

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE QUÍMICA

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

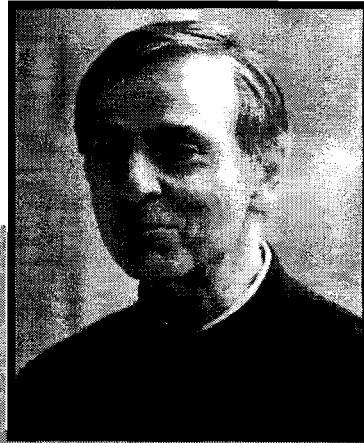
Marcelo Avedissian

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
<b>I - Introdução</b> .....	<b>1</b>
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
<b>II - Materiais e Métodos</b> .....	<b>10</b>
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 [ $\alpha$ - <sup>32</sup> 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 <sub>2</sub> .....	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 $\beta$ -galactosidase.....	24
17.1 - Construção do vetor para o ensaio.....	24
17.2 - Conjugação de <i>Caulobacter</i> .....	25
17.3 - Ensaio com $\beta$ -galactosidase .....	25
18 - Sincronização de células de <i>Caulobacter crescentus</i> .....	26
19 - Marcação de proteínas <i>in vivo</i> com pulsos de [ <sup>35</sup> 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
<b>III - Resultados .....</b>	<b>33</b>
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
<b>IV - Discussão.....</b>	<b>60</b>
<b>V - Conclusões e Perspectivas .....</b>	<b>67</b>
<b>VI - Bibliografia .....</b>	<b>69</b>
<b><i>Curriculum vitae</i>.....</b>	<b>77</b>

## 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 $\beta$ -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:	Vezes concentrado
X-gal:	5-bromo 4-cloro 3-indolil $\beta$ -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 prédivisiva.

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  $\sigma^{32}$ , 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.

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

