Fatores σ alternativos encontrados em diferentes espécies de bactérias regulam a expressão de conjuntos de genes ligados a processos ou atividades específicas na célula.

A identificação do produto do gene *rpoH*, que codifica o σ^{32} , fator responsável pela transcrição dos genes de choque térmico em *E.coli*, serviu de base para os estudos da função e regulação da resposta ao choque térmico em bactérias. Em *E.coli* a maioria dos promotores são reconhecidos pelo σ^{70} , enquanto os promotores dos genes de choque térmico são reconhecidos pelo σ^{32} (Grossman *et al.*, 1984 & Landick *et al.*, 1984) em resposta ao aumento de temperatura. O controle da resposta ao choque térmico porém não envolve somente o reconhecimento de promotores específicos pelo σ^{32} mas também um controle da expressão do próprio fator σ^{32} (Erickson *et al.*, 1987) bem como de proteínas de choque térmico. Existem tres pontos principais de controle dos níveis de σ^{32} : regulação da tradução, regulação da estabilidade e da atividade do fator. O aumento nos níveis de σ^{32} durante o choque térmico é resultado tanto do aumento de sua síntese como aumento da sua estabilidade (Yura *et al.*, 1993). Sob temperaturas normais de crescimento os níveis do σ^{32} são mantidos baixos devido, principalmente, à curta meia-vida do fator, aproximadamente 1 minuto, enquanto que durante o choque térmico o σ^{32} é estabilizado durante os 4 ou 5 minutos iniciais, permitindo seu rápido acúmulo. Estudos subsequentes mostraram que também ocorre aumento da sua tradução, devido a um aumento da estabilidade do mRNA do σ^{32} . O aumento da tradução representa o principal mecanismo pelo qual os níveis do σ^{32} são inicialmente aumentados (Yura *et al.*, 1993). O aumento nos níveis e na atividade do σ^{32} são responsáveis pela rápida indução das proteínas de choque térmico.

Algumas proteínas de choque térmico como DnaK, DnaJ e GrpE parecem atuar em conjunto como moduladores negativos da resposta de choque térmico. Cepas mutantes de *E.coli* deficientes em DnaK, DnaJ ou GrpE são incapazes de degradar σ^{32} e apresentam uma superexpressão das proteínas de choque térmico sob temperaturas normais de crescimento (Tilly e Yarmolinsky, 1989; Strauss *et al.*, 1990). Os estudos envolvendo estes mutantes também mostraram que a síntese do σ^{32} permanece elevada por um período mais longo durante o choque térmico em comparação com

células selvagens. Sob temperaturas normais DnaK parece estar complexada com o σ^{32} diminuindo sua estabilidade e também impedindo sua ligação à RNA polimerase. DnaK, DnaJ e GrpE podem ligar-se a proteínas parcialmente denaturadas por efeito do choque térmico que competem com o σ^{32} . Após o aumento de temperatura e acúmulo das proteínas de choque térmico, ocorre um período de atenuação da resposta onde DnaK volta a se ligar ao σ^{32} diminuindo a transcrição dos genes ativados a níveis basais. Desta forma essas proteínas exerceriam um papel de autoregulação negativa, impedindo a síntese e desestabilizando o σ^{32} , caracterizando o padrão transitório da resposta ao choque térmico.

O controle da resposta ao choque térmico pelo σ^{32} não é o único mecanismo de regulação gênica frente a este tipo de estresse. A presença de uma repetição invertida de 9 pares de bases a 3' do início de transcrição de vários genes de choque térmico, tem importante papel regulatório. A sequência de bases da repetição invertida é praticamente idêntica em diversos promotores de genes *groE* estudados como em cianobactéria, micobactéria e bactérias gram-negativas como *Agrobacterium tumefaciens* (Segal e Ron, 1993) e gram-positivas, *Bacillus subtilis* (Zuber e Schumann, 1994) e *Clostridium acetobutylicum* (Narberhaus e Bahl, 1992). Esta sequência também foi identificada no operon *dnaKJ* de *B.subtilis* (Wetzstein *et al.*, 1992) e no gene *dnaJ* de *Lactococcus lactis*, sugerindo uma função regulatória alternativa na expressão de genes de choque térmico. O promotor do operon *groESL* de *B.subtilis* é regulado por um fator σ^{43} responsável pela transcrição a temperaturas normais e de choque térmico, não possuindo sequências reguladas por σ^{32} . Estudos envolvendo mutações neste elemento, denominado CIRCE (Controlling Inverted Repeat of Chaperonin Expression) (Zuber e Schumann, 1994), mostraram que este elemento tem um papel de regulação negativa na expressão do operon *groESL* em *B.subtilis*.

A resposta ao choque térmico em *Caulobacter crescentus* ainda é pouco estudada, tendo sido caracterizadas inicialmente cerca de 20 Hsps por eletroforese em géis bidimensionais. Duas das principais proteínas de choque térmico, GroEL e DnaK, mostraram, além da indução por temperatura, serem sintetizadas a temperatura normal com expressão diferencial durante o ciclo celular. GroEL apresenta síntese máxima nas células do tipo pré-divisional, enquanto DnaK, na célula móvel (Gomes *et al.*, 1986). O gene *dnaK* de *Caulobacter* foi clonado (Gomes *et al.*, 1990), utilizando-se o gene *hsp70* de *Drosophila* (Bardwell *et al.*, 1984) como sonda, tendo sido a seguir sequenciado e seu promotor analisado (Gomes *et al.*, 1990; Avedissian *et al.*, 1995). *Caulobacter* possui uma única cópia do gene *dnaK* formando um operon com o gene *dnaJ*. A análise da estrutura do promotor do operon *dnaKJ* mostrou que a dupla

regulação observada na expressão deve-se à presença de dois promotores. Um promotor apresenta sequências regulatórias -10 e -35 que seguem o consenso de transcrição pelo fator σ^{32} de *E.coli* enquanto o outro, o consenso de transcrição pelo fator σ^{70} de *Caulobacter* (Malakooti *et al.*, 1995) O primeiro responde pela expressão durante o choque térmico ao passo que o segundo é responsável pela regulação temporal durante o ciclo celular da bactéria (Avedissian *et al.*, 1995).

4 - Objetivos.

Este projeto teve por objetivo o isolamento do operon *groESL* de *Caulobacter crescentus*, permitindo o seu sequenciamento e estudo da sua região promotora. A análise da região regulatória incluiu a determinação de inícios de transcrição bem como a análise das prováveis sequências responsáveis pelo controle durante o ciclo celular e pela indução frente ao choque térmico. O padrão de transcrição do RNA mensageiro de *groESL* bem como o de síntese da proteína GroEL também foram investigados. Os resultados obtidos desses estudos contribuem para a melhor compreensão do controle da expressão de GroES e GroEL em *Caulobacter*.

A análise comparativa do padrão de expressão e regulação de *groESL* com as sequências regulatórias do operon *dnaKJ* torna-se bastante interessante dada a expressão diferenciada destes operons durante o ciclo celular de *Caulobacter*.

II - MATERIAIS E MÉTODOS

1 - Reagentes.

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

1.1 - Enzimas.

As enzimas de restrição e demais enzimas utilizadas foram obtidas da Biolabs, Boehringer Mannheim, Gibco-BRL, Pharmacia ou USB. O sistema Sequenase de sequenciamento foi obtido da USB Corporation. A Taq polimerase foi obtida do Centro de Biotecnologia - CENBIOT (RS).

1.2 - Material radioativo.

Os nucleotídeos radioativos [α - 32 P]dATP (3000 Ci/mmol), [α - 32 P]dCTP (3000 Ci/mmol), [γ - 32 P]ATP (1000 Ci/mmol), [35 S]dATP α S (1000 Ci/mmol), e o aminoácido L-[35 S] Metionina (>1000 Ci/mmol) foram obtidos da Amersham.

1.3 - Oligonucleotídeos sintéticos.

Os oligonucleotídeos M1 a M4 foram sintetizados no IQUSP, o oligonucleotídeo GK5 foi sintetizado pela Genomic e os demais oligonucleotídeos foram sintetizados pela National biosciences, INC. (NBI)

M1: 5'-TCCTTCATGATCAGGAGG-3'
 M2: 5'-AGGGGACGAACTTCATG-3'
 M3: 5'-CGCCGGCCCATCATGCC-3'
 M4: 5'-CGTTGCGACTTCTGGAAC-3'
 M30: 5'-TGACCGGCGCTCAAGTCG-3'
 M40: 5'-ACGACGCCCTGAACGCGA-3'
 M45: 5'-AGCGGTTTCGGCTTCAAC-3'
 M50: 5'-GGATCGGCTGGGCCGATC-3'
 GK5: TATATGAATTCCGGTCAAGAACGAAGGC-3'
 LH3: 5'-ATATAAGCTTGCTCCATTCGAGTGCCA-3'
 DL2: 5'-TATAAGCTTCGACGCTGGTG-3'
 MUT-1: 5'-ATATAAGCTTACTGTTAAATGTCGCTC-3'
 DG52: 5'-TATGAATTCCATATGGTCCATCATC-3'
 DG53: 5'-TATGAATTTCGCGCCCGAAAAACTT-3'
 DG54: 5'-TATGAATTTCGCGCGCGTCCCTTGACT-3'
 ML3: CCAGCGTCGTTGTTTCTCGAATGGAGC

LRC GAATGGAGCGACAAATAACAGTCCCCGC
 LDR GAATGGAGCGACAACAGTCCCCGC
 MH10 CGAGGGCCGGCGGGGGACTCACCAGCG
 GP135 GAAGCGCTCCCCGCGAGCGCCCGAAAA
 GP136 GAAGCGCTCCCCGCGCCCGCGCCCGAA
 PLACZ 5'-GGCGGGGGGATGGGGAGT-3'

2 - Linhagens e vetores.

2.1 - Linhagens.

E.coli:

- TG-1: *supE*, *hsd*Δ5, *thi*Δ(*lac-proAB*)F'[*traD36*, *proAB*⁺, *lacI*^q, *lacZ*ΔM15]
 TG-2: *supE*, *hsd*Δ5, *thi*Δ(*lac-proAB*) Δ(*slr-recA*)306::Tn10(*tef*) F'[*traD36*,
proAB⁺, *lacI*^q, *lacZ*ΔM15]
 S17-1 (pRK2013-*Kan*^r): funções de transferência (*tra*⁺) presentes no
 plasmídeo (Figurski e Helinski, 1979)
 S17-1: RP4-2, Tc::Mu Km::Tn7: para mobilização de plasmídeos. (Simon *et al.*, 1983).
 CJ236: *dut*, *ung*, *thi*, *relA*; pCJ195 (*Cm*^r). (Kunkel *et al.*, 1987).

Caulobacter crescentus:

- NA1000: selvagem, sincronizável. (Evinger e Agabian, 1977)
 LS176 *bla*⁻: *Amp*^S. Alley, M.R.K. (não publicado)
 LS2293: mutante contendo o gene *hrcA* interrompido por inserção.
 (Roberts *et al.*, 1996).

2.2 - Vetores.

- | | |
|-------------------------|------------------------------------|
| Bluescribe: | Stratagene. |
| Bluescript KS e SK: | Stratagene. |
| pUC, M13mp18 e M13mp19: | Yanish-Perron <i>et al.</i> , 1985 |
| pUCBM20: | Boehringer Mannheim |
| <i>placZ/290</i> : | Gober e Shapiro, 1992 |

2.3 - Meios de cultura para crescimento e manutenção de culturas em estoque.

LB líquido: bacto-triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%, pH

7,5.

LB-ágar:LB: contendo ágar bacteriológico 1,5%.

- LBA líquido: LB contendo ampicilina 0,1mg/ml.
- LBA-ágar: LBA contendo ágar bacteriológico 1,5%.
- LB "soft agar": meio LB com ágar 0,75%
- M2: Na₂HPO₄ 18mM; KH₂PO₄ 8mM; NH₄Cl 9mM; FeSO₄ 10µM; MgSO₄ 1mM; CaCl₂ 0,5mM; glicose 0,2%
- M9: Na₂HPO₄ 6g/l; KH₂PO₄ 3g/l; NaCl 0,5g/l; NH₄Cl 1g/l; ágar bacteriológico 1,5%; esterelizado e suplementado com: MgSO₄ 2mM; CaCl₂ 0,1M; glicose 0,2%; tiamina 10ml/l)
- PYE: bacto-peptona 0,2%, extrato de levedo 0,1%, MgSO₄ 0,2 g/l, CaCl₂ 0,5mM, ágar bacteriológico 1,5% (Contreras *et al.*, 1978).
- PYE-ágar: PYE contendo ágar bacteriológico 1,5%.
- 2XTY: bacto-triptona 1,6g%, extrato de levedura 1%, NaCl 0,5%.

Culturas estoque de *E.coli* cepa TG-1 e TG-2 foram mantidas em placas de meio mínimo M9 e M9 contendo tetraciclina 12,5 µg/ml, respectivamente.

Culturas estoque de *Caulobacter* (cepa NA1000) foram mantidas em placas de meio PYE. Quando necessário foram adicionados ao meio tetraciclina e ácido nalidíxico nas concentrações de 2µg/ml e 20µg/ml, respectivamente.

2.4 - Tampões e soluções.

- TE: Tris-HCl pH 8,0 10mM; EDTA 1mM
- TAE 50x: Tris-acetato 40mM; EDTA 1mM
- TBE 10x: Tris 0,89M; ácido bórico 0,89M; EDTA pH 8,0 0,2M
- MOPS 10x: MOPS 20mM pH 7,0; acetato de sódio 5mM; EDTA 0,1mM
- SSC 20x: citrato de sódio 0,3M; NaCl 3M
- TBS: Tris-HCl pH 8,0 10mM; NaCl 150mM
- TBST TBS contendo Tween 20 0,05%
- Sol. de Desnaturação NaOH 0,5M; NaCl 1,5M
- Sol. de Neutralização Tris HCl pH 7,5 0,5M; NaCl 1,5M

3 - Preparação de DNA.

3.1 - Preparação de DNA genômico de *Caulobacter*

O isolamento do DNA de *Caulobacter* foi feito a partir de um inóculo de 100ml de PYE líquido com D.O.550 igual a 0,9. As células foram então centrifugadas a 6000 x g por 10 min., lavadas com 10ml EDTA 0,1M pH 8,0 contendo NaCl 0,1M e ressuspensas em 2ml da mesma solução. Foi adicionada lisozima a uma concentração

final de 1mg/ml e as células foram mantidas 15 min. à temperatura ambiente. A seguir foram adicionados 80µl de Sarkosyl 20% e proteinase K a uma concentração final igual a 100µg/ml incubando-se por uma hora a 37°C. Adicionou-se então 3ml de fenol (equilibrado em SSC 2x concentrado) sendo a mistura agitada e então centrifugada por 10 min. a 9700 x g. Após a centrifugação a fase aquosa foi extraída com 1ml de fenol e a fase do fenol, com 1ml de TE, centrifugando-se novamente por 10 min. a 9700 x g. As fases aquosas obtidas após a centrifugação foram reunidas e precipitadas com etanol absoluto (2x o volume) e acetato de sódio 3M (1/10 do volume), deixada a -20°C durante 15 horas. A amostra foi a seguir centrifugada por 40 min. a 9700 x g, sendo o precipitado ressuspense em 2ml de TE contendo RNase a uma concentração final de 50ug/ml. A mistura foi mantida então a 37°C por uma hora e então tratada com 3ml de fenol, agitada e centrifugada 10 min. a 9700 x g para nova precipitação com etanol absoluto e acetato de sódio, a -20°C por 15 horas e centrifugação por 40 min. a 9700 x g. O precipitado foi ressuspense em 2ml de TE passando, a seguir, por uma extração com igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1), conservando-se a fase superior, e 4 extrações com igual volume de éter. Uma nova precipitação com etanol absoluto, acetato de sódio e centrifugação foi feita para ressuspensão em um volume final de 1ml de TE. Esse volume foi dialisado contra 1l de TE com 3 trocas a cada 3 horas e o DNA estocado a -20°C.

3.2 - Isolamento de plasmídeo em pequena escala.

O método seguido foi o de lise alcalina descrito por Maniatis *et al.*, (1982). Colônias isoladas de *E.coli* foram incubadas a 37°C em meio de cultura com antibiótico até a fase estacionária. Partindo-se da cultura obtida foram centrifugados 1,5ml em minifuge por 1 min. a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células precipitadas foram ressuspensas em 100µl de uma solução a 4°C de glicose 50mM, EDTA 10mM, Tris HCl (pH 8,0) 25mM. As células foram mantidas 5 min. a temperatura ambiente adicionando-se então 200µl de uma solução de NaOH 0,2N contendo SDS 1%. A mistura foi homogeneizada por inversão dos tubos e mantida 5 min. no gelo. A seguir foram adicionados 150µl de uma solução a 4°C de acetato de potássio pH 4,5 (potássio 3M, acetato 5M). A suspensão foi agitada e incubada por mais 5 min. no gelo, e a seguir, centrifugada em minifuge por 5 min. a 4°C. O sobrenadante foi conservado, sofrendo extração com fenol/clorofórmio (1:1). O sobrenadante obtido foi submetido à precipitação com 1ml de etanol absoluto em banho etanol e gelo seco (-20°C) por 15 min. e posterior centrifugação em minifuge a 4°C por 20 min.. O precipitado obtido foi lavado com 0,5ml de etanol 70%, recentrifugado 5 min. a 4°C e seco sob vácuo, para

ser ressuspensão em 50µl de TE contendo RNase (20 µg/ml). O plasmídeo isolado foi guardado a -20°C.

3.3 - Isolamento de plasmídeo em grande escala.

Uma colônia isolada foi inoculada em 25ml de meio LB contendo antibiótico sendo a cultura incubada a 37°C até a fase estacionária. A preparação de plasmídeo foi feita seguindo-se o mesmo protocolo descrito no item anterior mantendo-se as proporções nos volumes utilizados.

3.4 - Isolamento de DNA simples fita de fago M13.

As placas de lise dos recombinantes que se apresentavam isoladas foram inoculadas encostando-se a ponta de um palito estéril, o qual foi colocado dentro de um tubo contendo 1,5ml de uma cultura de *E. coli* TG-1 em fase estacionária, diluída 50 vezes em meio 2xTY. Os tubos foram incubados a 37°C por um período de 4 a 5 horas com agitação, e a seguir as bactérias foram precipitadas por centrifugação em Minifuge por 5 min.. O sobrenadante foi transferido para novo tubo e os precipitados foram guardados a -20°C como estoques. Aos sobrenadantes foram adicionados 150µl de uma solução de PEG 20%, NaCl 1,6M a fim de precipitar os fagos, e os tubos ficaram por 15 min. a 4°C. Após centrifugação por 15 min. em Minifuge a 4°C, desprezaram-se os sobrenadantes e os precipitados foram ressuspensos em 100µl de TE, seguindo-se extrações com igual volume de fenol (equilibrado em Tris HCl 0,1M pH 8,0), fenol/clorofórmio e clorofórmio/álcool isoamílico (24/1). Os tubos foram vigorosamente agitados por 1 min. e a seguir centrifugados em minifuge por 2 min.. A fase aquosa contendo o DNA foi retirada e o DNA foi precipitado adicionando-se 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2 vezes o volume de etanol absoluto gelado. Os tubos foram deixados a -20°C por 15 horas e centrifugados por 30 min. a 4°C. O precipitado contendo o DNA foi lavado com 0,5ml de etanol 70%, recentrifugado 15 min. a 4°C, e finalmente ressuspensão em 30µl de TE. Os DNAs simples fita obtidos foram utilizados para análise por sequenciamento.

3.5 - Preparação em grande escala do DNA da forma replicativa dos clones recombinantes de M13.

Para se obter o RF dos clones recombinantes contendo os insertos de interesse foram preparadas 3 diluições do sobrenadante contendo o fago M13 de cada um: 10⁻⁶, 10⁻⁷ e 10⁻⁸ em 100µl de meio 2xTY, e adicionou-se mais 100µl de uma cultura em fase estacionária de *E. coli* JM 101 em meio 2xTY. Após incubação por 15

min. a 37°C, cada diluição foi plaqueada em meio LB, através da adição de 3ml de LB "soft agar". As placas foram mantidas a 37°C por 12 horas. Uma placa de lise isolada de cada clone de interesse foi retirada com um palito e colocada em um tubo contendo 5ml de uma diluição 1:100 de uma cultura estacionária de *E. coli* JM 101 em meio M9-líquido diluída 1:100. Preparou-se, para cada clone inoculado, tubos contendo cada um apenas 5ml da cultura de JM 101 diluída 1:100 e não infectada. Essas culturas foram incubadas a 37°C por 9 horas, e a seguir misturou-se os 5ml da cultura infectada com o fago portador do inserto com os 5ml de uma não infectada, e os 10ml foram então inoculados em 500ml de meio 2xTY. As culturas foram incubadas a 37°C por 12-16 horas, com agitação

As células foram coletadas por centrifugação a 4.000 x g por 10 min. a 4°C, e a seguir foram ressuspensas em 25ml de uma solução gelada de Tris HCl 25mM pH 8,0 contendo glicose 50mM e EDTA 10mM. Adicionou-se 0,5mg de RNase pancreática (pré-tratada 15 min. a 65°C), e 5mg de lisozima, e incubou-se a 4°C por 10 min.. A seguir adicionou-se 25ml de uma solução de lise (SDS 0,5%; NaOH 0,2N), e misturou-se bem até a solução ficar quase clara. Para neutralizar o álcali, adicionou-se 25ml de tampão acetato de potássio 3M pH 4,8, e centrifugou-se a 8.000 x g por 15 min. a 4°C. O sobrenadante foi filtrado em gaze e foram adicionados 2x o volume de etanol gelado e o DNA foi precipitado a -20°C durante 15 horas. Centrifugou-se a 8.000 x g por 15 min. a 4°C, lavou-se o precipitado com etanol 70%, e centrifugou-se novamente. O precipitado obtido foi seco a vácuo e ressuspensão em 5ml de TE contendo SDS 0,1%. Acrescentou-se 5ml de fenol e 5ml de clorofórmio, e após agitação as fases foram separadas por centrifugação a 3.000 x g por 15 min. à temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para outro tubo e acrescentou-se NaCl para uma concentração final de 0,1 M, e 2 volumes de etanol gelado. O DNA foi precipitado por 30 min. em banho de gelo seco/etanol, e centrifugado a 8.000 x g por 15 min. a 4°C. O precipitado foi lavado com etanol 70%, centrifugado novamente e seco a vácuo. O DNA foi ressuspensão em 8,8ml de TE, passado para tubo Corex e então adicionou-se 8,8 g de CsCl e 5 mg de brometo de etídeo. Após dissolver o sal, os tubos são centrifugados a 8.000 x g por 5 min. formando-se um precipitado escuro (proteínas) que é descartado. A solução de CsCl contendo o DNA foi transferida para tubos de ultra-centrífuga (Quick-seal, Beckman) centrifugando-se no rotor 80-Ti a 60.000 r.p.m. por 24 horas a 20°C. A seguir as bandas de DNA foram visualizadas sob luz ultravioleta e a banda correspondente ao RF foi retirada com uma seringa. O brometo de etídeo foi extraído com um volume igual de álcool isoamílico por 3 a 5 vezes, e a seguir o DNA foi dialisado por 2-4 horas contra TE. O tampão de diálise foi

trocado dialisando-se a 4°C por mais 12 horas. O DNA do M13mp19(RF) preparado foi guardado a 4°C.

Para se estimar a concentração do DNA das preparações, mediu-se a D.O.₂₆₀ e a D.O.₂₈₀ de cada uma. Considera-se 1 unidade a D.O.₂₆₀=50 µg DNA/ml.

4 - Extração de RNA.

Células de *Caulobacter* foram inoculadas em PYE líquido e incubadas a 30°C até D.O.₆₀₀ igual a 1. As células foram centrifugadas a 12000 x g por 5 min. a 4°C e a seguir lavadas com 5ml de TEN (Tris-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 1mM; NaCl 10mM) seguindo-se nova centrifugação a 12000 x g por 15 min. a 4°C. As células foram congeladas em banho de etanol/gelo seco e guardadas a -70°C ou lisadas imediatamente em 1ml de acetato de sódio 20mM, EDTA 1mM e 2% SDS. Após forte agitação foi adicionado igual volume de fenol, equilibrado em acetato de sódio 20mM, EDTA 1mM, a 65°C incubando-se 15 min. à mesma temperatura e agitando-se a mistura ocasionalmente. A extração foi feita por centrifugação a 1000 x g por 15 min. a temperatura ambiente. A fase aquosa foi conservada repetindo-se a extração com fenol por 2 vezes. A seguir, foram feitas 2 extrações com clorofórmio precipitando-se a fase aquosa com 1/10 do volume de acetato de sódio 3M pH 5,4 e 2,5 vezes o volume de etanol absoluto por 30 min. em banho de etanol/gelo seco e centrifugação a 12000 x g por 30 min. a 4°C. O precipitado obtido foi seco sob vácuo e guardado a -70°C ou ressuspensso em água tratada com DEPC (0,1%). As quantidades de RNA obtidas foram determinadas medindo-se a D.O.₂₆₀ Considera-se D.O.₂₆₀=1 como 40 µg/ml de RNA.

5 - Eletroforese em gel de agarose.

5.1 - Gel de DNA.

A eletroforese foi feita em gel de agarose (tipo II - Sigma) 1%, com espaçadores de 2mm de espessura e o tampão usado foi TAE. Antes da aplicação no gel, as amostras receberam tampão de amostra (Azul de Bromofenol 0,25% e sacarose 40% em água) na proporção de 1/10 do volume final e foram aquecidas a 65°C por 5 min.. A voltagem usada foi de 100V. O gel foi corado com brometo de etídio (10 mg/ml) - 50µl para 100ml de água - para observação contra luz U.V., segundo Maniatis *et al.*, (1982). As fotos foram feitas com máquina Polaroid. Eletroforese em gel preparativo foi feita com agarose (tipo II - Sigma) 1% em tampão TAE em sistema vertical com espaçadores e 3mm de espessura, submetido à voltagem de 60 V por aproximadamente 5 horas.

5.2 - Gel de RNA.

Eletroforese foi feita em gel horizontal com agarose 1,5% em tampão MOPS contendo formaldeído 3,5%. Foram usadas 5µg ou 10µg de RNA de cada amostra preparadas em tampão MOPS, formaldeído 6% e formamida 50%. As amostras foram aquecidas a 65°C por 10 min. e colocadas no gelo em seguida. Antes da aplicação foram adicionados 2µl de uma solução glicerol 50%, EDTA 1mM, azul de bromofenol 0,25% e 2µl de brometo de etídeo (0,5 mg/ml). A eletroforese foi corrida a 80V por aproximadamente 3 horas, observada através de luz e fotografada com máquina Polaroid.

6 - Eletroforese em gel de poliacrilamida.

6.1 - Gel de DNA.

Este tipo de gel foi utilizado para análise de fragmentos menores de 1,0kb não definidos de forma clara em géis de agarose. O gel foi feito em sistema vertical com poliacrilamida 6% em tampão TBE e espaçadores de 1mm de espessura. As amostras foram aplicadas no gel após a adição de 1/10 do volume de tampão de amostra (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, sacarose 40%) e aquecimento a 65°C por 5 min.. Após a eletroforese o gel foi corado com brometo de etídeo e visualizado através de luz U.V.. As fotos foram feitas com máquina Polaroid.

6.2 - Gel de poliacrilamida-uréia para sequenciamento.

O gel de poliacrilamida 7,5% , contendo uréia 7,5M, foi montado em placas de 20 x 50 cm com espaçadores de 0,4 mm e o tampão de corrida foi TBE 1X. A solução de acrilamida foi aplicada entre as placas com uma seringa após adição de persulfato de amônio (0,05%) e de TEMED (0,2%). Antes de aplicadas, as amostras foram aquecidas a 80°C por 5 min. e a eletroforese foi feita a uma potência constante de 37 W (1680 V, 23 mA). Ao final da corrida, o gel foi fixado em uma solução de etanol 10% e ácido acético 10% por 30 min., transferido para papel 3MM e seco sob vácuo a 80°C por 45 min.. O gel seco foi exposto a filme de raio-X, sem intensificadores, à temperatura ambiente durante 24 horas.

6.3 - Eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS.

O método seguido foi descrito por Laemmli (1970). O gel de corrida continha poliacrilamida 10% e o de empilhamento 4,5%. O tampão de corrida usado foi Tris-glicina/SDS 1x concentrado e a corrida feita a 25mA. Após eletroforese o gel foi fixado com uma solução metanol 50% e ácido acético 10% , tratado com Amplify

(Amersham) por 30 min. e seco sob vácuo a 70°C por 2 horas. O gel foi exposto a filme de raio-X (Kodak X-Omat) a -70°C.

7 - Isolamento de fragmentos de DNA por eletroeluição.

A partir de géis de agarose ou poliacrilamida, a região contendo o fragmento de interesse foi isolada e colocada em membrana de diálise para eletroeluição em tampão TBE 0,5x concentrado, por 2 horas a 100V. Ao DNA eletroeluído foi adicionado acetato de sódio 3M (1/10 v/v), etanol absoluto (2x o volume) e 1µl de tRNA (10mg/ml), para precipitação a -20°C por 15 horas. Após a precipitação a mistura foi centrifugada por 30 min. a 12000 x g, seco sob vácuo e ressuspenso em 400µl de TE contendo RNase. A seguir foi feita extração com fenol/clorofórmio (1/1) e foi adicionado à fase aquosa acetato de sódio 3M (1/10 do volume) e etanol absoluto (2 vezes o volume) para precipitação em banho de etanol/gelo seco. A recuperação foi feita por centrifugação a 4°C por 20 min., lavagem com etanol 70% e secagem sob vácuo. O precipitado obtido foi ressuspenso em 30µl de TE contendo RNase (20µg/ml).

8 - Marcação de sonda de DNA com [α -³²P] dATP.

O sistema de marcação usado foi o de "random primer synthesis", utilizando como "primer" o hexanucleotídeo pd(N)₆ (Feinberg *et al.*, 1984). Foram usados aproximadamente 50 ng do fragmento de DNA aos quais foram adicionados 10ng do iniciador sendo a mistura fervida por 2 min. e rapidamente resfriada no gelo. A reação foi feita em tampão Tris HCl pH 7,2 0,5M; MgCl₂ 100mM e DTT 10mM contendo 1µl de dTTP (500µM); 1µl de dGTP (500µM); [α -³²P] dCTP (50µCi); [α -³²P] dATP (50µCi); 10µg de BSA acetilada e 5U da polimerase Klenow. A reação foi incubada à temperatura ambiente por 3 horas. Para parar a reação foram adicionados 90µl de STE (TE contendo NaCl 0,1M); 2µl de SDS 10% e 2µl de EDTA 0,2M. A mistura foi então purificada em coluna de 0,9ml da resina G-50, equilibrada em TE contendo NaCl 0,1M, a fim de remover os nucleotídeos livres e os fragmentos pequenos. Controles de marcação foram preparados para monitorar a incorporação de radioatividade e recuperação após passagem da sonda pela coluna. Obteve-se, em geral, 1,0x10⁷ cpm totais, contagem feita após coluna e precipitação de uma alíquota com TCA 10%.

9 - Transferência de DNA para filtro de náilon e hibridação com sonda marcada ("Southern blot").

9.1 - Transferência.

Após eletroforese do DNA digerido com enzimas de restrição o gel foi tratado com solução de desnaturação por 45 min. à temperatura ambiente, lavado brevemente com água e tratado, a seguir, com solução de neutralização por 30 min. também à temperatura ambiente. O filtro de náilon foi previamente embebido em solução SSC 2x e a transferência foi feita segundo Southern (1975) utilizando-se solução SSC 10x por um período de 15 a 20 horas. Após a transferência o filtro foi seco à temperatura ambiente por 30 min. seguido de incubação em forno 80°C por 2 horas.

9.2 - Hibridação.

O filtro de nitrocelulose, com o DNA já fixado, foi pré-hibridado com 10ml de tampão fosfato de potássio pH 6,2 60mM contendo SSC 5x; EDTA 10mM; SDS 0,4%; formamida 30% e leite desnatado 5%. O filtro foi incubado com esta solução à 37°C por um período no mínimo igual a 2 horas após o que foi substituída por outros 10ml da mesma solução contendo agora a sonda marcada. A hibridação foi feita a 37°C durante 15 horas, com agitação. Após a hibridação o filtro foi lavado 4 vezes, 1 hora cada lavagem, com uma solução SSC 5x; SDS 0,1%, à 37°C com agitação e por último mais 1 hora à 50°C com a mesma solução. O filtro foi então seco ao ar por 30 min. e exposto contra filme de raio-X (Kodak X-Omat) à -70°C. Estas condições de hibridação e lavagem são condições de baixa exigência. No caso de utilização de sondas homólogas foram mantidas as mesmas condições de hibridação mudando-se apenas as lavagens para condições de alta exigência. Foram feitas 3 lavagens de 45 min. cada com SSC 2x, SSC 1x e SSC 0,1x sempre com SDS 0,1%, sucessivamente.

10 - Transferência de RNA para filtro de náilon e hibridação com sonda marcada ("Northern Blot").

10.1 - Transferência.

O gel contendo RNA foi tratado com solução NaOH 0,05N estéril por 20 min., lavado com água estéril e tratado a seguir com SSC 20x também estéril, a temperatura ambiente. A transferência foi feita com SSC 20x colocando-se o filtro de nitrocelulose, previamente embebido em SSC20x, dois papéis 3MM embebidos em SSC 2x e papel absorvente sobre o gel tratado por um período de 15-20 horas. Após a transferência o filtro foi seco a temperatura ambiente por 30 min. e incubado a 80°C por 2 horas.

10.2 - Hibridação.

O filtro foi pré-hibridado por duas horas a 37°C em tampão fosfato de potássio 60mM contendo SSC 3x concentrado, EDTA 10mM, SDS 0,4%, formamida 50% e leite desnatado 5%. Após a troca da solução o filtro foi hibridado com a sonda marcada a 37°C sob agitação lenta por 15 horas. A lavagem do filtro foi feita em condições de alta exigência com soluções de SSC 1x, 0,2x e 0,1x, sucessivamente, contendo SDS 0,1 % a 37°C por 30 min. cada solução. O filtro foi seco 30 min. a temperatura ambiente e exposto a filme de raio-X (Kodak X-Omat) a -70°C.

11 - Ligação de inserto a vetores de clonagem e de sequenciamento.

11.1 - Ligação.

Aproximadamente 50ng do vetor de interesse digerido com as enzimas adequadas - plasmídeo ou RF de M13 - foram utilizados para a ligação de fragmentos de DNA na proporção de 1:2 (vetor:fragmento). A reação foi feita em tampão Tris-HCl 80mM pH 7,6 contendo MgCl₂ 8mM, DTT 1mM, ATP 1mM, PEG 8.000 5% e 5U da enzima T4 DNA ligase em um volume final de 20µl. A reação de ligação foi feita a 19°C por 16 horas ou a 37°C por 2 horas.

11.2 - Desfosforilação.

Os vetores digeridos com uma única enzima foram desfosforilados para aumento da eficiência de obtenção de clones recombinantes. A incubação foi feita com 1U de fosfatase alcalina (Boehringer Mannheim) em tampão indicado pelo fabricante, por 1 hora a 37°C, seguindo-se uma extração com fenol/clorofórmio (1:1). A seguir o DNA foi precipitado com etanol absoluto contendo acetato de sódio 3M (1/10 do volume), centrifugado 15 min. a 12000 x g, lavado com 0,5ml de etanol 70%, seco sob vácuo e ressuspenso em 30µl de TE.

Os insertos usados, digeridos com a enzima adequada, foram preparados como descrito através de eletroeluição de gel preparativo e precipitação com etanol.

12 - Método de obtenção de subclones deletados.

O método de deleções utilizado para sequenciamento foi conforme descrito por Henikoff (1987). Aproximadamente 40 µg de DNA da forma replicativa do clone recombinante, obtido a partir de preparação por gradiente de CsCl, foram utilizadas. O DNA foi dividido em duas alíquotas iguais e digerido, separadamente, com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*I (30U de cada enzima) que produzem extremidades 5' e 3' protuberantes, respectivamente, a 37°C por 3 horas. Um minigel de agarose 0,7%

contendo amostras dessas digestões foi feito como controle. A seguir as duas alíquotas foram colocadas em um mesmo tubo e mais 10 U de cada enzima foram adicionadas seguindo-se a digestão a 37°C por mais 3 horas. O DNA, após essa dupla digestão, foi precipitado adicionando-se acetato de sódio 3M (1/10 do volume) e etanol absoluto (2X o volume) a -20°C e a seguir recuperado centrifugando-se em minifuge a 4°C por 20 min., lavado com etanol 70%, recentrifugado e seco sob vácuo. O precipitado foi ressuspensão em 80µl de tampão para exonuclease III (Tris-HCl 66mM pH 8,0; MgCl₂ 0,66mM), sendo utilizados 35µl para o início do tratamento com exonuclease III que ataca apenas extremidades 5' protuberantes ou aparadas e não ataca extremidades 3' protuberantes. Aos 35µl de DNA foram adicionadas 700 U de exonuclease III incubando-se então a 37°C. Alíquotas de 3µl de 30 em 30 segundos foram retiradas e colocadas em novos tubos contendo 4U da nuclease S1 em tampão (NaCl 200mM; acetato de sódio 50mM pH 4,5; ZnSO₄ 4mM; glicerol 0,5%) a 4°C. Essa mistura foi então incubada à temperatura ambiente por 30 min. permitindo a digestão, pela nuclease S1, das extremidades simples fita protuberantes do DNA deletado. A reação foi terminada adicionando-se 1µl de uma solução (Tris-base 300mM; EDTA 50mM pH 8,0). Os tubos foram então incubados a 70°C por 10 min., passados para 4°C e equilibrados a 37°C. A seguir adicionou-se 1µl, a cada tubo, uma mistura contendo (Tris-HCl 10mM pH 8,0; MgCl₂ 200mM; 0,25U da polimerase Klenow) e incubou-se a 37°C por 5 min.. Após esse tempo adicionou-se 1µl por tubo de uma solução contendo dATP, dTTP, dGTP e dCTP 0,5mM cada e incubou-se por mais 5 min.. Esse passo teve por objetivo garantir a formação de extremidades aparadas no DNA deletado para posterior ligação. Por fim, adicionou-se nos tubos 40µl de uma mistura contendo (Tris-HCl 50mM pH 7,6; MgCl₂ 10mM; DTT 1mM; ATP 1mM; PEG 6000 25%; 0,5 U de ligase do fago T4. Cada mistura, correspondendo aos tempos de incubação com exonuclease III, foi incubada por 15 horas a 20°C e usada para transfecção em células competentes

13 - Preparação de células competentes e experimento de transformação.

13.1) Preparação de células competentes.

13.1.1) Procedimento descrito por Hanahan (1983).

As células de TG-1 foram inoculadas em meio LB líquido e incubadas a 37°C sob agitação até atingirem uma D.O.₅₅₀ igual a 0,6. A cultura foi então mantida 15 min. no gelo e a seguir centrifugada a 1000 x g por 5 min. a 4°C, descartando-se o sobrenadante e ressuspensão-se as células em tampão TFB (KCl 100mM; MnCl₂ 45mM; CaCl₂ 10mM; Hexamina CoCl₃ 3mM e K-Mes pH 6,3 10mM) (1/3 do volume

original). As células foram novamente centrifugadas e o precipitado ressuspense em TFB (1/12,5 do volume original). Adicionou-se então Dnd (DTT 1M; DMSO 90%; e acetato de potássio pH 7,5 10mM) à 3,5% (v/v), mantendo-se as células por 10 min. no gelo. Adicionou-se Dnd novamente à concentração de 7% (v/v) deixando-se as células por mais 10 a 20 min. no gelo.

13.1.2) Procedimento usando CaCl₂.

Este procedimento foi feito conforme descrito por Maniatis *et al.* (1982).

Células de TG-1 crescidas e precipitadas nas mesmas condições anteriores foram ressuspensas em CaCl₂ 100mM (1/2 do volume original) e mantidas no gelo por 20 min. seguindo-se centrifugação a 1000 x g por 5 min.. As células foram então ressuspensas em CaCl₂ 100mM (1/10 do volume original) e deixadas novamente no gelo por pelo menos 20 min. estando assim prontas para a transformação.

13.2) Experimento de transformação.

Para 200µl de células competentes adicionou-se 5-10µl da mistura de ligação incubando-se no gelo por 20 a 40 min.. As células foram submetidas a um choque térmico a 42°C por 90 segundos e colocadas no gelo por 2 min.. Adicionou-se então 0,8ml de meio LB líquido e incubou-se as células por 1 hora a 37°C com agitação suave, tempo necessário para expressão da resistência a ampicilina. Após a incubação as células foram centrifugadas em minifuge por 1 min. a temperatura ambiente, ressuspensas em 0,2ml de meio LB líquido e plaqueadas em meio LB contendo ampicilina (100 µg/ml), 30µl de IPTG 100mM e 30µl de X-gal 2% em dimetilformamida. As placas foram incubadas a 37°C por 12 a 18 horas.

O sistema de seleção usado foi o do indicador X-gal em presença do indutor IPTG. As colônias recombinantes obtidas foram repicadas em placas de meio LB contendo ampicilina, e analisadas através de minipreparações de plasmídeo.

14 - Crescimento e transfecção de *E. coli* JM 101 e TG-1.

O procedimento utilizado para preparação de células competentes foi o mesmo usado na transformação sendo modificado apenas no plaqueamento. Após o choque térmico as células foram mantidas a 4°C por 2 min., e cada transfecção foi dividida em 3 tubos, contendo 90%, 9% e 1% do volume inicial. Para cada tubo são adicionados 100µl de uma cultura de JM 101 crescida durante a noite, 40µl de X-gal 2% em dimetilformamida, 30µl de IPTG 100mM e 3ml de LB "soft agar". Cada mistura foi então vertida sobre placas de meio LB que foram incubadas a 37°C por 12

horas. Como descrito para as colônias recombinantes após a transformação somente as placas de lise brancas são portadoras de inserto já que o vetor M13 possui o mesmo sistema de seleção pelo gene da β -galactosidase.

15 - Análise do DNA simples fita recombinante em gel de agarose.

O protocolo foi iniciado a partir do sobrenadante obtido após a centrifugação das culturas preparadas para isolamento dos fagos M13 simples fita recombinantes. À 25 μ l desse sobrenadante foram adicionados 5 μ l de tampão de amostra contendo SDS 1%, azul de bromofenol 0,25% e glicerol 20% aquecendo-se a mistura a 65°C por 15 min.. As amostras foram aplicadas em gel de agarose 0,7% horizontal em tampão TBE contendo brometo de etídeo (1,25 μ g/ml), sendo a corrida a 50V por 15 horas para posterior visualização através de luz U.V.

16 - Sequenciamento do DNA.

16.1 - Klenow.

O método utilizado foi o de Sanger *et al.*, (1977), utilizando dideoxynucleotídeos. As reações foram feitas em uma placa de ensaio de 96 poços. Em um dos lados da parede de um poço foram colocados 2 μ l do DNA simples fita purificado e do outro lado foram colocados 2 μ l de tampão Tris HCl 12,5mM pH 8,5 contendo MgCl₂ 6,25mM e 25 nM do iniciador universal de M13 17-mer (5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3') situado na posição -20 nucleotídeos do sítio múltiplo de clonagem. Através de uma rápida centrifugação as duas gotas se misturam no fundo do poço. A placa foi então incubada por 1 hora a 55°C a fim de permitir a hibridação do iniciador ao DNA simples fita do M13mp19. Após este tempo, foram colocados 2 μ l de uma mistura de nucleotídeos contendo um dos 4 dideoxynucleotídeos (ddATP, ddGTP, ddCTP ou ddTTP), nas seguintes proporções:

- mistura de T: dTTP 6,25 μ m + dGTP 125 μ m + dCTP 125 μ m + ddTTP 250 μ m
- mistura de C: dCTP 6,25 μ m + dGTP 125 μ m + dTTP 125 μ m + ddCTP 40 μ m
- mistura de G: dGTP 6,25 μ m + dTTP 125 μ m + dCTP 125 μ m + ddGTP 80 μ m
- mistura de A: dTTP 125 μ m + dCTP 125 μ m + dGTP 125 μ m + ddATP 15 μ m

Na outra parede do poço foram colocados 2 μ l de uma solução contendo 1/8 do volume de DTT 0,1 M, 0,5 μ Ci/ μ l de [α -³²P]-dATP e 0,125 U/ μ l da polimerase Klenow. Após breve centrifugação, a placa foi deixada por 15 min. à temperatura ambiente. Adicionou-se então 2 μ l de uma mistura de dNTPs 0,25mM, e deixou-se

mais 15 min. à temperatura ambiente. Neste momento pode-se congelar a placa a -20°C, ou adicionar 2µl da mistura de corantes (azul de bromofenol 0,1%, xilenocianol 0,1%, EDTA 0,01 M em formamida deionizada). Após 20 min. a 80°C, as amostras podem ser aplicadas ao gel de poliacrilamida-uréia.

16.2 - Sequenase.

Reações de sequência utilizando Sequenase (USB Corporation) foram feitas a fim de se obter leituras mais precisas das sequências de interesse. A enzima usada neste método é a T7 DNA polimerase modificada geneticamente *in vitro* não possuindo atividade exonucleolítica 3'-5'.

As reações foram iniciadas com 7µl do DNA simples fita purificado (aproximadamente 1µg) e 1µl (0,5pmol) do iniciador universal de M13 (5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3'), situado na posição -40 nucleotídeos do sítio múltiplo de clonagem ou oligonucleotídeo sintético, em tampão (Tris-HCl 20mM pH 7,5; MgCl₂ 10mM; NaCl 25mM). Essa mistura foi aquecida a 65°C por 2 min. deixando-se esfriar à temperatura ambiente até uma temperatura menor que 35°C. A seguir foi adicionado a cada reação 1µl de DTT 100mM, 2µl de mistura de marcação contendo dGTP, dCTP, dTTP 7,5 µM previamente diluída 1:5, 0,5 µCi de [α-³²P]-dATP e 0,25U de sequenase. A reação foi incubada à temperatura ambiente por 2-5 min. após o que 3,5µl dessa mistura foram transferidos para 4 tubos contendo misturas de terminação para T, C, G e A que contém: NaCl 50mM; dGTP 80µM; dATP 80µM; dCTP 80µM; dTTP 80µM e 8µM do do respectivo dideoxinucleotídeo, ddTTP, ddCTP, ddGTP e ddATP, seguindo-se uma incubação a 37°C por 5 min.. Por fim, as reações foram terminadas com 4µl de uma mistura contendo formamida 95%, EDTA 20mM, azul de bromofenol 0,05% e xileno cianol FF 0,05%. As reações podem ser congeladas a -20°C ou então aquecidas a 75°C por 2 min. para aplicação em gel de poliacrilamida-uréia. As sequências de DNA e respectivas traduções obtidas foram comparadas com sequências dos bancos de dados (Genbank, PIR e Swissprot) utilizando-se o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990).

17 - Ensaio de atividade do promotor utilizando-se o gene repórter de transcrição de β-galactosidase.

17.1 - Construção do vetor para o ensaio.

Diferentes fragmentos de DNA, contendo o promotor do operon *groESL*, foram isolados por eletrocluição e usados na ligação ao vetor *placZ/290*. A mistura de

ligação continha quantidades aproximadamente iguais de vetor e inserto em tampão de ligação e 1U de ligase do fago T4. A incubação foi feita a 19°C por 12-18 hs e usada para transformação de *E.coli* TG-1 competentes preparadas com CaCl₂. Os recombinantes foram selecionados após plaqueamento em meio LB contendo Tetraciclina (12,5 µg/ml) e analisados quanto a presença do inserto em gel de agarose 1% em tampão TAE. A construção obtida contém o gene da β-galactosidase do vetor sob controle do promotor de *groESL* contido no inserto.

17.2 - Conjugação de *Caulobacter*.

A conjugação de *Caulobacter* com *E.coli* foi usada para a transferência da construção obtida em *E.coli* uma vez que não é possível transformar *Caulobacter* pelos métodos descritos. A cepa de *E.coli* S-17-1 (pRK 2013) que possui as funções de transferência, e o recombinante (*placZ/290 BamHI/HindIII*) contendo a construção *placZ/290* + inserto foram crescidas a 37°C em LB contendo Kanamicina (50µg/ml) e Tetraciclina (12,5µg/ml), respectivamente. A cepa de *Caulobacter* NA1000 foi incubada a 30°C em PYE líquido. Sobre um filtro de nitrocelulose estéril submetido a vácuo foram adicionados 1ml de culturas estacionárias da cepa NA1000, 0,5ml da cepa S-17-1 (pRK 2013) e 0,5ml de *E.coli* contendo *placZ/290 BamHI/HindIII*. Os filtros foram incubados sobre placas de PYE a 30°C durante a noite e a seguir as bactérias foram ressuspensas em 1ml de PYE. Após agitação 100µl do meio foram plaqueados em PYE, ácido nalidíxico (20µg/ml) e tetraciclina (12,5µg/ml) e incubados a 30°C. As placas de PYE contendo ác. nalidíxico/tetraciclina permitem a seleção da cepa de *Caulobacter* que contém a construção uma vez que o ác. nalidíxico impede o crescimento de *E.coli* nessa concentração.

17.3 - Ensaio com β-galactosidase.

A cepa de *Caulobacter* contendo a construção (*lac 290 BamHI/HindIII*) foi crescida em meio PYE líquido durante a noite a 30°C. O ensaio foi feito segundo Miller (1972). Foram usados 50 ou 100µl destas células para dosagem da atividade de β-galactosidase adicionando-se 0,8ml de tampão Z (Fosfato de Na 60mM pH 7,0; KCl 10mM; MgSO₄ 1mM; β-mercaptoetanol 50mM) e 50µl de clorofórmio. A mistura foi agitada e incubada a 30°C por 5 min.. A seguir foram adicionados 200µl do substrato cromogênico ONPG (4mg/ml) e incubou-se por mais 5 a 10 min. a 30°C. A reação foi parada com 0,4ml de Na₂CO₃ 1M seguindo-se uma centrifugação a 12000 x g por 5 min. a temperatura ambiente. A atividade de β-galactosidase foi determinada

medindo-se a D.O.₄₂₀ do sobrenadante e a D.O.₆₀₀ da cultura utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Atividade} = \frac{1000 \times \text{D.O.}_{420}}{\text{D.O.}_{600} \times \text{vol(ml)} \times \text{t(min)}} \quad \text{Unidades de } \beta\text{-galactosidase}$$

18 - Sincronização de células de *Caulobacter crescentus*.

Células da cepa NA1000 foram inoculadas em PYE líquido e incubadas a 30°C até a fase estacionária. As células foram então diluídas 1/20 em meio mínimo M2 líquido e também incubadas a 30°C até atingir a fase estacionária (24hs) inoculando-se, após esse período, 3ml dessa cultura em 500ml de M2 líquido para crescimento a 30°C até uma D.O.₆₀₀ igual a 0,9. As células foram centrifugadas a 7800 x g por 10 min. a 4°C, o sobrenadante foi dispensado e as células obtidas ressuspensas em 70ml da solução M2 sais (Na₂HPO₄ 18mM; KH₂PO₄ 8mM; NH₄Cl 9mM). À suspensão de células adicionou-se 35ml de Ludox LS (Dupont) filtrado. A mistura foi homogeneizada e centrifugada a 10000 x g por 30 min. a 4°C separando-se desta forma as células dos diferentes estágios do ciclo celular. As células móveis são mais densas e formam uma banda próxima ao fundo do tubo enquanto as células pré-divisionais e talo ficam no topo do tubo. As células móveis foram coletadas e lavadas 4 vezes com solução M2 sais para retirar o Ludox, centrifugando-se a 6000 x g por 5 min. a 4°C. Após a última lavagem as células móveis foram ressuspensas em meio líquido M2 completo, para uma D.O.₆₀₀ igual a 0,3. A sincronização com este procedimento é de aproximadamente 90%. As células foram então incubadas a 30°C para prosseguirem no ciclo celular.

19 - Marcação de proteínas *in vivo* com pulsos de [³⁵S]- metionina.

A partir das células móveis sincronizadas foram retiradas alíquotas de 1ml nos tempos correspondentes a 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min. do ciclo celular para marcação adicionando-se 15µCi de [³⁵S]-metionina. As células foram incubadas por 10 min. a 30°C e coletadas por centrifugação a 12000 x g por 5 min. a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células congeladas a -20°C.

20 - Ensaio de Imunoprecipitação.

As células marcadas com [³⁵S]-metionina foram ressuspensas em 50µl TE pH 8,0 contendo lisozima 10mg/ml adicionando-se a seguir 0,5ml de tampão de lavagem (Tris-HCl pH 8,0 50mM; NaCl 0,3M e triton-X100 0,5%). A suspensão foi

incubada por 30 min. a 4°C e então centrifugada a 12000 x g por 30 min.. Ao sobrenadante adicionou-se 25µl de "Staph A" (células de *Staphylococcus aureus* fixadas com formol - BRL) e incubou-se por 30 min. a 4°C seguindo-se nova centrifugação a 12000 x g por 15 min.. Alíquotas de 5µl do sobrenadante foram precipitadas em TCA 10% e contadas em contador de cintilação (Beckman). Quantidades iguais de cpm de cada alíquota foram incubadas com 1µl de anticorpo anti-β-galactosidase a 4°C por 15-20 horas. Foram adicionados 25µl de "Staph A" incubando-se por mais 30 min. e centrifugando-se por 30 segundos a 12000 x g a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspense em 1ml de tampão de lavagem e recentrifugado por 1 min., 3 vezes sucessivamente. O precipitado final foi ressuspense em 30µl de tampão de amostra para eletroforese. As amostras foram fervidas por 5 min. e centrifugadas por 2 min. em Minifuge. Adicionou-se 1µl de DTT 0,1M, e as amostras foram analisadas em gel de poliacrilamida/SDS.

21 - Ensaio para determinação de início de transcrição.

O ensaio foi feito através de extensão de oligonucleotídeo complementar à fita codificadora marcado na sua extremidade 5' com [γ-³²P]-ATP usando transcriptase reversa. A marcação de 50 pmoles de oligonucleotídeo foi feita com 40µCi de [γ-³²P]-ATP em tampão Tris-HCl 50mM pH 7,6; MgCl₂ 10mM; DTT 5mM; cloreto de espermidina 0,1mM; EDTA 0,1mM e 10U de polinucleotídeo quinase (Biolabs) incubando-se por 30 min. a 37°C. A seguir o DNA foi precipitado com 1µg de tRNA, acetato de sódio 3M (1/10 v/v) e 300µl de etanol absoluto por 30 min. ou mais em banho de etanol/gelo seco, centrifugado a 12000 x g por 30 min. a 4°C, lavado com 250µl de NaCl 0,25M e 0,5ml de etanol absoluto e seco sob vácuo por 15 min.. O precipitado final obtido foi ressuspense em 20µl de TE e a incorporação medida contando-se 1µl do oligonucleotídeo precipitado em TCA 10% em contador de cintilação (Beckman). A hibridação foi feita com 50µg de RNA total e 1x10⁶ c.p.m. do oligonucleotídeo precipitando-se com acetato de sódio 3M (1/10 v/v) e etanol absoluto (2,5 vezes v/v) em banho de etanol/gelo seco por 30 min.. Depois de secas as amostras foram ressuspensas em 25µl de tampão de hibridação (PIPES 100mM pH 7,0; NaCl 1M e EDTA 5mM), fervidas 10 min. e transferidas para 44°C, incubando-se por um período de no mínimo 4 horas. Após a hibridação foram adicionados 40µl de água e 180µl de etanol absoluto seguindo-se nova precipitação em banho de etanol/gelo por 30 min. e centrifugação em Minifuge. O precipitado obtido foi ressuspense em tampão de transcriptase reversa (Tris-HCl 50mM pH 8,3; MgCl₂ 5mM; KCl 40mM) contendo DTT 10mM, dNTPs 1mM de cada, 0,02 U de RNAsin e 25 U de

transcriptase reversa. Essa mistura foi incubada por 1 hora a 37°C para extensão do oligonucleotídeo adicionando-se então EDTA a 10mM e 32µg de RNase seguindo-se nova incubação a 37°C por 30 min.. O volume foi completado para 200µl com STE sendo feita uma extração com fenol/clorofórmio precipitando-se a fase aquosa com 500µl de etanol absoluto. As amostras foram ressuspensas em 4µl de mistura de corantes (azul de bromofenol 0,1%, xilenocianol 0,1%, EDTA 0,01 M em formamida deionizada), fervidas por 5 min. e submetidas a eletroforese em gel de sequenciamento.

22 - Reação de polimerização em cadeia (PCR).

A reação de PCR foi feita utilizando-se 2ng de DNA da forma replicativa do M13, contendo o fragmento *Xba*I de 2,0kb que inclui a região promotora, linearizado após digestão com *Eco*RI e 0,5 µg de cada oligonucleotídeo. O tampão de reação continha Tris-HCl pH 8,8 20mM; KCl 10mM; (NH₄)₂SO₄ 10 mM; MgSO₄ 2mM; Triton X-100 0,1%; dNTPs 0,25mM, sendo usado 1 unidade de Vent DNA Polomerase (New England Biolabs). As condições de reação seguiram o seguinte programa: desnaturação do DNA a 94°C por 1 min., anelamento dos oligonucleotídeos usados como iniciadores a 55°C por 3 min. e extensão da cadeia de DNA a 72°C por 1 min. Estes passos foram repetidos por 30 ciclos seguindo-se uma incubação final a 72°C por 6 min. para finalização das extensões. O produto de reação foi submetido a eletroforese em gel de 6% poliacrilamida TAE sendo o fragmento obtido visualizado sob luz U.V. após coloração com brometo de etídio. O fragmento foi cortado do gel, isolado através de eletroeluição e ligado ao vetor pUCBM20 que confere resistência a ampicilina permitindo a seleção após plaqueamento em meio adequado.

23 - Isolamento de proteínas e transferência para membrana de nitrocelulose ("Western Blot").

O método seguido foi descrito por Towbin *et al.*, (1979). O isolamento de proteínas totais de *Caulobacter* foi feito a partir de células sincronizadas, nos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150, e 180 min. do ciclo celular e células submetidas a diferentes tempos de choque térmico, a 42°C. Depois de coletadas por centrifugação as células correspondentes a cada ponto foram tratadas com volume igual de TCA 25% por 30 min. a 4°C. As amostras foram então centrifugadas por 10 min. a 8000 x g, lavadas com 1 ml de acetona fria, recentrifugadas e secas sob vácuo. O precipitado obtido foi ressuspensado em 100µl de tampão de amostra para eletroforese e fervida por 5 min.. Uma alíquota de 10µl foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS como

controle. Estas mesmas amostras foram usadas para transferência em membrana de nitrocelulose após eletroforese em minigel (poliacrilamida/SDS) (Sistema Trans-Blot - Bio-Rad). A transferência foi feita em tampão Tris-base 25mM; glicina 196mM e metanol 20% por 2 horas a 250mA. A membrana contendo as proteínas foi corada com Ponceau S (0,1% em ác. acético 10%) para controle da transferência e marcação dos padrões de peso molecular, seguindo-se o bloqueio com TBS contendo leite (5%) por 30 min. a 4°C. A incubação com antisoro anti-GroEL (gentilmente cedido pelo Dr. Georgopoulos) (diluído 1:1000) foi feita em TBS/leite por 16 horas a 4°C, sendo as lavagens feitas com TBST uma vez e TBS, quatro vezes, por 10 min. cada à temperatura ambiente. A incubação com o 2º anticorpo (anti-IgG de coelho conjugado com fosfatase alcalina - Sigma) diluído 1:7000 foi feita também em TBS/leite por 30 min. a temperatura ambiente. A membrana foi lavada como anteriormente, seca em papel de filtro e revelada, protegida da luz, por 10 min. a temp. ambiente com uma solução Tris-HCl pH 7,5 100mM; NaCl 100mM; MgCl₂ 5mM contendo 3 mg de NBT (azul de nitrotetrazólio) e 1,5 mg de BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato) para desenvolvimento da cor. Por fim a membrana foi lavada com TBS e seca a temperatura ambiente sobre papel de filtro.

24 - Transformação por eletroporação e isolamento de clones por recombinação homóloga.

A transformação foi feita por eletroporação com células da cepa LS176 *bla*⁻ (β -lactamase⁻) de *Caulobacter* que é sensível a ampicilina permitindo a seleção de clones recombinantes resistentes ao antibiótico, uma vez que células selvagens já possuem uma certa resistência a ampicilina. As células foram preparadas a partir de uma cultura com D.O.₆₀₀ entre 0,6 e 0,8, lavadas 3 vezes com 500ml de glicerol 10%, centrifugando-se a 8000 x g por 10 min. a 4°C e concentradas para um volume entre 1-2ml. O DNA usado para eletroporação (20-30 μ l) foi dialisado em filtro tipo VS-0,025 μ m (Millipore) mantido sobre H₂O miliQ em uma placa de Petri estéril por 1 hora a temp. ambiente. Após coletado, foram usados 10 μ l do DNA para transformar 50 μ l de células. As condições do pulso para eletroporação foram de 25 μ F de capacitância, 200 Ω (Ohms) de resistência e 1,2 kVolts em uma câmara de 0,1cm de espessura em equipamento da Bio-Rad. A seguir adicionou-se às células 1ml do meio líquido PYE para incubação a 30°C por 1 hora, permitindo a recuperação das células. O plaqueamento foi feito em meio PYE-agár contendo 50 μ g/ml de ampicilina a fim de se isolar os clones onde houvesse ocorrido recombinação homóloga. Os clones obtidos (resistentes ao antibiótico) foram isolados e crescidos em meio PYE líquido contendo

10µg/ml de amplacilina. O DNA desses clones foi isolado e digerido, separadamente, com as enzimas de restrição KpnI, Sall, *EcoRI* e *BamHI*, cujos sítios não estão presentes no gene *groEL* de *Caulobacter* (resultados obtidos de "Southern blots" com DNA genômico). Após a digestão, o DNA foi congelado a -20°C, incubado por 30 min. a 70°C para inativação das enzimas e mantido a 4°C. A essa mistura foi adicionado ATP para concentração final de 1mM e 2U de ligase seguindo-se incubação a temp. ambiente por 3 horas. O DNA contido na ligação foi dialisado como anteriormente e usado para eletroporação de *E.coli* com pulso de 25µF de capacitância, 200Ω de resistência e 1,5 kVolts em uma câmara de 0,1cm de espessura. A seguir adicionou-se 1 ml do meio 2XTY para recuperação das células a 37°C por 1 hora e posterior plaqueamento em LB-agár contendo amplacilina (100µg/ml). Os clones obtidos dessa forma continham plasmídeos correspondentes ao vetor Bluescribe (vetor do clone 95-1) mais um fragmento do DNA genômico de *Caulobacter* correspondente ao operon *groESL* completo.

25 - Preparação de mutações sítio-dirigidas.

As mutações sítio-dirigidas foram feitas segundo o método de Kunkel *et al.*, (1987). Este método baseia-se no uso da fita simples de DNA do fago M13 contendo resíduos de uracila substituindo parte dos resíduos de timina. Esse DNA é obtido utilizando-se a cepa de *E.coli* CJ236 que contém as mutações *dut⁻ ung⁻*. A mutação *dut⁻* leva à deficiência da enzima dUTPase elevando o nível de dUTP intracelular, favorecendo a incorporação de resíduos de dUTP no DNA do M13. A mutação *ung⁻* impede a remoção dos resíduos de dUTP incorporados, por codificar uma enzima uracil-N-glicosilase inativa. Cada molécula de DNA simples fita produzida contém cerca de 20-30 resíduos de uracila incorporados. O oligonucleotídeo contendo a mutação de interesse a ser introduzida no fragmento clonado no M13 é usado para gerar a fita complementar.

A transformação de uma cepa *dut⁺ ung⁺* com o DNA dupla fita leva à inativação da fita que contém os resíduos de uracila por ataques de nucleases específicas. A fita (+) do DNA do fago é então removida havendo formação de nova fita, derivada da fita (-) sem uracilas, com grande proporção da mutação de interesse introduzida pelo oligonucleotídeo.

25.1 - Preparação do fago M13.

Cerca de cinco placas de lise do fago M13 contendo o fragmento a ser mutado foram inoculadas em 50ml de meio LB contendo células de TG-1 (1/100) e

crecidas a 37°C durante a noite. A partir dessa cultura centrifugou-se 40 ml a 17.000 x g por 15 min. a 4°C. O sobrenadante foi conservado, recentrifugado e 30ml passados para novo tubo. Adicionou-se 10ml de NH₄Ac 3,5M/PEG 20% e incubou-se 30 min. a 4°C. A seguir a mistura foi centrifugada a 27.000 x g por 30 min. a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o tubo mantido invertido por 5 min.. O precipitado obtido foi ressuspensão em 300µl de tampão de diluição de M13 (NaCl 300mM, Tris-HCl pH 8,0 10mM, EDTA 1mM) e transferido para novo tubo. Uma diluição 1/1000 do fago foi preparada e mantida a 4°C.

25.2 - Incorporação de uridina.

A cepa de *E.coli* CJ236 (*dut⁻ ung⁻*) foi crescida em 5ml de meio LB contendo cloranfenicol (30µg/ml) até a fase estacionária e diluída em 50ml do mesmo meio para D.O.₆₀₀=0,05. Essa cultura foi crescida a 37°C até atingir D.O.₆₀₀=0,3 sendo então acrescentado 1µl da diluição 1/1000 do fago e 0,25µg de uridina deixando-se crescer por mais 8 horas sob agitação. Os fagos contendo uridina no DNA foram isolados como descrito acima após duas centrifugações e precipitação do sobrenadante com NH₄Ac 3,5M/PEG 20%. Os fagos foram ressuspensos em 300µl de tampão de diluição de M13, mantidos por 30 min. a 4°C e centrifugados 12.000 x g por 2 min.. O sobrenadante foi transferido para novo tubo seguindo-se 3 extrações: fenol, fenol/clorofórmio:álcool isoamílico (24:1) e clorofórmio:álcool isoamílico. A fase aquosa foi precipitada com 1/10 vol. de acetato de sódio 3M e 2,5x o volume de etanol absoluto a -20°C por 30 min. e centrifugação a 12.000 x g por 15 min. a 4°C. O precipitado foi lavado com etanol 70%, seco sob vácuo e ressuspensão em 100µl de TE.

25.3 - Reação de mutagênese.

Os oligonucleotídeos utilizados para as reações de mutagênese necessitam estar fosforilados para posterior hibridação com o DNA fita simples contendo uridina. Cerca de 150 pmoles de oligonucleotídeo foram incubados em tampão Tris-HCl pH 8,0 70mM, MgCl₂ 10mM, DTT 5mM contendo ATP 0,3mM e 10U de T4 polinucleotídeo quinase a 37°C por 1 hora. A hibridação foi feita utilizando-se 15 pmoles do oligonucleotídeo fosforilado e 5µl do DNA fita simples em tampão Tris-HCl pH 7,5 20 mM, MgCl₂ 2mM e NaCl 50mM em um volume final de 15µl. Essa mistura foi aquecida a 95°C por 5 min. deixando-se esfriar à temperatura ambiente até aproximadamente 30°C. A seguir adicionou-se 1µl de tampão de reação 10x (Tris-HCl pH 7,5 175mM, MgCl₂ 37,5mM, DTT 215mM, ATP 7,5mM e dNTPs 4mM cada), 1µl de ATP 10mM, 1µg de proteína do gene 32 de T4, 20U de T4 DNA ligase e 1U

de T4 DNA polimerase. A mistura foi incubada por 5 min. à temperatura ambiente e a seguir a 37°C por no mínimo 90 min. Após a adição de 90µl de TE, a mistura foi usada na transformação de células de TG-1 competentes. Os transformantes obtidos foram analisados através de sequenciamento do DNA para identificação dos mutantes. Os clones contendo as mutações de interesse tiveram o DNA dupla fita do M13 (forma replicativa) isolado e preparado para a construção de fusões de transcrição.

III - RESULTADOS

1 - Isolamento e caracterização do operon *groESL* de *Caulobacter*.

1.1 - Construção e análise do banco genômico parcial.

A estratégia seguida para o isolamento do operon *groESL* de *Caulobacter* teve por base a utilização do operon homólogo de *E.coli* como sonda. A partir do filtro de nitrocelulose, contendo DNA total de *Caulobacter* digerido com diferentes enzimas de restrição (Fig.2a), verificou-se que o operon *groESL* de *E.coli* hibridava, em condições de baixa exigência, com três fragmentos de 4,0, 5,0 e 3,0 kb resultantes das digestões com *Pst*I, *Xho*I e *Bam*HI/*Pst*I, respectivamente (Fig.2b). O fragmento de aproximadamente 2,2kb usado como sonda contém os genes *groEL*, *groES* e seu promotor e foi isolado digerindo-se o plasmídeo pOF39 (Hemmingsen *et al.*, 1988) com as enzimas *Eco*RI e *Hind*III. Para o isolamento do operon *groESL* de *Caulobacter* construiu-se um banco genômico parcial isolando-se a região correspondente aos fragmentos *Pst*I de 3,0 e 5,0 kb do DNA de *Caulobacter* digerido com *Pst*I. O fragmento contido nessa região e reconhecido pela sonda deveria conter o gene *groEL* e/ou *groES* de *Caulobacter*. O banco genômico parcial foi preparado ligando-se os fragmentos entre 3,0 e 5,0 kb obtidos da digestão do DNA de *Caulobacter* com *Pst*I ao vetor Bluescribe digerido com a mesma enzima. A ligação resultante foi utilizada para transformação da cepa de *E.coli* JM 109. Os clones recombinantes obtidos (colônias brancas) foram isolados, utilizados para extração de plasmídeo e experimentos de "Southern blot" utilizando-se o fragmento *Eco*RI/*Hind*III de 2,2kb contendo os genes *groE* de *E.coli* marcados como sonda.

Os experimentos de "Southern blot" foram feitos após digestão dos plasmídeos com *Pst*I, eletroforese e transferência do DNA para filtro de nitrocelulose. O filtro obtido era então hibridado com o fragmento *Eco*RI/*Hind*III de 2,2kb isolado do plasmídeo pOF39. A análise de mais de 200 clones revelou um clone positivo designado pMA95. Este clone foi isolado e teve seu plasmídeo extraído e digerido com *Pst*I mostrando a presença de um inserto de 4,0kb. O fragmento *Pst*I de 4,0kb foi então utilizado para sequenciamento através de clonagem no vetor M13mp19. As sequências das extremidades das duas orientações obtidas do inserto isolado foram traduzidas e analisadas em computador (programa BLAST) revelando que o fragmento clonado possuía homologia com o gene *groEL* de *E.coli*, mas que o gene *groEL* não estava completo neste clone.

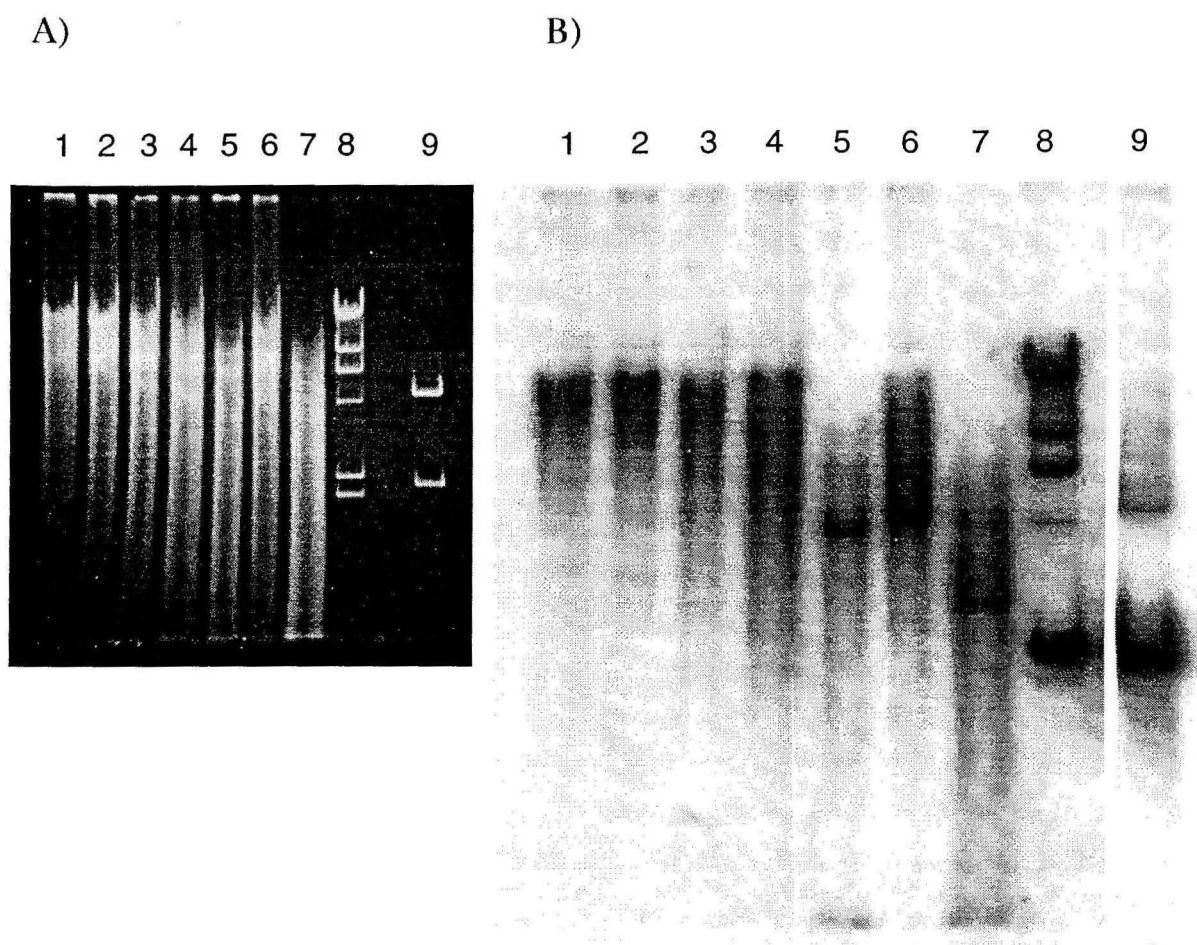


Figura 2 - (A) Eletroforese em gel de agarose 1% (tampão TAE) de DNA total de *Caulobacter* digerido com diferentes enzimas de restrição, corado com brometo de etídio. Raia 1-*EcoRI*; raia 2-*HindIII*; raia 3-*EcoRI/HindIII*; raia 4-*BamHI*; raia 5-*PstI*; raia 6-*XhoI*; raia 7-*BamHI/PstI*; raia 8-padrão de peso molecular correspondendo aos fragmentos de DNA do bacteriófago λ digerido com *HindIII* (23,1kb; 9,4kb; 6,5kb; 4,4kb; 2,3kb; 2,0kb) e raia 9-fragmento contendo o operon *groESL* de *E.coli* (2,2kb) obtido do plasmídeo pOF39 digerido com *EcoRI/HindIII* está indicado. (B) Autorradiograma correspondente ao "Southern" do DNA genômico de *Caulobacter* mostrado em (A) hibridado com os genes *groE* de *E.coli* marcados com ^{32}P .

1.2 - Isolamento da extremidade 3' de *groEL* por recombinação homóloga.

Com o objetivo de se obter um clone contendo a sequência completa do gene *groEL* de *Caulobacter*, incluindo cerca de 1,0kb da porção 3' ausente no clone pMA95, este plasmídeo foi usado na eletroporação da cepa LS176 *bla^r* de *Caulobacter*, sensível a ampicilina. A recombinação homóloga em *Caulobacter* ocorre em taxas bastantes altas permitindo o isolamento dos recombinantes contendo o plasmídeo integrado na região do gene *groEL* (Fig.3), neste caso, através da seleção com ampicilina cuja resistência é codificada pelo vetor Bluescribe no clone pMA95. Um dos recombinantes obtidos teve seu DNA genômico isolado e digerido separadamente com várias enzimas de restrição que não digerem o gene *groEL* como verificado através de "Southern blots". Os fragmentos das digestões foram ligados por adição de T4 DNA ligase para refazer o plasmídeo que agora deve conter sequências codificando o gene *groEL* inteiro. Estas ligações foram utilizadas para transformar *E.coli* e os plasmídeos dos transformantes obtidos foram denominados *SacI*, *KpnI*, *BamHI* e *EcoRI* segundo a enzima usada para as digestões do DNA genômico do recombinante. A digestão destes plasmídeos com as enzimas *XbaI* e *ClaI* deveriam permitir o isolamento de um fragmento de 5,0kb de acordo com o mapa de restrição montado a partir de digestões do DNA genômico de *Caulobacter* (Fig.4). O gel contendo as digestões *XbaI* e *ClaI* (Fig.4a) foi transferido para membrana de nylon e hibridado com o fragmento 95/*XbaI* de 2,0kb marcado com ³²P como sonda (Fig.5). O autorradiograma (Fig.4b) mostra o reconhecimento pela sonda do fragmento *XbaI/ClaI* de 5,0kb como esperado. Este fragmento foi isolado através de gel preparativo e eletroeluição, e ligado ao vetor Bluescript KS também digerido com *XbaI/ClaI*. Um clone contendo agora a sequência completa do gene *groEL* foi isolado e denominado pMA5. Procedeu-se então a digestão de pMA5 com diferentes enzimas de restrição para preparação de um "Southern blot" que mostrou que o fragmento *XbaI/ClaI* de 5,0 kb deveria conter sequências a 5'e a 3'de *groEL* pois o mesmo hibridou tanto com o fragmento *XbaI* de 2,0kb do clone 95-1 quanto com a porção 3' do gene *groEL* de *E.coli* (não mostrado).

1.3 - Sequenciamento do operon *groESL*.

A análise do padrão de restrição do clone pMA95 permitiu a identificação e posterior isolamento de um fragmento de 2,0kb quando digerido com a enzima *XbaI*. Este fragmento é liberado do vetor pela presença de um sítio de *XbaI* no clone e outro no vetor Bluescribe (Fig.5). Este fragmento foi subclonado no vetor M13mp19 e analisado por sequenciamento confirmando, em uma de suas extremidades, a

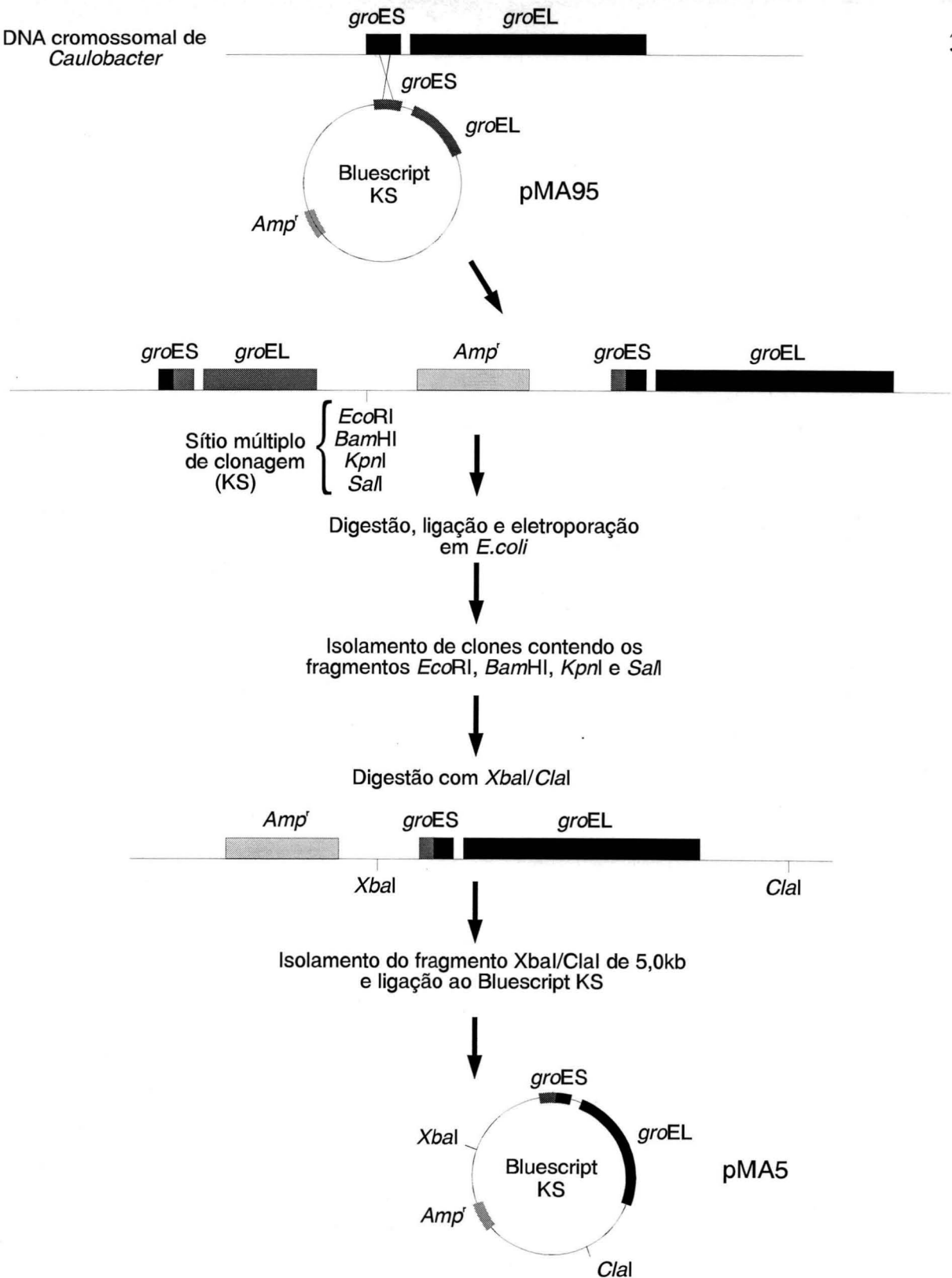


Figura 3 - Esquema mostrando a estratégia utilizada para clonagem de um fragmento contendo o operon *groE* completo através de recombinação homóloga.

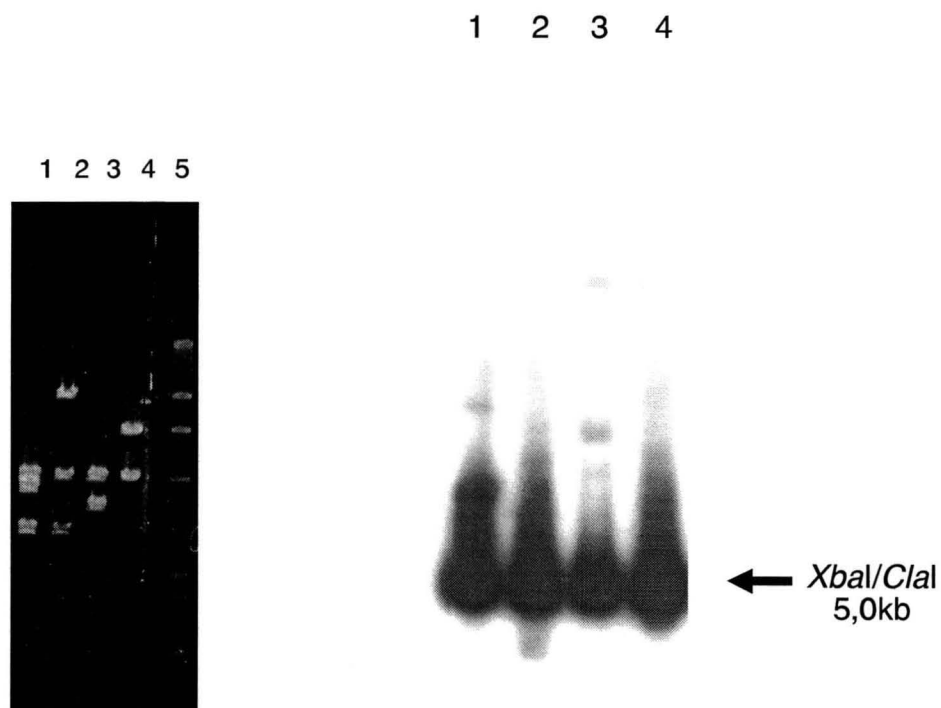


Figura 4 - (A) Eletroforese em gel de agarose 1% (tampão TAE), corado com brometo de etídio, mostrando digestão dos plasmídeos dos clones obtidos por recombinação homóloga com as enzimas *XbaI/ClaI*. Raias 1 e 2 - *SacI*; raia 3 - *EcoRI* e raia 4 - *KpnI*. Raia 5 - padrão de peso molecular correspondendo aos fragmentos de DNA do bacteriófago λ digerido com *HindIII* (23,1kb; 9,4kb; 6,5kb; 4,4kb; 2,3kb; 2,0kb). (B) Auto-radiograma correspondente ao "Southern blot" do gel hibridado com o fragmento *XbaI* de 2,0kb isolado do clone pMA95 e marcado com ^{32}P como sonda. A seta indica o fragmento *XbaI/ClaI* de 5,0 kb.

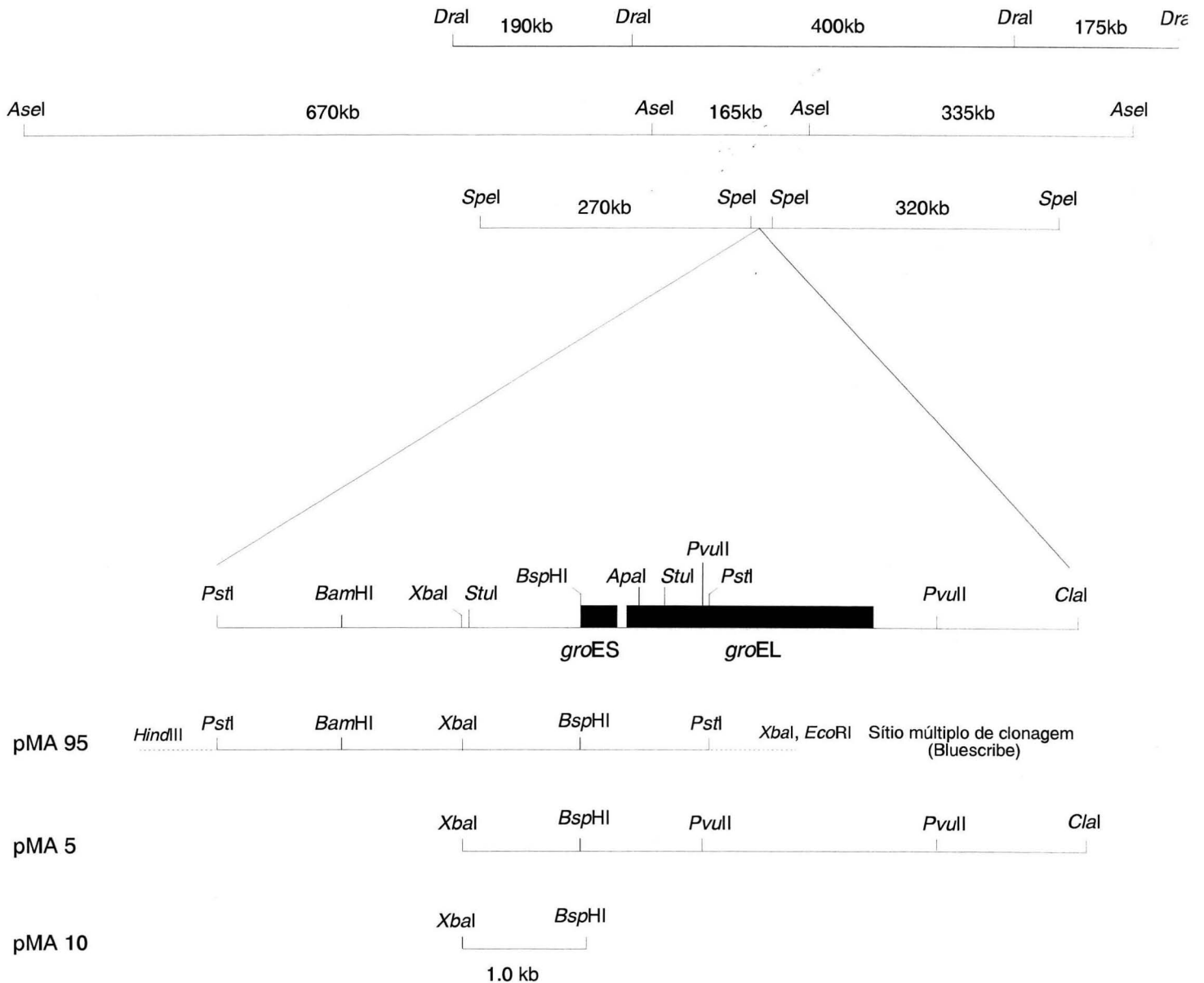


Figura 5 - Esquema representando a posição do operon *groESL* nos fragmentos *Dra*I, *Ase*I e *Spe*I do DNA genômico de *C.crescentus* e o mapa de restrição com os fragmentos do operon *groE* isolados e clonados nos plasmídeos pMA95, pMA5 e pMA10.

sequência correspondente ao gene *groEL*. A partir deste clone foi feita uma preparação de RF em gradiente de CsCl para se obter subclones através do método de deleções progressivas de Hennikof (Hennikof, 1987).

Os subclones deletados obtidos foram analisados inicialmente com relação ao padrão de bases T para posterior sequência das 4 bases dos subclones de interesse. Análise através de géis de agarose também foi feita selecionando-se os subclones que apresentavam tamanho entre o vetor M13mp19 sem inserto e um determinado subclone deletado já identificado. O sequenciamento através de subclones deletados e também com o uso oligonucleotídeos sintéticos permitiu a leitura de aproximadamente 1,3kb do clone pMA95. A sequência obtida mostrou que o clone continha o gene *groES*, parte do gene *groEL* e 1,0kb a 5' de *groES*.

O sequenciamento do restante do gene *groEL* de *Caulobacter*, obtido do clone pMA5, foi feito a partir do fragmento *PvuII* de 1,5kb (Fig.5) que hibridou com a porção 3' do gene *groEL* de *E.coli*. Este fragmento foi subclonado no vetor Bluescript KS digerido com *EcoRV* (gera extremidade do tipo aparada) compatível com o sítio *PvuII*. O clone contendo o fragmento *PvuII* de 1,5kb, teve seu plasmídeo isolado e digerido com *EcoRI/HindIII*, enzimas cujos sítios estão presentes no sítio múltiplo de clonagem do vetor M13. O fragmento *EcoRI/HindIII* isolado foi ligado tanto ao M13mp18 quanto ao M13mp19 permitindo seu sequenciamento nas duas orientações. As sequências obtidas que corresponderam a *groEL* de *Caulobacter* mostraram sobreposição com o final da sequência já determinada a partir do clone pMA95 e se estenderam cerca de 300pb no sentido 3' do gene. Essa sobreposição foi importante pois garantiu a união entre as duas sequências. O sequenciamento desse fragmento foi feito utilizando-se oligonucleotídeos sintéticos como iniciadores das reações. A Fig.5 mostra o mapa de restrição dos genes *groE* bem como sua posição no genoma de *Caulobacter*. Para isto o DNA cromossomal de *C.crescentus* foi digerido com enzimas cujos sítios são pouco presentes no genoma (*DraI*, *SpeI* e *AseI*) e os fragmentos de DNA obtidos foram resolvidos em eletroforese de campo pulsado (PFGE). O "Southern blot" deste gel foi hibridado com o inserto *XbaI* de 2,0kb do clone pMA95 marcado com ³²P. O auto-radiograma do filtro mostrou que a sonda hibridou com o fragmento *DraI* de 400kb, *AseI* de 165kb e um fragmento menor do que 50kb da digestão com *SpeI*. Estes resultados indicam que os genes *groESL* estão localizados próximo à posição 1100 do mapa físico de *C.crescentus* (Ely, 1991). A sequência completa do operon *groESL* de *Caulobacter* está mostrada na Fig.6. Nota-se duas repetições invertidas nesta sequência. Uma a 5' de *groES* muito semelhante a repetições invertidas presentes a 5' de certos genes de choque térmico em várias

bactérias e recentemente denominada CIRCE (Zuber e Schumann, 1994) por estar envolvida na regulação destes genes (Tabela 1). A outra repetição invertida está localizada a 3' de *groEL* e pode ser um sinal de terminação de transcrição.

Tabela 1 - Repetição invertida na região 5' do operon *groESL* de *C. crescentus*

<i>C.crescentus</i>	GTTGGCACTCG-N ₇ -CGACTGCTAAC
Consenso*	TTAGCACTC -N ₉ - GAGTGCTAA

* Sequência consenso do elemento CIRCE obtido de Hecker *et al.* (1996)

A sequência de aminoácidos de GroES e de GroEL, deduzidas a partir dos genes sequenciados está mostrada na Fig.7, em comparação com sequências de GroES e GroEL de outras bactérias. As proteínas GroES e GroEL deduzidas a partir da sequência de nucleotídeos obtida apresentam 44% e 70% de identidade com as proteínas correspondentes de *E.coli* (Hemmingsen *et al.*, 1988), respectivamente. O maior grau de identidade obtido por comparação com proteínas de outras bactérias foi de 71% com *Brucella abortus* (Lin *et al.*, 1992) no caso de GroES e de 76% para GroEL comparada com *Rhizobium meliloti* (Rusanganwa e Gupta, 1993).

2 - Análise do padrão de expressão de *groES* e *groEL* através de "Northern blot".

O RNA total de células de *C.crescentus* crescidas a 30°C ou submetidas a tratamento por choque térmico a 42°C por diferentes tempos foi isolado e analisado através de "Northern blots". A hibridação foi feita com o fragmento *XbaI* de 2,0kb do clone pMA95 contendo o gene *groES* e parte do gene *groEL* marcado com ³²P como sonda. Essa análise permitiu a determinação de um único mRNA hibridando com os dois genes, correspondendo a aproximadamente 2,3 kb (Fig. 8a), suficiente para codificar tanto GroES quanto GroEL, indicando que os dois genes formam um operon como em *E.coli* e outras bactérias. Esta determinação foi feita utilizando-se marcador de peso molecular de RNA 9,0-0,24kb (BRL). O "Northern blot" mostra também que a indução dos genes *groES* e *groEL* pelo choque térmico ocorre rapidamente. Aos 5 min. de exposição temos um grande aumento nos níveis que continuam aumentando aos 20 min., (Fig. 8a) diferentemente do observado com o operon de choque térmico, *dnaKJ* de *C.crescentus*, cujos níveis de mRNA começam a decrescer após 15 min. de

indução (Gomes *et al.*, 1990). O gráfico mostrado na Fig.8b indica um aumento da ordem de 50 vezes nos níveis de transcrição de *groEL*. Foram também analisados RNAs de células submetidas a tempos mais longos de choque térmico com o objetivo de se verificar a transitoriedade da resposta. Os RNAs utilizados neste experimento foram obtidos de células incubadas a 40°C por 15, 45, 90 e 120 min. (não mostrado). Estes resultados também indicaram altos níveis de mRNA em células mantidas por 120min. a 40°C.

Com o objetivo de se verificar possíveis variações nos níveis do RNA mensageiro transcrito durante o ciclo celular, o RNA total de células sincronizadas de *Caulobacter* correspondentes aos tempos 0, 45, 90, 135 e 180 minutos do ciclo celular foram isolados (Fig.9) e analisados em "Northern blots". O isolamento de RNA do ponto zero correspondendo às células móveis foi feito mantendo-se as células sempre a 4°C. Este cuidado impede que estas células sejam submetidas ao efeito de choque térmico no momento em que são transferidas de 4°C para 30°C para iniciar-se o ciclo celular, permitindo uma análise mais precisa desse resultado. O padrão observado apresentou um ponto máximo de síntese do mRNA no tempo 135min., correspondendo às células do tipo prédivisional, o que coincide com o pico de síntese de GroEL determinado anteriormente (Gomes *et al.*, 1986), indicando um controle a nível de transcrição para este gene.

3 - Análise do acúmulo de GroEL através de "Western blot".

Este tipo de análise teve por objetivo a determinação das quantidades totais de GroEL nos diferentes tipos celulares. Extratos totais de células de diferentes fases do ciclo celular de *Caulobacter*, correspondentes aos tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min., foram preparados e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS. A análise através de "Western blots" foi feita utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-HSP 60 (Sigma) diluído 1/100. A revelação foi feita com anti-IgG de camundongo conjugado com fosfatase alcalina. O resultado obtido (Fig.10a) mostrou uma pequena variação nos níveis da proteína GroEL ao longo do ciclo celular, sendo os tempos 60 e 120 minutos, respectivamente, os pontos de mínimo e máximo acúmulo da proteína, coincidindo com o padrão de acúmulo do RNA *groESL*. O mesmo tipo de análise foi feito com extratos totais obtidos a partir uma população mista de células crescidas a 30°C e submetidas a choque térmico a 40°C por 5, 10, 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min.. A Fig.10b mostra o acúmulo da proteína até 60 minutos depois do choque térmico, com aumento da ordem de 5 vezes nos níveis

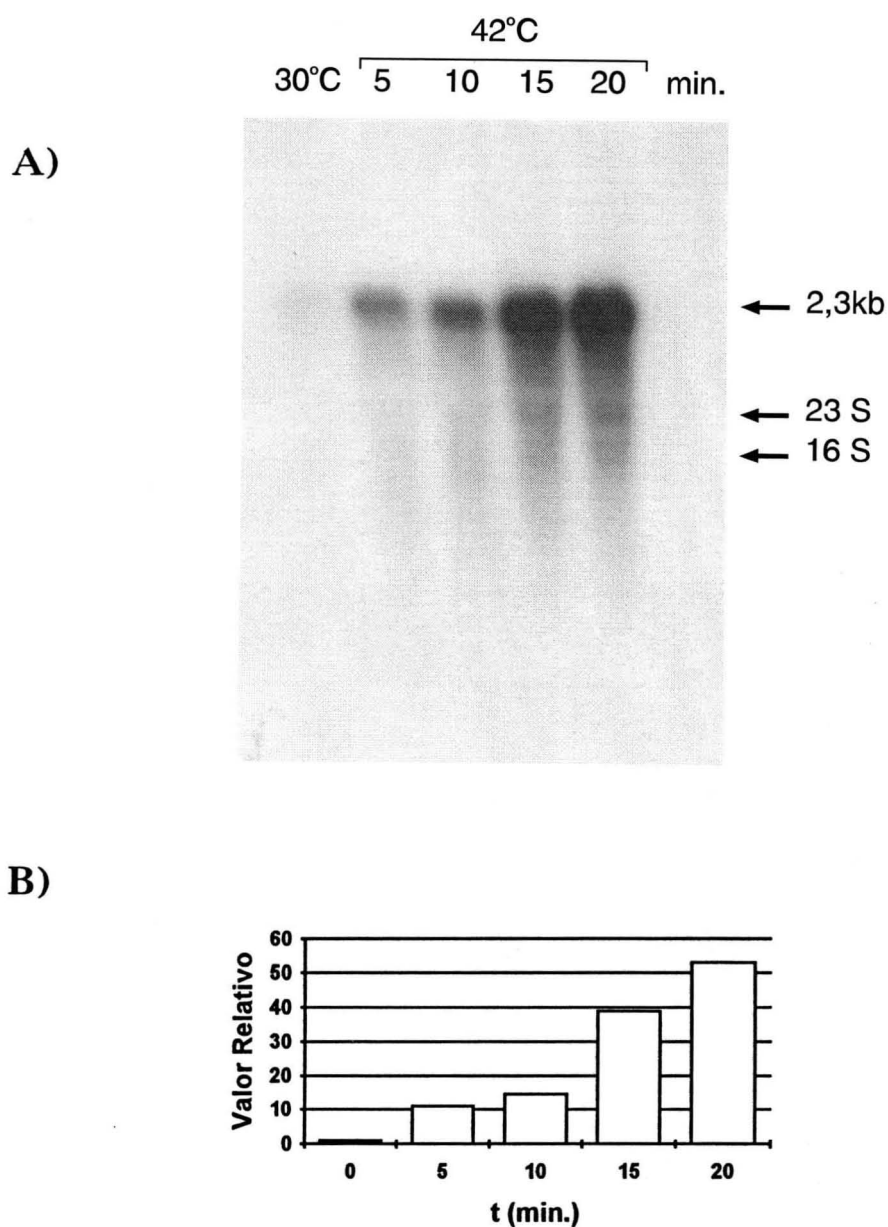
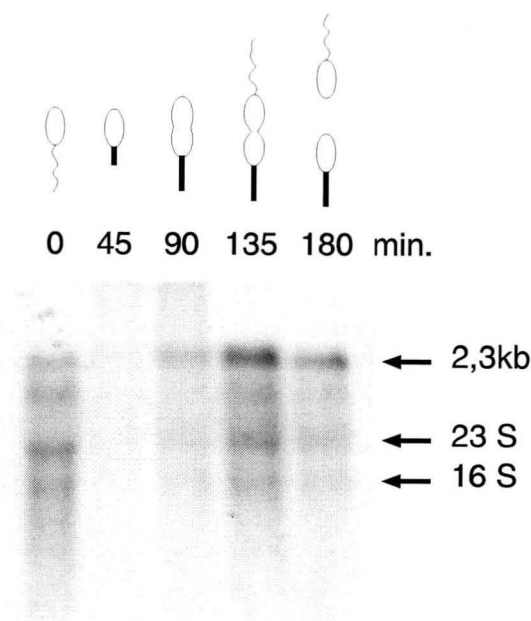


Figura 8 - (A) Auto-radiograma correspondente ao "Northern blot" de RNA total isolado de células de *Caulobacter* da cepa selvagem NA1000 incubadas a 30°C ou tratadas com choque térmico a 42°C por 5, 10, 15 e 20 minutos, hibridado com o fragmento *Xba*I de 2,0kb do clone pMA95 marcado com ^{32}P como sonda. (B) Gráfico obtido a partir da densitometria do auto-radiograma mostrado em (A). As quantidades de RNA foram normalizadas pela densitometria das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais (23S e 16S) visualizados por incubação do gel com brometo de etídeo e luz ultravioleta.

A)



B)

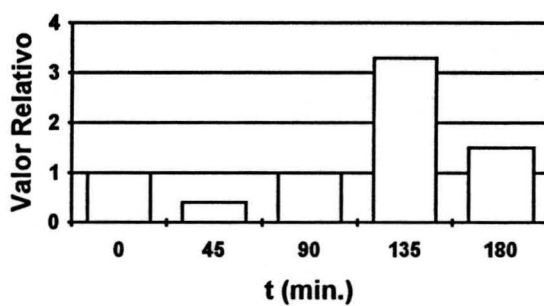


Figura 9 - (A) Auto-radiograma correspondente ao "Northern blot" contendo RNA total isolado de células sincronizadas de *Caulobacter* da cepa selvagem NA1000 incubadas a 30°C, hibridado com o fragmento *Xba*I de 2,0kb do clone pMA95 marcado com ^{32}P como sonda. Os tipos celulares predominantes em cada ponto do ciclo celular estão representados acima da canaleta correspondente. (B) Gráfico obtido a partir da densitometria do auto-radiograma mostrado em (A). As quantidades de RNA foram normalizadas pela densitometria das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais visualizados por incubação do gel com brometo de etídeo e luz ultravioleta.

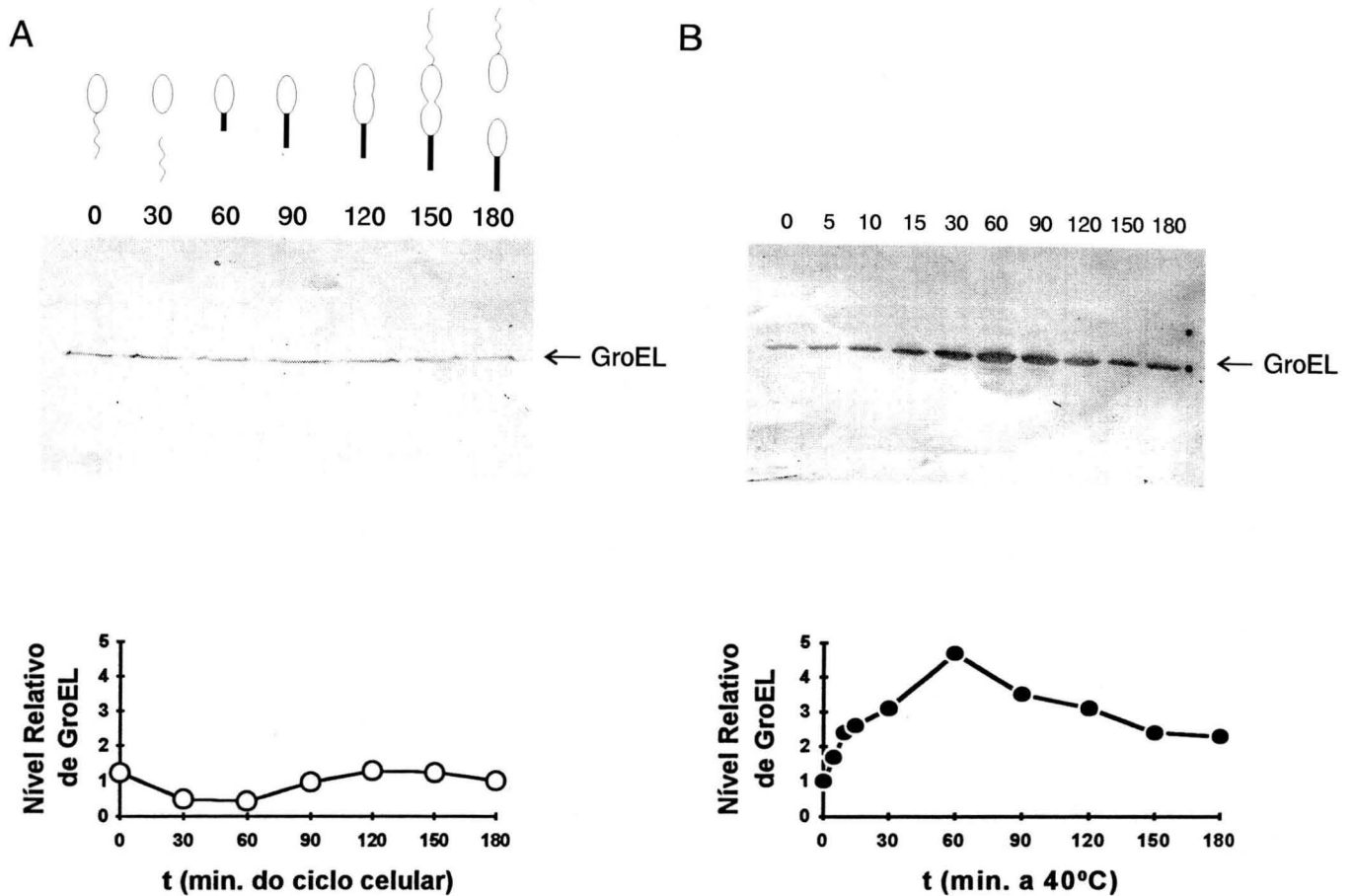


Figura 10 - Análise do acúmulo de GroEL durante o ciclo celular de *C. crescentus* (A) e após choque térmico (B). As proteínas totais de células das diferentes fases do ciclo celular e de diferentes tempos após choque térmico a 40°C foram resolvidas em SDS-PAGE, transferidas para nitrocelulose, incubadas com anticorpo monoclonal anti-HSP 60 (Sigma) e reveladas com anti-IgG de camundongo conjugado à fosfatase alcalina. Os gráficos mostrando os níveis relativos de GroEL, obtidos por densitometria, estão mostrados abaixo do "blot" correspondente.

de GroEL, comparado com os níveis a 30°C. Aos 90 min. após o choque térmico os níveis são mais baixos que após 60 min., porém mesmo após 180 min. de tratamento os níveis ainda são cerca de 2,5 vezes mais altos do que a 30°C.

4 - Determinação dos inícios de transcrição do operon *groESL*.

Os inícios de transcrição foram determinados por experimentos de extensão de oligonucleotídeo sintético, utilizando-se RNA total de células crescidas a 30°C ou submetidas a tratamento por choque térmico a diferentes temperaturas: 40, 42 e 46°C por 15 min. (Fig.11b). Os resultados obtidos indicam uma mudança nos sítios usados para início da transcrição de *groESL*, quando as células são submetidas a um aumento na temperatura de incubação. Foram identificados 2 inícios de transcrição (-119 e -88) em células crescendo a 30°C e os promotores responsáveis por estes inícios foram denominados P1 e P2, respectivamente. Ocorre uma diminuição de transcrição a partir de P1 e um aumento marcante a partir de P2 durante o choque térmico. O terceiro sinal obtido ocorre somente em células submetidas a choque térmico (-63) e está na região correspondente à repetição invertida ou elemento CIRCE (Fig.11c), que pode formar uma estrutura em alça e talvez cause uma parada prematura da transcriptase reversa.

Os inícios de transcrição também foram determinados para as células incubadas a 40°C por 15, 45, e 120 min. (Fig.11a). Os níveis de transcrição obtidos destas amostras permanecem aumentados com relação a células controle crescidas a 30°C, mesmo após 120min., ainda que a níveis mais baixos do que após 45 minutos. As sequências próximas aos inícios de transcrição correspondentes às regiões -10 e -35, características dos promotores de procaríotos, foram identificadas por comparação com sequências consenso e estão destacadas na Fig.10c. De acordo com estas sequências e com os resultados obtidos das análises de início de transcrição, os promotores P1 e P2 podem ser considerados ativos a temperatura normal de crescimento de *Caulobacter* (30°C) enquanto durante o choque térmico ocorre aumento de transcrição a partir de P2, cujas sequências seguem melhor o consenso de promotores de choque térmico caracterizados em *E.coli* (Tabela 2).

5 - Estudo da região promotora do operon *groESL*.

5.1 - Construção de fusões de transcrição e ensaios de atividade do promotor.

Para se determinar as sequências regulatórias responsáveis pelo controle por choque térmico e pelo controle temporal do operon *groESL* foram obtidas fusões de transcrição entre diferentes fragmentos contendo a região promotora do operon *groESL*

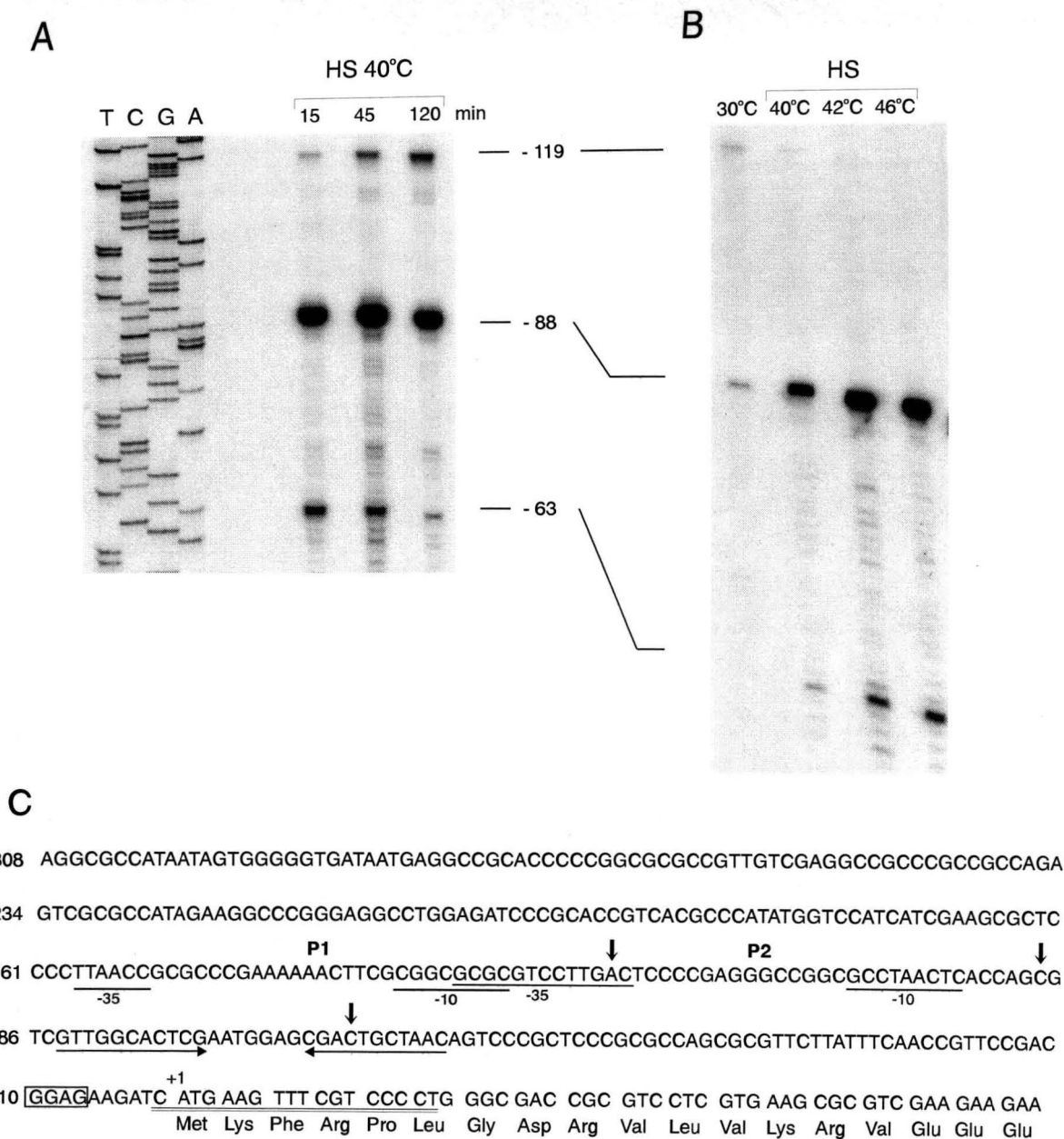


Figura 11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida/uréia mostrando a determinação dos inícios de transcrição do operon *groESL* por "primer extension". RNA total obtido de células tratadas por choque térmico a 40°C por 15, 45 e 120min. (A) ou RNA total obtido de células incubadas a 30°C ou tratadas por choque térmico a 40°C, 42°C e 46°C por 15 min. (B) foram hibridados com um oligonucleotídeo sintético complementar à sequência duplamente sublinhada em (C). As posições dos nucleotídeos correspondentes aos inícios de transcrição estão indicadas em relação ao ATG (+1) da Metionina iniciadora. As setas indicam os inícios correspondentes aos promotores P1 e P2. O terceiro sinal obtido indicado pela seta corresponde à região da repetição invertida. (C) Sequência da região promotora do operon *groE* de *Caulobacter* mostrando: os inícios de transcrição (↓), as regiões regulatórias -10 e -35 (sublinhado) dos dois prováveis promotores, a repetição invertida ou elemento CIRCE (→←), a sequência complementar ao oligonucleotídeo utilizado nos ensaios de "primer extension" (duplo sublinhado) e a sequência Shine-Dalgarno (retângulo) do gene *groES*.

Tabela 2 - Sequências promotoras de *C. crescentus* e *E. coli*

Promotor	Região (-35)	Espaçamento(pb)	Região (-10)
Consenso σ^{32} de <i>E. coli</i>	TCTC-CCCTTGAA	13-15	CCCCAT-TA
<i>E. coli</i>			
<i>groE</i> P1	TTTCCCCCTTGAA	13	CCCCATTTC
<i>dnaK</i> P1	TCTCCCCCTTGAT	14	CCCCATTTA
<i>dnaK</i> P2	TTGGGCAGTTGAA	13	CCCCTATTA
<i>C. crescentus</i>			
<i>groE</i> P2	GCGCGTCCTTGAC	15	GCCTAACTC
<i>dnaK</i> P1	TTATGGCCTTGCG	14	CCCCATATC
Consenso σ^{70} de <i>C. crescentus</i>	TTG---	16	CTA-AC^AC^C T
<i>C. crescentus</i>			
<i>groE</i> P1	TTAACC	17	CGGCGCGC
<i>dnaK</i> P2	TTGACG	15	CACAACGC

As sequências promotoras de *E. coli* foram obtidas de Cowing *et al.* (1985) and Zhou *et al.* (1988) e as de *C. crescentus*, de Gomes *et al.* (1990), Malakooti *et al.* (1992), Avedissian *et al.* (1995), e deste trabalho. Os nucleotídeos que seguem os consensos estão mostrados em negrito.

e o vetor *placZ/290* (Gober e Shapiro, 1992), de forma que o gene *lacZ*, sem o seu promotor, presente no vetor estivesse sob o controle da região regulatória de *groESL*. A construção inicial obtida continha o fragmento *XbaI/BspHI* de 1,0kb (Fig.12), devendo apresentar todas as sequências necessárias para o controle por choque térmico e pelo ciclo celular. Este fragmento foi primeiramente isolado do clone pMA95 e subclonado no vetor pUCBM20 digerido com *XbaI* e *NcoI* (que possui sítio de restrição compatível com *BspHI*). Em seguida, o fragmento foi isolado digerindo-se o vetor com *EcoRI* e *HindIII*, garantindo-se dessa forma a orientação correta para ligação no vetor *placZ/290*. Esta construção, denominada pMA10, foi transferida para *Caulobacter* por conjugação com *E.coli* carregando o plasmídeo e os conjugantes obtidos ensaiados para atividade de β -galactosidase. O isolamento de fragmentos específicos da região promotora, usados nas construções pMA11 a pMA18, foi feito através de reações de PCR (Fig.12). Os diferentes fragmentos isolados continham deleções progressivas na porção 5' da região regulatória (pMA11, 13, 17 e 18). A clonagem destes fragmentos no vetor *placZ/290* foi feita sempre utilizando-se os sítios para enzimas *EcoRI* a 5' e *HindIII* a 3' do fragmento isolado. Esses sítios estavam presentes nos oligonucleotídeos usados nas reações de PCR ou foram obtidos após subclonagem. A comparação dos valores de atividade nas diferentes construções mostram uma diminuição progressiva conforme as sequências a 5' do promotor são deletadas (pMA10, pMA11 e pMA13, pMA17 e pMA18) até a deleção do promotor P1 (pMA18), passando de um valor de 1977 unidades (pMA11) para 1124 unidades (pMA18) de β -galactosidase. A indução por choque térmico porém permanece, em todos os casos, da ordem de duas vezes.

Para se investigar o papel da repetição invertida no controle da expressão de *groESL* foram obtidas mutações sítio-dirigidas nesta região. As deleções a 5' de P2 não afetaram o controle temporal (Fig.13), indicando que as sequências em P2 ou a 3' de P2 são responsáveis pelo controle durante o ciclo celular. As reações de mutagênese sítio-dirigida foram preparadas no laboratório pela estudante de doutorado Regina L. Baldini. Os novos fragmentos contendo as mutações foram preparados a partir do fragmento correspondente ao pMA11 e apresentam substituições de 3 nucleotídeos no braço 5' da repetição invertida (pRB19), no braço 3' (pRB20) ou nos dois braços (pRB21) (Fig.14). Esses fragmentos obtidos por mutagênese sítio-dirigida, conforme descrito em Materiais e Métodos, foram isolados e digeridos com as enzimas adequadas para ligação ao vetor *placZ/290* na orientação correta. Estas mutações foram feitas para se estudar o papel da alça que pode formar-se devido à repetição invertida alterando sua sequência impedindo o pareamento dos braços (pRB19 e 20) ou refazendo a estrutura com outra sequência (pRB21) e mostraram um aumento na

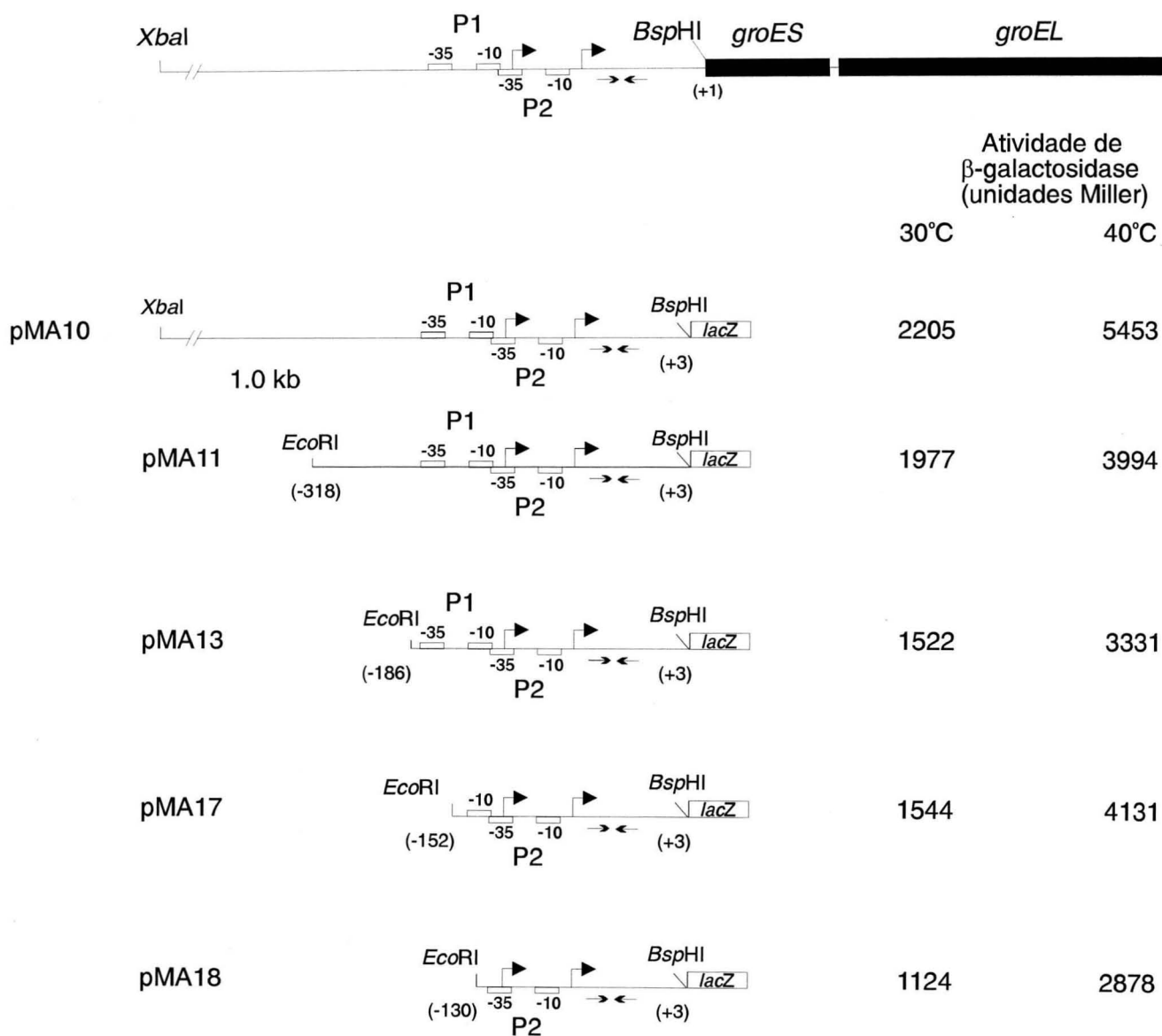


Figura 12 - Esquema mostrando os fragmentos da região regulatória do operon *groESL* utilizados nas fusões de transcrição com *placZ/290* e os respectivos valores de atividade de β -galactosidase. Os inícios de transcrição (\rightarrow) e a sequência correspondente a repetição invertida ($\rightarrow\leftarrow$) estão indicados. Ao lado estão mostrados os valores de atividade de transcrição dos fragmentos da região regulatória, obtidos através dos ensaios utilizando-se o gene da β -galactosidase como repórter de transcrição, a 30°C e após indução pelo choque térmico (40°C, 1h.).

atividade de β -galactosidase nas células crescendo a 30°C, em relação à construção pMA11 contendo o mesmo fragmento sem as mutações. Estes valores sofriam ainda um aumento nas células submetidas a choque térmico. Em pRB21, onde os dois braços foram mutados refazendo a repetição invertida com outra sequência, o aumento em relação a pMA11 foi de mais de 2 vezes a 30°C, e ainda houve um aumento de atividade após o choque térmico. Este resultado sugere que a sequência da repetição invertida, e não a formação da alça, é que é importante na regulação, controlando de forma negativa a expressão de *groESL* a temperaturas normais. A construção pRB23 contém a substituição de 4 bases na região -10 de promotor P2 e mostrou valores de atividade próximos aos valores basais do vetor sozinho indicando que o promotor P1 por si só não confere atividade de transcrição. O fragmento pRB25 corresponde a mutação do braço 5' da repetição invertida introduzida no fragmento pMA18 e apresentou o mesmo comportamento obtido comparando-se as construções pRB19 e pMA11.

5.2 - Controle temporal da expressão de *GroESL*.

O estudo do controle temporal durante o ciclo celular foi feito analisando-se fragmentos da região regulatória utilizados nas fusões de transcrição através de imunoprecipitação com anticorpo anti- β -galactosidase para se analisar a síntese de β -galactosidase em cada ponto do ciclo celular. As proteínas das células contendo diferentes construções foram marcadas com pulsos de [³⁵S]-metionina durante os tempos 0, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos do ciclo celular da bactéria, imunoprecipitadas e analisadas em gel de SDS-poliacrilamida. Os resultados obtidos mostraram que o controle temporal ainda é mantido mesmo na construção pMA18 cujo fragmento contém apenas o promotor P2 e a repetição invertida (Fig.13). A perda do controle temporal foi observada entretanto nas construções analisadas pRB19, 20 e 21, contendo mutações na repetição invertida. A Fig.15 mostra as imunoprecipitações feitas com a construção pMA11, usada como controle, e as construções pRB 19, 20 e 21 contendo as diferentes mutações na repetição invertida, permitindo a comparação entre os padrões de síntese de β -galactosidase durante o ciclo celular. O padrão observado com a construção pMA11 apresentou uma síntese máxima nos tempos 150 e 180 minutos enquanto as construções contendo os fragmentos mutados mostraram síntese constitutiva de β -galactosidase. O controle da sincronia foi feito pela imunoprecipitação de amostras dos mesmos pontos do ciclo celular com anticorpo anti-flagelina. O padrão de síntese das flagelinas obtido confirma a perfeita sincronia da cultura.

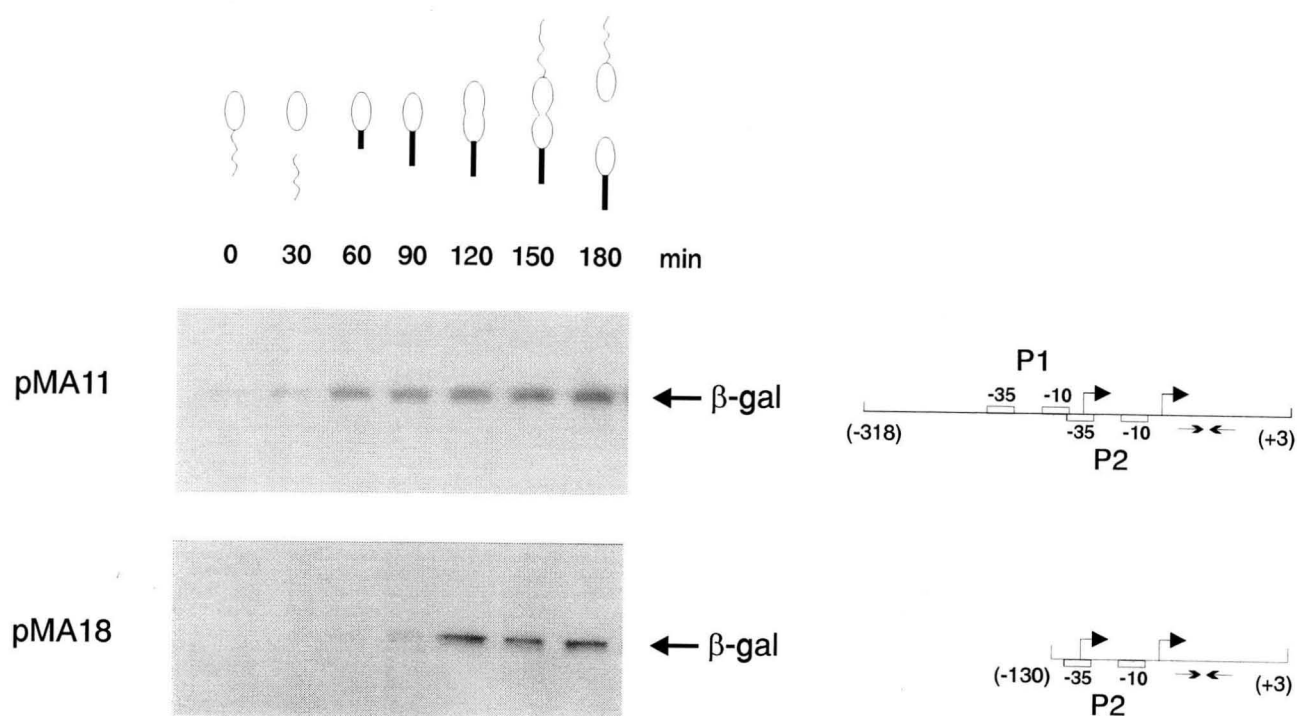


Figura 13 - Auto-radiograma dos géis de SDS-PAGE das proteínas imunoprecipitadas com anticorpo anti- β -galactosidase, de células sincronizadas da cepa selvagem NA1000 de *Caulobacter* contendo a fusão de transcrição pMA11 (controle) ou a construção pMA18, preparada eliminando-se parte da região 5' do operon *groESL* inclusive o promotor P1. Os esquemas da região promotora contida em cada construção (ao lado) e os tipos celulares predominantes em cada ponto analisado (acima) também são mostrados.

	Atividade de β -galactosidase ⁵⁴ (unidades Miller)	
	30°C	40°C
<p>pMA11</p>	1620	3105
<p>pRB19</p>	2427	2837
<p>pRB20</p>	2167	2715
<p>pRB21</p>	4425	5757
<p>pMA18</p>	1087	1901
<p>pRB25</p>	1582	1748
<p>pRB23</p>	314	366
<p>placZ/290</p>	200	-

Figura 14 - Esquema mostrando os fragmentos da região regulatória do operon *groESL* contendo as mutações sítio-dirigidas usados nas fusões de transcrição com o vetor *lacZ/290*. Ao lado estão mostrados os valores de atividade de transcrição das regiões regulatórias mutadas, obtidos através dos ensaios utilizando-se o gene da β -galactosidase como repórter de transcrição em células crescendo a 30°C e após indução pelo choque térmico por 1h a 40°C.

Controle Temporal

55

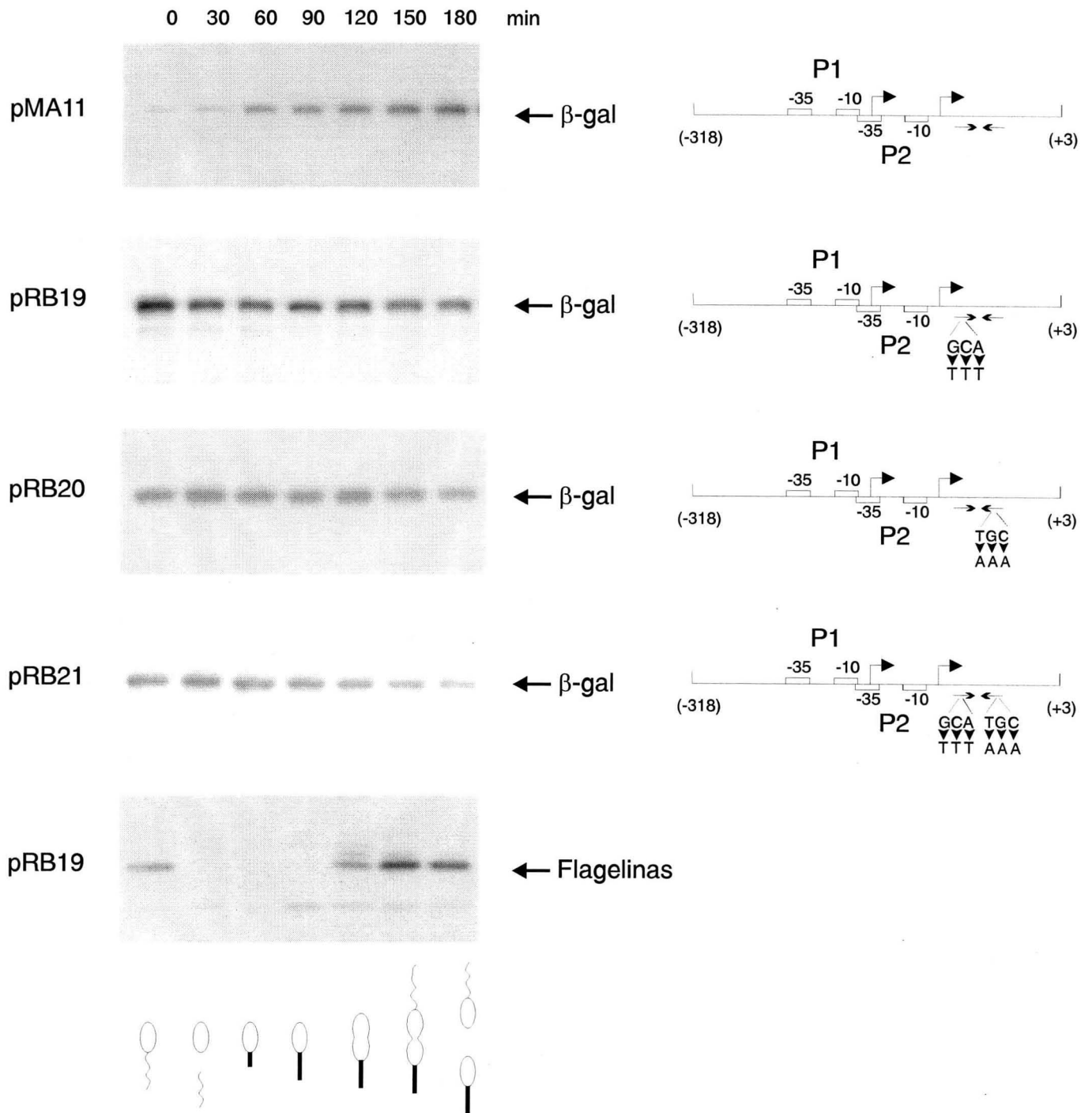


Figura 15 - Auto-radiograma dos géis de SDS-PAGE das proteínas imunoprecipitadas com anticorpo anti-β-galactosidase, de células sincronizadas da cepa selvagem NA1000 de *Caulobacter* contendo a fusão de transcrição pMA11 (controle) e as fusões pRB19, 20 e 21, preparadas com os fragmentos da região regulatória contendo as mutações sítio dirigidas na repetição invertida. O controle do ciclo celular feito com anticorpo anti-flagelinas e os esquemas da região promotora contida em cada construção também são mostrados.

6 - Análise dos níveis de transcrição de *groESL* nas cepas NA1000 selvagem e LS2293 (*hrcA*⁻).

O efeito da regulação negativa da repetição invertida (CIRCE) visto na Figura 14 foi sugerido ser devido à ligação de uma proteína a esta sequência, funcionando como um repressor (Yuan e Wong, 1995b). O gene codificando tal proteína (*hrcA*) foi recentemente isolado em *C.crescentus* e um mutante contendo este gene interrompido foi obtido (Roberts *et al.*, 1996) na cepa LS2293. Para verificar o efeito desta mutação na expressão de *groESL*, amostras de RNA total isolado tanto da cepa selvagem como da cepa *hrcA*⁻ foram analisadas em "Northern blots". Como controle, as mesmas amostras foram analisadas quanto à expressão do operon *dnaKJ*, que não possui na sua região regulatória a repetição invertida. A Fig.16 mostra os "Northern blots" dos RNAs da cepa selvagem e da cepa mutada isolados de células a 30°C ou submetidas a choque térmico hibridados com os genes *groESL* (A) ou *dnaKJ* (C) de *Caulobacter* marcados com ³²P como sonda. Os gráficos (B) e (D) correspondem a densitometria dos respectivos sinais observados nos autorradiogramas dos "Northern blots". Esta análise revelou um aumento nos níveis de RNA somente no operon *groESL* quando comparado aos níveis na cepa selvagem a 30°C, sendo que a cepa mutante ainda apresentou indução por choque térmico. Os níveis de RNA do operon *dnaKJ* não foram alterados no mutante, mostrando comportamento igual ao observado na cepa selvagem.

7 - Transitoriedade da resposta ao choque térmico.

Os experimentos de "Northern blot" (Fig.8) e de determinação de início de transcrição (Fig.11) mostraram que ao contrário do que ocorre com o operon *dnaKJ* que apresenta níveis máximos de seu transcrito após 15 min. de choque térmico e níveis bem mais baixos após 20 min. (Gomes *et al.*, 1990), *groESL* tem expressão máxima em torno de 30 min. após um aumento de temperatura, mantendo níveis elevados do mRNA até 2 horas após o choque térmico. Como o operon *groESL* possui a repetição invertida e o operon *dnaKJ* não, resolvemos investigar se mutações na repetição invertida, poderiam alterar a transitoriedade da resposta ao choque térmico de *groESL*.

Os experimentos para estudo da transitoriedade da resposta ao choque térmico do operon *groESL* em *Caulobacter* foram feitos com células de NA1000 e o mutante LS2293 (*hrcA*⁻) contendo as construções pMA11 (controle) e os mutantes na repetição invertida pRB19, 20 e 21. As células das duas cepas tiveram suas proteínas marcadas com pulsos de 2 min. com [³⁵S]-metionina a 30°C e 5, 10, 15, 30, 60, 90 e 120

minutos após choque térmico a 40°C. Os extratos destas células foram imunoprecipitados com anticorpo anti- β -galactosidase e resolvidos em gel de poliacrilamida/SDS. Os gráficos obtidos para NA1000 e LS2293 na Fig.17 correspondem a densitometria dos autorradiogramas destas imunoprecipitações, sendo os valores apresentados em função do máximo considerado como 100%. O padrão de síntese observado na cepa selvagem (Fig. 17a) mostra um rápido aumento na síntese de β -galactosidase que permanece elevada por mais tempo apenas para a construção pMA11. As construções contendo as mutações na repetição invertida também apresentaram resposta ao choque térmico, mas os níveis de síntese de β -galactosidase decrescem mais rapidamente até valores próximos ao inicial (30°C). A análise das mesmas construções na cepa mutante (Fig.17b) mostrou um comportamento semelhante entre a construção pMA11 e aquelas contendo a repetição invertida mutada.

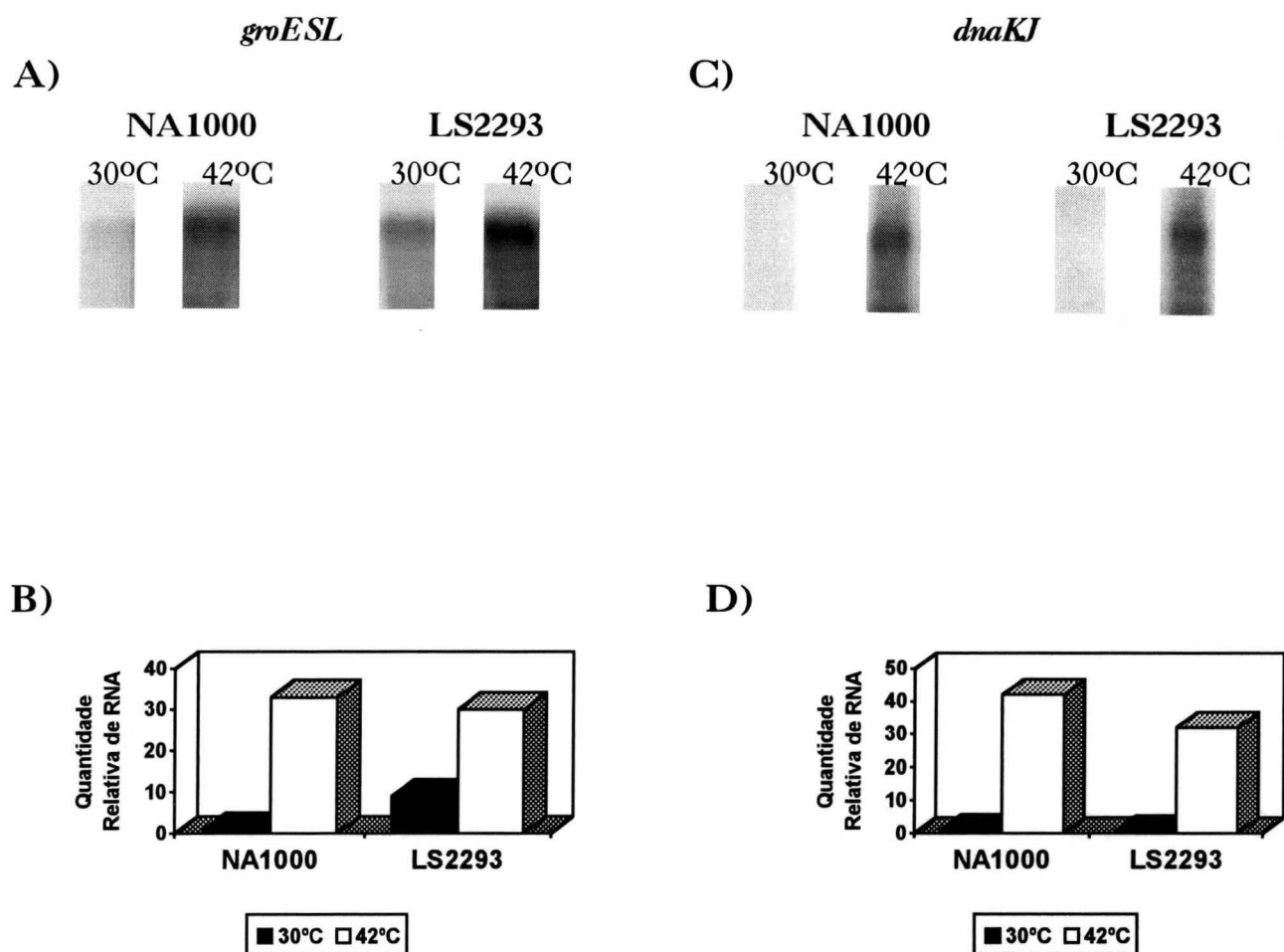
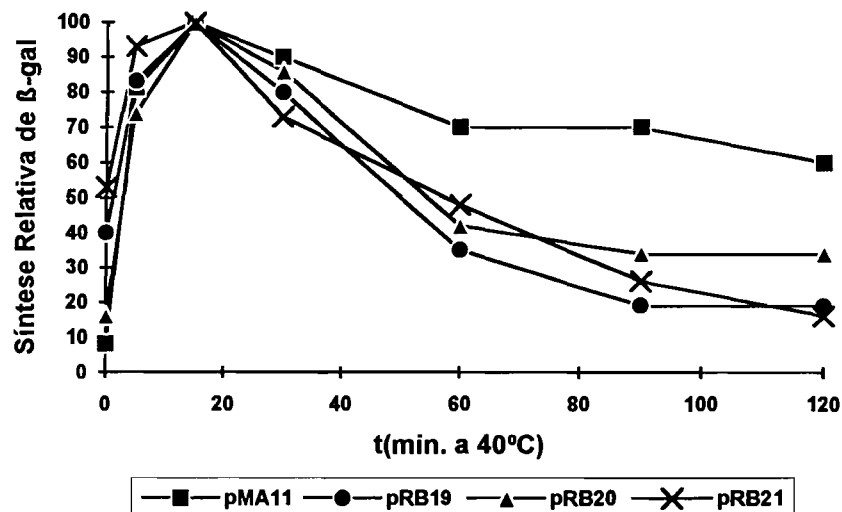


Figura 16 - Comparação entre os níveis de RNA do operon *groESL* (A) e do operon *dnaKJ* (B) em células da cepa selvagem NA1000 e do mutante LS2293 (*hrcA*⁻) sob condições normais de crescimento (30°C) e após tratamento por choque térmico a 42°C por 10 min.. Os gráficos (B) e (D) foram obtidos pela densitometria dos sinais obtidos nos “Northern blots” (A) e (C), respectivamente.

A) NA 1000



B) LS2293

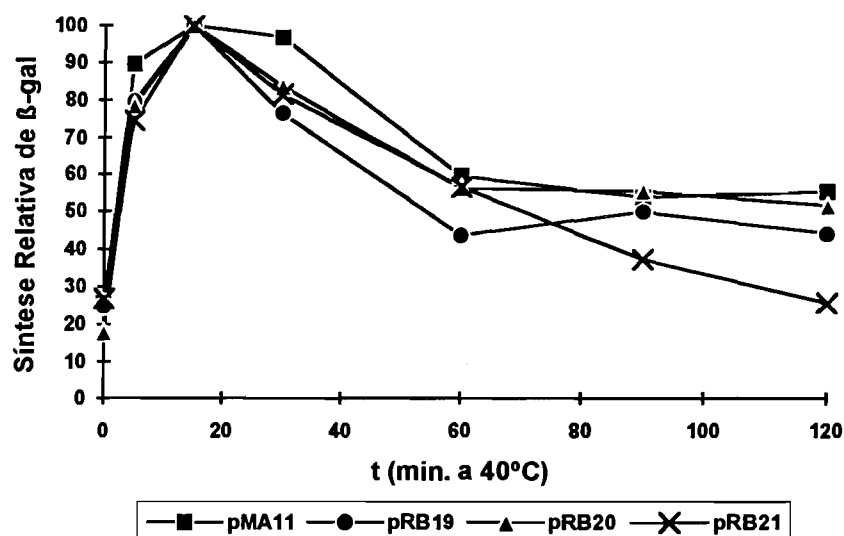


Figura 17 - Análise do efeito das mutações sítio dirigidas no elemento CIRCE na transitoriedade da resposta ao choque térmico. Os gráficos representam a síntese relativa de β -galactosidase das diferentes fusões de transcrição em células selvagens NA1000 (A) e no mutante LS2293 (*hrcA*⁻) (B) a 30°C ($t=0$) e após tratamento de choque térmico a 40°C. Os valores foram obtidos a partir da densitometria dos géis das imunoprecipitações dos extratos de células das duas cepas contendo as diferentes construções.

IV - DISCUSSÃO

Todos os organismos apresentam, em resposta a um aumento brusco na temperatura do meio ambiente, uma mudança no padrão de síntese protéica, pela indução da transcrição de um grupo específico de genes, que codificam proteínas conhecidas como Hsps e geralmente diminuindo a síntese das demais proteínas da célula. A resposta ao choque térmico tem caráter transitório sendo a síntese das Hsps regulada, principalmente, a nível transcricional porém controle a nível de tradução também já foi demonstrado (Storti *et al.*, 1980). Algumas das Hsps são essenciais à vida normal da célula, sendo por isto também sintetizadas a temperaturas normais de crescimento dos organismos. Em *Caulobacter* duas destas proteínas, DnaK e GroEL, foram identificadas e mostraram-se reguladas de forma diferencial durante o ciclo celular a 30°C. Experimentos de imunoprecipitação com anticorpos específicos contra cada uma destas proteínas mostrou que DnaK apresenta um pico de síntese na transição célula móvel-célula talo, enquanto GroEL, apresenta um máximo nas células prédivisionais (Gomes *et al.*, 1986).

A caracterização e estudo da regulação do operon *groESL* de *Caulobacter crescentus* foi iniciada através do isolamento de um clone utilizando-se o operon *groESL* *E.coli* como sonda. A análise de um banco genômico parcial de *Caulobacter* com os genes *groESL* de *E.coli*, permitiu o isolamento de um fragmento de DNA contendo a região regulatória, o gene *groES* e metade da região codificadora do gene *groEL* (clone pMA95). A utilização deste fragmento para clonagem por recombinação homóloga foi feita com o objetivo de isolar-se um fragmento de DNA de *Caulobacter* que contivesse o promotor, *groES* e a sequência completa do gene *groEL* (clone pMA5). Os dois genes e a região regulatória foram sequenciados permitindo a comparação com as sequências de genes homólogos de outros organismos. Essa análise mostrou que em *Caulobacter* *groES* e *groEL* também estão organizados na forma de um operon como demonstrado em várias bactérias. As sequências de aminoácidos deduzidas de GroES e GroEL de *Caulobacter* revelaram alto grau de similaridade com proteínas homólogas de outras bactérias, principalmente as pertencentes ao grupo α (*B.abortus* e *R.meliloti*), ao qual também pertence *C.crescentus*, concordando com a conservação funcional destas proteínas ao longo da escala evolutiva. Somente uma cópia dos genes foi identificada como na maioria dos sistemas já caracterizados, embora alguns organismos possuam duas cópias do gene *groEL* e duas do operon *groESL* identificados em *Streptomyces albus* (Guglielmi *et al.*, 1991) mas somente uma cópia de cada sendo transcrita

(Guglielmi *et al.*, 1993). Em *Rhizobium meliloti* foram identificados tres genes *groE*, sendo que dois deles precedidos por *groES* (Rusanganwa e Gupta, 1993), enquanto *Bradyrhizobium japonicum* contém quatro cópias do operon *groESL* e uma quinta cópia do gene *groEL* (Fischer *et al.*, 1993). O sequenciamento da região promotora também permitiu a identificação de uma sequência repetida invertida, capaz de formar uma alça. Esta sequência (elemento CIRCE) é importante para a regulação dos genes de choque térmico nos quais está presente (Hecker *et al.*, 1996) e, na maioria dos genes sequenciados está localizada entre o promotor (a 3' do início de transcrição) e a sequência codificadora do gene *groES*.

As análises de diferentes amostras de RNA total isolado de células de *Caulobacter* incubadas a 30°C ou submetidas a tratamento por choque térmico foram feitas através de "Northern blots". Os resultados indicaram a presença de um único mRNA de 2,3kb, sendo este tamanho suficiente para conter ambos os genes *groES* e *groEL*, confirmando a hipótese de um operon. A transcrição dos genes *groE* é altamente induzida em resposta ao choque térmico e os níveis do mRNA permanecem elevados mesmo após tempos longos após o estímulo, concordando com resultados anteriores mostrando que em *Caulobacter* a síntese de GroEL também permanece alta por períodos longos de choque térmico (Gomes *et al.*, 1986), ao contrário do que ocorre com DnaK, cuja síntese é transitória com um máximo aos 15 minutos de choque térmico. Esse padrão de resposta também ocorre em *Streptomyces albus* (Guglielmi *et al.*, 1991), um organismo que também sofre diferenciação celular, e é contrário ao caráter normal de transitoriedade da resposta ao choque térmico observado na transcrição de *groEL* em *Clostridium acetobutylicum* (Narberhaus e Bahl, 1992), *Agrobacterium tumefaciens* (Segal e Ron, 1995) ou *Escherichia coli* (Herendeen *et al.*, 1979).

À temperatura normal de crescimento de *Caulobacter*, as variações nos níveis do RNA mensageiro de *groESL* durante o ciclo celular analisadas em "Northern blots", mostraram que os níveis são máximos no tempo 135 min. do ciclo, correspondendo às células prédivisionais. O aumento nos níveis de mRNA detectado nestas células pode estar associado à atividade deste estágio do desenvolvimento, onde ocorre a montagem da maquinaria quimiotática e flagelo, processo que envolve intensa síntese protéica, bem como transporte e localização polarizada de proteínas específicas para a porção da célula prédivisional que vai dar origem à célula móvel.

O estudo da região promotora do operon *groESL* foi iniciado determinando-se os inícios de transcrição a partir de RNAs isolados de células incubadas à

temperatura normal de crescimento ou submetidas a choque térmico. Os dois inícios de transcrição identificados tiveram suas regiões -10 e -35, características dos promotores de procariotos, identificadas por comparação com sequências consenso (Gomes *et al.*, 1990; Cowing *et al.*, 1985; Malakooti *et al.*, 1995). De acordo com estas sequências e com os resultados obtidos das análises de início de transcrição, os promotores P1 e P2 podem ser considerados ativos a temperatura normal de crescimento de *Caulobacter* (30°C), enquanto durante o choque térmico ocorre aumento de transcrição somente a partir de P2, cujas sequências seguem melhor o consenso de promotores de choque térmico de *E.coli*. Os inícios de transcrição determinados com RNAs de células incubadas por tempos longos de choque térmico mostraram que os níveis de mRNA permanecem aumentados quando comparados às células controle (30°C), confirmando os resultados de "Northern blot", tendo P2 como principal promotor para transcrição sob condições de choque térmico. As regiões -10 e -35 de P2 são, respectivamente, 66% e 50% idênticas ao consenso para promotores regulados pelo σ^{32} em *E.coli*. Um gene homólogo ao σ^{32} de *E.coli* foi recentemente identificado em *Caulobacter* (Reisenauer *et al.*, 1996), sendo também detectado um polipeptídeo de 32kDa em "Western blot" utilizando-se antisoro anti- σ^{32} de *E.coli*, cuja concentração aumenta transitoriamente durante o choque térmico. Estes resultados sugerem um mecanismo de semelhante de controle do choque térmico pelo σ^{32} em *Caulobacter* e *E.coli*.

As construções preparadas com o vetor repórter de transcrição *placZ/290* contendo diferentes fragmentos da região promotora foram usados para determinação dos níveis de transcrição do promotor *groE*, determinando-se a atividade ou a síntese de β -galactosidase dirigida pelo promotor do operon *groE* de *Caulobacter*, para inferir a atividade de transcrição dos diferentes fragmentos da região regulatória. Estas análises foram importantes para os estudos envolvendo deleções e mutações no promotor, com o intuito de identificar-se as sequências responsáveis pela regulação do operon *groESL*. O fragmento presente em pMA11 possui aproximadamente 350pb e contém todos elementos regulatórios necessários, uma vez que apresentou níveis de atividade comparáveis aos obtidos com a construção pMA10 (fragmento *XbaI/BspHI* de 1,0kb) além da indução por choque térmico e controle temporal, podendo assim ser usado como controle para análise comparativa das diferentes construções realizadas. As sucessivas deleções da região 5' do promotor do operon *groE* levaram a uma diminuição na atividade de β -galactosidase sendo mantidas porém a indução pelo choque térmico e também o controle temporal durante o ciclo celular. Estes resultados indicaram que os elementos regulatórios responsáveis pelo controle temporal deveriam

estar localizados a 3' do promotor P2, o único ainda presente na maior deleção (pMA18) e com características de um promotor transcrito por σ^{32} . Outra possibilidade era que o fator fosse regulado durante o ciclo, fato que foi descartado com o isolamento e caracterização do gene para σ^{32} de *Caulobacter* (Reisenauer *et al.*, 1996). A mutação correspondente à construção pRB25 mostrou P2 como principal o promotor responsável pela expressão do operon *groESL*, uma vez que sua mutação praticamente eliminou a atividade promotora. Recentemente R.L.Baldini, em nosso laboratório, construiu duas mutações em P1 que deveriam inativar este promotor e a atividade de transcrição não foi alterada em relação ao controle pMA11, sugerindo a não existência de P1 e indicando que a transcrição a partir de P1 deva ser um artefato do ensaio de “primer extension”.

Em *B.subtilis* os operons *groE*, contendo *groES* e *groEL* (Li e Wong, 1992; Schmidt *et al.*, 1992), e *dnaK*, contendo os genes *orf39*, *grpE*, *dnaK* e *dnaJ* (Wetzstein *et al.*, 1992), apresentam o elemento CIRCE em seus promotores e sequências -10 e -35 potencialmente reguladas por um fator vegetativo - σ^A -, não contendo sequências regulatórias típicas de um promotor de choque térmico. A regulação destes genes em *B.subtilis* frente ao estresse ocorre nestes dois elementos tendo sido demonstrado o papel do elemento CIRCE (repetição invertida) como modulador negativo da transcrição (Zuber e Schumann, 1994). Recentemente o primeiro gene do operon *dnaK*, inicialmente denominado *orf39*, teve seu produto caracterizado como o fator responsável pelo controle da expressão de *groEL* e *dnaK* (Yuan e Wong, 1995b). Os resultados foram obtidos através do isolamento de mutantes para o gene *orf39* os quais apresentaram altos níveis das proteínas GroEL e DnaK, verificados em “Western blots” e puderam ser revertidos ao normal pela introdução nos mutantes de um plasmídeo contendo uma cópia funcional do gene *orf39*. Yuan e Wong (1995a), também mostraram em experimentos de “gel shift” a formação de complexos entre o produto de *orf39* e o elemento CIRCE. Este gene foi recentemente denominado *hrcA* e sua deleção completa em *B.subtilis* provoca um aumento da transcrição de *groEL* e *dnaK*, mesmo a temperaturas normais de crescimento, sendo mantida porém uma pequena indução pelo choque térmico (Schulz e Schumann, 1996).

A regulação dos genes *groEL* em *Bradyrhizobium japonicum* é um pouco mais complexa dado o número de cópias presentes neste organismo. Das 5 cópias presentes apenas os promotores dos genes *groESL1/4/5* apresentam indução por choque térmico (Babst *et al.*, 1996). O promotor *groESL1* possui sequências regulatórias consenso para regulação pelo σ^{32} , enquanto os promotores *groESL4* e *groEL5* apresentam o elemento CIRCE e sequências -10 e -35 homólogas à de promotores expressos

constitutivamente em *B.japonicum*. As diferenças dos 3 promotores induzidos por choque térmico indicam que não são regulados por um mecanismo único. O promotor *groESL2* também possui o elemento CIRCE, mas este não se mostrou funcional sendo a expressão deste gene constitutiva. Como em *B.subtilis*, *Bradyrhizobium* não apresenta os dois elementos, promotor do tipo σ^{32} e elemento CIRCE, no mesmo operon.

As mutações sítio-dirigidas introduzidas no elemento CIRCE em *Caulobacter* levaram a um aumento na atividade do promotor a 30°C, atingindo níveis comparáveis aos de choque térmico para pMA11, mas ainda apresentaram indução pelo calor. A manutenção da indução por choque térmico sugere que o promotor P2 seja o responsável pelo controle desta resposta. Este resultado concorda com o mecanismo proposto no qual um repressor, codificado pelo gene *hrcA*, se ligaria ao elemento CIRCE regulando a atividade do promotor e as mutações levariam ao aumento de transcrição devido à desrepressão do promotor. Os genes *hrcA* e *grpE* de *Caulobacter* foram identificados recentemente formando um operon, mas não ligados estruturalmente ao operon *dnaKJ* como em *B.subtilis* (Roberts *et al.*, 1996). A obtenção de um mutante por interrupção somente de *hrcA* foi possível suplementando-se *grpE* em *trans*, já que este gene é essencial para a viabilidade da célula em baixas e altas temperaturas. A expressão dos operons *groESL* e *dnaKJ* neste mutante foi analisada e somente os níveis de mRNA de *groESL* apresentaram aumento a 30°C, enquanto a expressão de *dnaKJ*, cujo promotor não contém o elemento CIRCE, não foi alterada. Indução de *groESL* ainda foi observada durante o choque térmico, mostrando que o promotor *groESL* não está completamente desreprimido, o que sugere um outro nível de controle, provavelmente pelo σ^{32} .

A análise do papel do elemento CIRCE mostrou também seu envolvimento no controle da regulação temporal durante o ciclo celular, uma vez que somente as mutações afetando este elemento, levaram à perda da regulação temporal. Os experimentos de imunoprecipitação com anticorpo anti- β -galactosidase mostraram que a região regulatória presente na construção pMA11 apresenta controle temporal durante o ciclo celular, concordando com a regulação do respectivo RNA mensageiro, verificado em "Northern blot". As construções pRB19, 20 e 21, que contêm mutações no elemento CIRCE, apresentaram comportamentos semelhantes, todas elas mostrando perda do controle temporal. Em pRB21, que contêm mutações nos dois braços da repetição invertida, refazendo uma possível estrutura de alça porém com uma sequência diferente, encontrou-se o maior aumento de atividade a 30°C nos ensaios de β -galactosidase, sugerindo um efeito aditivo das mutações introduzidas. Este resultado também sugere que a possível ligação da proteína HrcA ao elemento

CIRCE seja dependente da sequência de nucleotídeos e não da formação da estrutura secundária propriamente dita. Um possível mecanismo de ação da proteína HrcA seria sua ligação aos dois braços do elemento CIRCE, dada a sequência característica de repetição invertida deste elemento, agindo como um operador e regulando a transcrição dos genes de choque térmico onde está presente.

Em conjunto, os resultados obtidos indicaram que o elemento CIRCE e a proteína HrcA regulam negativamente a expressão de *groESL* a temperaturas normais e mutações no elemento CIRCE ou ausência de HrcA levam à perda do controle temporal, sem afetar a indução por choque térmico. Assim, em *Caulobacter*, o elemento CIRCE e HrcA regulam a expressão de *groESL* a temperaturas normais de crescimento.

Os experimentos para estudo da transitoriedade da resposta ao choque térmico do operon *groESL* em *Caulobacter* foram feitos com células do tipo selvagem NA1000 e no mutante LS2293 (que possui o gene *hrcA* interrompido) contendo as construções pMA11 (controle), pRB19, 20 e 21. As células tiveram suas proteínas marcadas com [³⁵S]-metionina seguindo-se imunoprecipitação com anticorpo anti- β -galactosidase. Os resultados obtidos revelaram que na cepa NA1000 ocorre rápido aumento na síntese de β -galactosidase que permanece elevada por longo tempo apenas para a construção pMA11. As construções contendo as mutações na repetição invertida (elemento CIRCE) também apresentaram resposta ao choque térmico mas os níveis de síntese de β -gal decrescem até valores próximos ao inicial (30°C) após 90 ou 120 minutos de tratamento. A análise comparativa do padrão de expressão de β -galactosidase destas mesmas construções no mutante LS2293 (*hrcA*⁻) mostrou comportamento semelhante entre o controle pMA11 e as construções contendo mutações na repetição invertida. Este resultado indica que a ausência de HrcA, que deve ligar-se à repetição invertida também afeta a transitoriedade da resposta alterando o padrão de expressão a partir do promotor controle, da mesma forma que as mutações sítio-dirigidas contidas nas construções pRB19, 20 e 21.

O acoplamento dos processos de transcrição e tradução faz com que o primeiro represente o principal ponto de controle da expressão gênica nos procariotos. No entanto, a regulação a nível de tradução e estabilidade do mRNA também são mecanismos importantes para a regulação gênica. Em *E.coli* a meia-vida dos mRNAs pode ser bastante variável ficando, em geral, entre 2 e 4 minutos (Emory e Belasco, 1990). Apesar da importância deste tipo de controle, os mecanismos que controlam a degradação do mRNA nos procariotos é pouco conhecido. A presença de estruturas a 5'e 3' dos mensageiros poderiam atuar como protetores contra a degradação do mRNA

(Chen *et al.*, 1988) sendo que as estruturas nas regiões 5' não traduzidas parecem ser as mais importantes para a estabilidade da mensagem. A localização da repetição invertida na região 5' do mRNA de *groESL* sugere seu envolvimento na estabilidade do mRNA transcrito. Em *B. subtilis* a meia-vida do mRNA *groE* é de 5 minutos tanto em células incubadas a temperaturas normais como em células submetidas a choque térmico. A deleção do elemento CIRCE mostrou aumento da estabilidade do mRNA alterando sua meia-vida de 5 para 17 minutos em células incubadas a 37°C (Yuan e Wong, 1995b). Em *E. coli* foi mostrado que a presença de estruturas secundárias localizadas na região 5' não traduzida do mRNA podem provocar alterações na meia-vida dos mRNAs, sendo importante a presença de uma alça posicionada 2 a 4 nucleotídeos da extremidade 5' para seu efeito de estabilização (Emory *et al.*, 1992). Em *Caulobacter*, ainda não sabemos se a presença da repetição invertida na extremidade 5' do mRNA *groE* tem algum papel na meia-vida deste RNA.

As análises através de “Western blots” permitiram a determinação do acúmulo de GroEL durante o ciclo celular de *Caulobacter* e durante o tratamento por choque térmico. Durante o ciclo o resultado obtido mostra uma pequena variação nos níveis da proteína GroEL, que coincide com o padrão observado nas análises de “Northern blot” e imunoprecipitações mostrando um aumento na síntese de GroEL na fase correspondente as células do tipo prédivisional. O mesmo tipo de análise foi feito com extratos totais obtidos a partir uma população mista de células submetidas a choque térmico, revelando o acúmulo da proteína até 60 minutos, após a indução por choque térmico, com aumento da ordem de 5 vezes nos níveis de GroEL. A partir deste ponto os níveis começam a cair atingindo um nível 2,5 vezes maior do que a 30° C após 180 minutos.

Estes resultados mostram que o acúmulo da proteína GroEL tanto durante o choque térmico quanto ao longo do ciclo celular, acompanha o padrão de expressão do mRNA correspondente, sugerindo não haver um controle a nível de tradução para a expressão deste gene.

V - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Os genes de choque térmico *groES* e *groEL* de *Caulobacter crescentus* foram clonados e sequenciados estando organizados na forma de um operon, como em diversas bactérias onde genes homólogos já foram identificados. Um único mRNA transcrito foi identificado e sua expressão mostrou ser regulada durante o ciclo celular com um máximo de expressão nas células do tipo prédivisional, padrão também observado na síntese e acúmulo de GroEL ao longo do ciclo. A indução frente ao aumento de temperatura não apresentou o padrão de transitoriedade característico da resposta de choque térmico. Os resultados obtidos mostraram altos níveis de transcrição do mRNA e síntese de GroEL mesmo 1 hora após o aumento de temperatura. O estudo da região regulatória permitiu a identificação inicial de dois possíveis promotores - P1 e P2 - dos quais somente P2 apresentou sequências regulatórias características de promotores regulados por σ^{32} . A análise de uma repetição invertida a 3' de P2, caracterizada em outras bactérias como elemento CIRCE e também envolvida na regulação de genes de choque térmico, mostrou ser necessária para a regulação temporal do operon *groESL*. A presença destes dois elementos - um promotor de choque térmico (P2) e a repetição invertida - regulando um mesmo gene não havia sido identificada, até o momento, em nenhum outro gene de choque térmico e são suficientes para a dupla regulação do operon *groESL* de *Caulobacter*, já que mutações em P1 parecem descartar sua funcionalidade. As análises de fusões de transcrição e do mutante LS2293 (*hrcA*⁻) sugerem que a regulação pelo elemento CIRCE ocorre através da ligação da proteína HrcA à repetição invertida, modulando negativamente a transcrição de *groE*. A repetição invertida também afetou a transitoriedade da resposta ao choque térmico fazendo com que os níveis de mRNA, tanto nas construções contendo mutações na repetição invertida como no mutante LS2293, diminuisse mais rapidamente após a indução pelo choque térmico.

A síntese de GroES e GroEL em *Caulobacter* também poderia ser regulada a nível de tradução ou estabilidade do mRNA, já que a repetição invertida presente na região regulatória pode formar uma estrutura secundária na porção 5' do RNA transcrito. Os estudos aqui apresentados de síntese e acúmulo de GroEL, associados aos dados recentes obtidos em nosso laboratório com fusões de tradução, que apresentaram o mesmo comportamento que as fusões de transcrição (R.L.Baldini, comunicação pessoal), parecem descartar um controle de tradução. A determinação da vida-média do mRNA transcrito tanto em células selvagem como no mutante deficiente para a proteína HrcA, assim como nas construções com mutações no

elemento CIRCE, poderão responder se HrcA ou o elemento CIRCE afetam a estabilidade deste mensageiro.

Experimentos de “gel shift”, permitindo a análise da formação de complexos DNA-proteína, poderiam indicar o tipo de interação entre a proteína HrcA e os fragmentos contendo as diferentes mutações sítio-dirigidas nos braços da repetição invertida e deverão ser realizados.

O gene codificando o σ^{32} de *Caulobacter* foi recentemente isolado e mostrou ser essencial para a viabilidade das células tanto a 18°C como 30°C. A regulação do promotor P2, caracterizado como sendo de choque térmico, pode ser investigada através da expressão de um plasmídeo multi-cópia contendo o gene σ^{32} e seu promotor aumentando os níveis do fator na célula. A análise de extratos de células em “Western blot” utilizando esta estratégia mostrou o aumento nos níveis de DnaK (Reisenauer *et al.*, 1996), cujo gene contém um promotor de choque térmico (Gomes *et al.*, 1990). Experimentos semelhantes devem ser feitos com GroEL para comprovar a sua regulação pelo σ^{32} de *Caulobacter*.

VI - BIBLIOGRAFIA

- Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W. e Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- Avedissian, M.; Lessing, D.; Gober, J.W.; Shapiro, L. e Gomes, S.L. (1995). Regulation of the *Caulobacter crescentus* *dnaKJ* operon. *J. Bacteriol.* **177**: 3479-3484.
- Babst, M.; Hennecke, H. e Fisher, H.-M. (1996). Two different mechanisms are involved in the heat-shock regulation of chaperonin gene expression in *Bradyrhizobium japonicum*. *Mol. Microbiol.* **19**: 827-839.
- Bardwell, J.C.A. e Craig, E.A. (1984). Major heat shock gene of *Drosophila* and the *Escherichia coli* heat-inducible *dnaK* gene are homologous. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 848-852.
- Benson, A.K.; Ramakrishnan, G.; Ohta, N.; Feng, J.; Ninfa, A.J e Newton, A. (1994). The *Caulobacter crescentus* FlbD protein acts at ftr sequence elements both to activate and to repress transcription of cell cycle-regulated flagellar genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 4989-4993.
- Bochkareva, E.S.; Lissin, N.M.; Flynn, G.C.; Rothman, J.E. e Girshovich, A.S. (1992). Positive cooperativity in the functioning of molecular chaperone GroEL. *J. Biol. Chem.* **267**: 6796-6800.
- Brun, Y.V.; Marczyński, G. e Shapiro, L. (1994). The expression of asymmetry during *Caulobacter* cell differentiation. *Annu. Rev. Biochem.* **63**: 419-450.
- Chandrasekhar, G.N.; Tilly, K.; Woolford, C.; Hendrix, R. e Georgopoulos, C. (1986). Purification and properties of the groES morphogenetic protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **261**: 12414-12419.
- Chen, C.-Y. A.; Beaty, J.T. Cohen, S.N. e Belasco J.G. (1988). An intercistronic stem-loop structure functions as an mRNA decay terminator necessary but insufficient for *puf* mRNA stability. *Cell* **52**: 609-619.
- Contreras, I; Shapiro, L; e Henry, S. (1978). Membrane phospholipid composition of *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **135**: 1130-1136.
- Coppo, A; Manzi, A.; Pulitzer, J.F. e Takahashi, H. (1973). Abortive bacteriophage T4 head assembly in mutants of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **76**: 61-87.

- Cowing, D.W.; Bardwell, J.C.A.; Woolford, C.; Hendrix, R.W. e Gross, C.A. (1985). Consensus sequence for *Escherichia coli* heat shock gene promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82: 2679-2683.
- Craig, E.A.; Gambill, B.D. e Nelson R.J. (1994). Heat shock proteins: Molecular chaperons of Protein Biogenesis. *Microbiol. Rev.* 57: 402-414.
- Deshaies, R.; Koch, B.; Werner-washburne, M.; Craig, E. e Schenkman, R. (1988). A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332: 800-805.
- Ely, B. (1991). Genetics of *Caulobacter crescentus*. *Meth. Enzymol.* 204: 372-384.
- Emory, S.A.; e Belasco, J.G. (1990). The *ompA* 5' untranslated RNA segment functions in *Escherichia coli* as a growth-rate-regulated mRNA stabilizer whose activity is unrelated to translational efficiency. *J. Bacteriol.* 172: 4472-4481.
- Emory, S.A.; Bouvet, P. e Belasco, J.G. (1992). A 5'-terminal stem-loop structure can stabilize mRNA in *Escherichia coli*. *Genes & Develop.* 6:135-148.
- Erickson, J.W.; Vaughn, V.; Walter, W.A.; Neidhardt, F.C. e Gross, C.A. (1987). Regulation of the promoters and transcripts of *rpoH*, the *Escherichia coli* heat shock regulatory gene. *Genes Dev.* 1: 419-432.
- Evinger, M. e Agabian, N. (1977). Envelope-associated nucleotide from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *J. Bacteriol.* 132: 294-301.
- Fayet, O.; Louarn, J. e Georgopoulos, C. (1986). Suppression of the *Escherichia coli* *dnaA46* mutation by amplification of the *groES* and *groEL* genes. *Mol. Gen. Genet.* 202: 435-445.
- Feinberg, A. e Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
- Figurski, D.H. e Helinski, F.R. (1979). Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 1648-1652.
- Fischer, H.M.; Babst, M.; Kaspar, T.; Acuña, G.; Arigoni, F. e Hennecke, H. (1993). One member of a *groESL*-like chaperonin multigene family in *Bradyrhizobium japonicum* is co-regulated with symbiotic nitrogen fixation genes. *The EMBO J.* 12: 2901-2912.
- Flynn, G.C.; Chappel, T.G. e Rothman, J.E. (1989). Peptide binding and release by proteins implicated as catalysts of protein assembly. *Science* 254: 385-390.

- Georgopoulos, C. (1992). The emergence of the chaperon machines. *Trends Biochem. Sci.* **17**: 294-299.
- Georgopoulos, C.P.; Hendrix, R.W.; Casjens, S.R. e Kaiser, A.D. (1973). Host participation in bacteriophage lambda head assembly. *J. Mol Biol.* **76**: 45-60.
- Georgopoulos, C.P.; Hendrix, R.W.; Kaiser, A.D. e Wood, W.B. (1972). Role of the host cell in bacteriophage morphogenesis: Effects of a bacterial mutation on T4 head assembly. *Nature New Biol.* **239**: 38-42.
- Gober, J.W. e Shapiro, L. (1992). A developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3'enhancer and IHF binding elements. *Mol. Biol. Cell* **3**: 913-926.
- Gober, J.W. e Marques, M.V. (1995). Regulation of cellular differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Microbiol. Rev.* **59**: 31-47.
- Gomes, S.L.; Juliani, M.H.; Maia, J.C.C. e Silva, A.M. (1986). Heat shock protein synthesis during development in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **168**: 923-930.
- Gomes, S.L.; Gober, J.W. e Shapiro, L. (1990). Expression of the *Caulobacter* heat shock gene *dnaK* is developmentally controlled during growth at normal temperature. *J. Bacteriol.* **172**: 3051-3059.
- Graves, M.C. e Rabinowitz, J.C. (1986). *In vivo* and *in vitro* transcription of the *Clostridium pasteurianum* ferredoxin gene. *J. Biol. Chem.* **261**: 11409-11415.
- Grossman, A.D.; Erickson, J.W. e Gross, C.A. (1984). The *htpR* gene product of *E. coli* is a sigma factor of heat-shock promoters. *Cell* **38**: 383-390.
- Guglielmi, G; Mazodier, P., Thompson, C.J. e Davies, J. (1991). A survey of the heat shock response in four *Streptomyces* species reveals two *groEL*-like genes and three Groel-like proteins in *Streptomyces albus*. *J. Bacteriol.* **173**: 7374-7381.
- Guglielmi, G; Duchêne, A.-M; Thompson, C. e Mazodier, P. (1993). Transcriptional analysis of two different *Streptomyces albus groEL*-like genes. Em "*Industrial Microorganisms: Basic and applied Molecular Genetics*" (Eds: Baltz, R. H.; Hegwman, G. D. e Skatrud, P. L.) pg 17-24, Am. Soc. Microbiol., Washington D.C.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580.
- Hawley, D.K. e McClure, W.R. (1983). Compilation and analysis of the *Escherichia coli* promoter DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* **11**: 2237-2255.

- Hecker, M.; Schumann, W. e Völker, U. (1996). Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **19**: 417-428.
- Helmann, J.D. e Chamberlin, M.J. (1987). DNA sequence analysis suggests that expression of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is controlled by an alternative σ factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 6422-6424.
- Hemmingsen, S.M.; Woolford, C.; van der Vies, S.M.; Tilly, K.; Dennis, D.T.; Georgopoulos, C.P.; Hendrix, R.W. e Ellis, R.J. (1988). Homologous plant and bacterial proteins chaperon oligomeric protein assembly. *Nature* **333**: 330-334.
- Hendrix, R.W. (1979). Purification and properties of GroE, a host protein involved in bacteriophage assembly. *J. Mol. Biol.* **129**: 375-392.
- Henikoff, S. (1987). Unidirectional digestion with exonuclease III in DNA sequence analysis. *Meth. Enzimol.* **155**: 156-165.
- Higgins, D.G. e Sharp, P.M. (1988). CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignments on a microcomputer. *Gene* **73**: 237-244.
- Herendeen, S.L.; Van Bogelen, R.A. e Neidhart, F.C. (1979). Levels of major proteins of *Escherichia coli* during growth at different temperatures. *J. Bacteriol.* **139**: 185-194.
- Hocking, S.M., e Egan, J.B. (1982). Genetic studies of coliphage 186. I. Genes associated with phage morphogenesis. *J. Virol.* **44**: 1056-1067.
- Hohn, T.; Hohn, B.; Engel, A.; Wurtz, M. e Smith, P.R. (1979). Isolation and characterization of the host protein GroE involved in bacteriophage lambda assembly. *J. Mol. Biol.* **129**: 359-373.
- Jenkins, A.J.; March, J.B.; Oliver, I.R. e Masters, M. (1986). A DNA fragment containing the *groE* genes can suppress mutations in the *Escherichia coli dnaA* gene. *Mol. Gen. Genet.* **202**: 446-454.
- Kawasaki, Y.; Wada, C. e Yura, T. (1990). Roles of *Escherichia coli* heat shock proteins DnaK, DnaJ and GrpE in mini-F plasmid replication. *Ann. Rev. Cell. Biol.* **1**, 225-259.
- Kunkel, T.A.; Roberts, J.D. e Zakour, R.A. (1987). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Methods Enzymol.* **154**: 367-382.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **226**: 680-685.

- Laminet, A.A.; Ziegelhoffer, T.; Georgopoulos, C. e Plückthun, A. (1990). The *Escherichia coli* heat shock proteins GroEL and GroES modulate the folding of the beta-lactamase precursor. *The EMBO J.* 9: 2315-2319.
- Landick, R.; Vaughn, V.; Lou, E.T.; VanBogelen, R.A.; Erickson, J.W. e Neidhardt, F.C. (1984). Nucleotide sequence of the heat shock regulatory gene of *Escherichia coli* suggests its protein product may be a transcription factor. *Cell* 38: 175-182.
- Larson, J.S.; Schuetz, T.J. e Kingston, R.E. (1988). Activation in vitro of sequence specific DNA binding by a human regulatory factor. *Nature* 335: 372-375.
- Li, M. e Wong, S. (1992). Cloning and characterization of the *groESL* operon from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 174: 3981-3992.
- Lin, J.; Adams, L.G.; e Ficht, T.A. (1992). Characterization of the heat shock response in *Brucella abortus* and isolation of the genes encoding the GroE heat shock proteins. *Infect Immun.* 60: 2425-2431.
- Lindquist, S. e Craig, E.A. (1988). The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.* 22: 631-677.
- Malakooti, J.; Wang, S.P. e Ely, B. (1995). A consensus promoter sequence for *Caulobacter crescentus* genes involved in biosynthetic and housekeeping functions. *J. Bacteriol.* 177: 4372-4376.
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F. e Sambrook, J (1982). Molecular cloning - A laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Martin, J.; Langer, T.; Boteva, R.; Schramel, A.; Horwich, A.L.; e Hartl, F.-Ulrich (1991). Chaperonin-mediated protein folding at the surface of groEL through a 'molten-globule'-like intermediate. *Nature* 352: 36-42.
- Mendoza, J.A.; Rogers, E.; Lorimer, G.H. e Horowitz, P.M. (1991). Chaperonins facilitate the *in vitro* folding of monomeric mitochondrial rhodanese. *J. Biol. Chem.* 266:13044-13049.
- Mivechi, N.F.; Murai, T. e Hahn, G.M. (1994). Inhibitors of tyrosine and Ser/Thr phosphatases modulate the heat shock response. *J. Cel. Biochem.* 54: 186-197.
- Naberhaus, F. e Bahl, H. (1992). Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *groESL* operon of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* 174: 3282-3289.
- Phillips, G.J. e Silhavy, T.J. (1990). Heat-shock proteins DnaK and GroEL facilitate export of LacZ hybrid proteins in *E.coli*. *Nature* 344: 882-884.

- Quon, K.C.; Marczynski, G.T. e Shapiro, L. (1996). Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell* **84**: 83-93.
- Rabindran, S.K.; Haroun, R.I.; Clos, J.; Wisniewski, J. e WU, C. (1993). Regulation of heat shock factor trimerization: Role of a conserved leucine zipper. *Science* **259**: 230-235.
- Reisenauer, A.; Mohr, C.D. e Shapiro, L. (1996). Regulation of a heat shock σ^{32} homolog in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **178**: 1829-1841.
- Roberts, R.C.; Toochinda, C.; Avedissian, M.; Baldini, R.L.; Gomes, S.L. e Shapiro, L. (1996). Identification of a *Caulobacter crescentus* operon encoding *hrcA* involved in negatively regulating heat-inducible transcription, and the chaperon gene *grpE*. *J. Bacteriol.* **178**: 1919-1927.
- Rusanganwa, E. e Gupta, R.S. (1993). Cloning and characterization of multiple *groEL* chaperonin-encoding genes in *Rhizobium meliloti*. *Gene* **126**: 67-75.
- Sanger, F.; Nicklen, S. e Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **74**: 5463-5467.
- Sarge, K.D.; Murphy, S.P. e Morimoto, R.I. (1993). Activation of heat shock gene transcription by heat shock factor-1 involves oligomerization, acquisition of DNA binding activity, and nuclear localization and can occur in the absence of stress. *Mol. Cell. Biol.* **13**: 1393-1407.
- Schmidt, A.; Schiesswohl, M.; Völker, U.; Hecker, M. e Schumann, W. (1992). Cloning, sequencing, mapping and transcriptional analysis of the *groESL* operon from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**: 3993-3999.
- Schulz, A. e Schumann, W. (1996). *hrcA*, the first gene of the *Bacillus subtilis* dnaK operon encodes a negative regulator of class I heat shock genes. *J. Bacteriol.* **178**: 1088-1093.
- Segal, G. e Ron, E.Z. (1993) Heat shock transcription of the *groESL* operon of *Agrobacterium tumefaciens* may involve a hairpin-loop structure. *J. Bacteriol.* **175**: 3083-3088.
- Segal, G. e Ron, E.Z. (1995) The *groESL* operon of *Agrobacterium tumefaciens*: Evidence for heat shock-dependent mRNA cleavage. *J. Bacteriol.* **177**: 750-757.
- Simon, R.; Prierer, U. e Pühler, A. (1983). A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology* **1**: 784-790.

- Stephens, C.M. e Shapiro, L. (1993). An unusual promoter controls cell-cycle regulation and dependence on DNA replication of the *Caulobacter flhM* early flagellar operon. *Mol. Microbiol.* 9: 1169-1179.
- Storti, R.V.; Scott, M.P.; Rich, A. e Pardue, M.L. (1980). Translational control of protein synthesis in response to heat shock in *D.melanogaster* cells. *Cell* 22: 825-834.
- Straus, D.; Walter, W. e Gross, C.A. (1990). DnaK, DnaJ and GrpE heat shock proteins negatively regulate heat shock gene expression by controlling the synthesis and stability of σ^{32} . *Genes & Develop.* 4: 2202-2209.
- Travers, A.A. e Burgess, R.R. (1969). Cyclic re-use of the RNA polymerase sigma factor. *Nature* 222: 537-540.
- Towbin, H.; Staehelin, T. e Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 4350-4354.
- Tilly, K. e Yarmolinsky, M. (1989). Participation of Escherichia coli heat shock proteins DnaJ, DnaK, and GrpE in P1 plasmid replication. *J Bacteriol.* 171: 6025-6029.
- Van Dyk, T.K.; Gatenby, A.A. e LaRossa, R.A. (1989). Demonstration by genetic suppression of interaction of GroE products with many proteins. *Nature* 342: 451-453.
- Viitanen, P.V.; Donaldson, G.K.; Lorimer, G.H.; Lubben, T.H. e Gatenby, A.A. (1991). Complex interactions between the chaperonin 60 molecular chaperone and dihydrofolate reductase. *Biochemistry* 30:9716-9723.
- von Hippel, P.H.; Bear, D.G.; Morgan, W.D. e McSwiggen, J.A. (1984). Protein-nucleic acid interactions in transcription: a molecular analysis. *Ann. Rev. Biochem.* 53:389-446.
- Wetzstein, M.; Völker, U.; Dedio, J.; Löbau, S.; Zuber, U.; Schiesswohl, M.; Herget, C.; Hecker, M. e Schumann, W. (1992). Cloning, sequencing and molecular analysis of the *dnaK* locus from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 174: 3300-3310.
- Wingrove, J.A. e Gober, J.W. (1994). A σ^{54} transcriptional activator also functions as a pole-specific repressor in *Caulobacter*. *Genes & Dev.* 8: 1839-1852.
- Xu, H.; Dingwall, A., e Shapiro, L. (1989). Negative transcriptional regulation in the *Caulobacter* flagellar hierarchy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 6656-6660.

- Yuan, G. e Wong, S.-L. (1995a). Isolation and characterization of *Bacillus subtilis* *groE* regulatory mutants: Evidence for *orf39* in the *dnaK* operon as a repressor gene in regulating the expression of both *groE* and *dnaK*. *J. Bacteriol.* **177**: 6462-6468.
- Yuan, G. e Wong, S.-L.(1995b). Regulation of *groE* expression in *Bacillus subtilis*: the involvement of the σ^A -like promoter and roles of inverted repeat sequence (CIRCE). *J. Bacteriol.* **177**: 5427-5433.
- Yura, T.; Nagai,H. e Mori, H. (1993). Regulation of heat-shock response in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 321-350.
- Zhi, W.; Landry, S.J.; Gierasch, L.M. e Srere, P.A. (1992). Renaturation of citrate synthase; influence of denaturant and folding assistants. *J Prot. Sci.* **1**: 522-529.
- Zweig, M. e Cummings, D. J. (1973). Cleavage of head and tail proteins during bacteriophage T5 assembly: selective host involvement in the cleavage of a tail protein. *J. Mol. Biol.* **80**: 505-518.
- Zuber, U.; e Schumann, W. (1994). CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **176**: 1359-1363