

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**CINTHIA FERREIRA DA PAIXÃO**

**CARACTERIZAÇÃO DO GENE *ftsh* DE *Streptomyces* sp Y7**

**GOIÂNIA**

**2002**

---

**CINTHIA FERREIRA DA PAIXÃO**

**CARACTERIZAÇÃO DO GENE *ftsh* DE *Streptomyces* SP Y7**

**Dissertação desenvolvida no Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia: área de concentração Bioquímica e Biologia Molecular.**

**GOIÂNIA  
2002**

---

## SUMÁRIO

	Páginas
<b>I Introdução</b>	<b>9</b>
I.1 Actinomicetos	9
I.1.1 Considerações gerais	9
I.1.2 <i>Streptomyces</i>	10
I.1.3 <i>Streptomyces</i> Y7	11
I.2 FtsH	13
I.2.1 Considerações gerais	13
I.2.2 A proteína FtsH	13
<b>II Justificativas</b>	<b>17</b>
<b>III Objetivos</b>	<b>18</b>
<b>IV Material e Métodos</b>	<b>19</b>
IV.1 Material	19
IV.1.1 Meios de cultura	19
IV.1.2 Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida	20
IV.1.3 Soluções para método de coloração por prata	20
IV.1.4 Soluções para eletroforese em gel de agarose	21
IV.1.5 Soluções para transformação de células competentes	22
IV.1.6 Linhagens de <i>Escherichia coli</i>	23
IV.2 Métodos	23
IV.2.1 Sequenciamento e análise dos clones obtidos da biblioteca genômica de <i>Streptomyces</i> sp Y7	23
IV.2.2 Preparo das células competentes para transformação	24
IV.2.3 Transformação de células <i>E. coli</i> por choque térmico	24
IV.2.4 Transformação de células <i>E. coli</i> pelo método de CaCl <sub>2</sub>	24
IV.2.5 Análise e determinação do tamanho do inserto dos DNAs plasmidiais	25
IV.2.6 Tratamento do plasmídeo pUC18 com CIP (fosfatase alcalina)	25
IV.2.7 Ligação dos fragmentos obtidos pelo tratamento com enzimas de restrição	25
IV.2.8 Curva de crescimento das células AR3291 e AR3289 transformadas com os plasmídeos pFS8, pFS9 e pUC18	26
IV.2.9 Análise das proteínas intracelulares das células AR3291/pFS8, AR3291/pFS9 e AR3291/pUC18 crescidas a 30°C	26

---

IV.2.10 Caracterização eletroforética em gel de poliacrilamida a 10% e coloração por prata	26
IV.2.11 Caracterização do fenótipo de translocação de proteínas citoplasmáticas para o meio de cultura	27
<b>V Resultados</b>	<b>28</b>
V.1 Análise do inserto do plasmídeo pFS9 digerido com as enzimas de restrição EcoRI/HindIII, BamHI/HindIII, EcoRI/BamHI e PstI	28
V.2 Análise da seqüência do gene <i>ftsH</i> e da seqüência deduzida de aminoácidos	30
V.3 Dendograma representativo do grau de similaridade de seqüências de FtsH.	36
V.4 Predição e análise das estruturas “coiled coil” das seqüências dos plasmídeos pFS8 e pFS9	37
V.5 Curva de crescimento das células AR3291 e AR3289 transformadas com os plasmídeos pFS8, pFS9 e pUC18	38
V.6 Análise do fenótipo de translocação de proteínas citoplasmáticas (std) para o meio de cultura das células AR3291 e XL10 transformadas com os plasmídeos pFS8, pFS9 e pUC18	39
V.7 Análise eletroforética das proteínas intracelulares das células AR3291 transformadas com os plasmídeos pFS8, pFS9 e pUC18	40
<b>VI Discussão</b>	<b>41</b>
<b>VII Conclusão</b>	<b>45</b>
<b>VII Perspectivas</b>	<b>46</b>
<b>VIII Bibliografia</b>	<b>47</b>

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: a) aspecto morfológico do isolado <i>Streptomyces</i> sp Y7 cultivado em meio ISP, incubado a 30°C por 07 dias; b) aspecto microscópicos das estruturas reprodutivas do isolado Y7.	11
Figura 2: Esquema dos motivos da proteína FtsH de <i>Escherichia coli</i>	15
Figura 3: Mapa dos plasmídeos pFS8 e pFS9	28
Figura 4: Análise eletroforética, em gel de agarose 1% com brometo de etídio, dos fragmentos obtidos após tratamento do plasmídeo pFS9 com as enzimas <b>EcoRI/HindIII</b> , <b>EcoRI/BamHI</b> e <b>PstI</b> .	29
Figura 5: Seqüência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do gene <i>ftsH</i> de <i>Streptomyces</i> Y7.	31
Figura 6: Alinhamento da seqüência deduzida de aminoácidos do fragmento gênico que codifica para FtsH de <i>Streptomyces</i> Y7	35
Figura 7: Dendograma agrupando FtsH de vários organismos	36
Figura 8: Predição da estrutura “coiled coil” na seqüência deduzida de aminoácidos dos plasmídeos pFS8 e pFS9.	37
Figura 9: Curvas de crescimento das células AR3291 e AR3289 transformadas com os plasmídeos pFS8, pFS9 e pUC18	38
Figura 10: Análise do fenótipo std.	39
Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% corado com prata.	40
Figura 12: Predição das regiões de “coiled coil” da proteína FtsH de <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Streptomyces coelicolor</i> .	43

---

## ÍNDICE DE TABELAS

	página
Tabela 1: Análise das bibliotecas genômicas	12

---

## ABREVIATURAS E SIGLAS

$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{L}$	Microlitro
$\mu\text{m}$	Micrometro
bp	pares de bases
DMSO	Dimetil Sulfoxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
g	Velocidade de Sedimentação em Unidade Gravitacional
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
ng	Nanograma
nm	Nanômetros
p/v	Peso por volume
pH	Potencial hidrogeniônico
PSA	Persulfato de amônio
q.s.p	Quantidade suficiente para
rpm	Rotações por minuto
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano.
U	Unidade de atividade enzimática
v	Volume
v/v	Volume por volume
XGAL	5-Bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo

---

## RESUMO

Os actinomicetos são bactérias Gram-positivas, aeróbicas e com DNA rico em G+C (mais que 60%). São encontrados em quase todos ambientes, formando hifas ramificadas que persistem na forma de micélio. Os *Streptomyces* constituem cerca de 90% dos actinomicetos isolados de solos, apesar de serem encontrados em ambientes aquáticos e no interior de algumas plantas. Os *Streptomyces* são grandes produtores de enzimas hidrolíticas e antibióticos, 70 % dos antibióticos conhecidos são produzidos por esses microrganismos. Com o objetivo de clonar genes de interesse biotecnológico, foi construída uma biblioteca genômica de *Streptomyces* sp Y7 isolado de solo de Cerrado. A partir das análises das seqüências das bibliotecas genômicas foi selecionado o plasmídeo pFS8 que apresentava homologia com o gene *ftsH*. O gene *ftsH* codifica uma metaloprotease ATP Zn<sup>2+</sup> dependente, pertencente a família AAA (ATPases Associadas a diversas Atividades celulares). Os dados do seqüenciamento mostraram que o gene *ftsH* clonado estava incompleto. A fim de caracterizar o produto do gene *ftsH*, foram feitos testes para avaliar a funcionalidade dessas proteínas de fusão em células mutadas para o gene *ftsH* (AR3291). A proteína de fusão produzida por pFS9 é capaz de recuperar o crescimento das células AR3291 e a proteína produzida por pFS8 não apresenta efeitos tóxicos para células AR3289, que não têm mutação para o gene *ftsH*. Também foi analisado se as proteínas produzidas por pFS8 e pFS9 formam a estrutura “coiled coil” que é comum aos outros organismos estudados. Outra característica analisada nesse trabalho foi a capacidade da proteína produzida por pFS9 diminuir ou inibir a translocação anormal de proteínas para o meio externo. Os resultados mostram que essa proteína não inibe a translocação de proteínas para o meio externo, enquanto que a proteína produzida por pFS8 apresenta efeito contrário a proteína produzida por pFS9.

Palavras chaves: Actinomicetos, *Streptomyces*, *ftsH*, proteases, AAA.

---

## ABSTRACT

The actinomycetes are Gram-positive bacteria, aerobic with rich DNA in G+C (larger than 60%) and immobile. They are found practically in all the environment, forming ramified filaments or hyphae that persist in the mycelium form. The *Streptomyces* constitutes 90% of the isolated actinomycetes of the soils, in spite of they are also found in aquatic atmospheres and interior of some plants. They stand out for the diversity of production of hydrolytic enzymes and antibiotics, 70% of the known antibiotics are produced by those microorganisms. Aiming to clone genes with biotechnological interest, a genomic library of the *Streptomyces* sp Y7 isolated of the soil of Cerrado was constructed. After the analyses of the sequences of the genomic libraries of *Streptomyces* sp Y7, it was selected a plasmid named pFS8, that displayed similarity with *ftsH* genes. The *ftsH* gene encodes a metalloprotease ATPase and Zn<sup>+2</sup> dependent, belongs to the AAA family (ATPases associated with a variety of cellular activities). It is involved with several cellular functions such as secretory proteins export and degradation of transcriptional factors (sigma 32 and Lambda CII). The data of sequencing showed that the *ftsH* gene was incomplete. In order to characterize if the product of this gene showed biological activity, it was made tests to evaluate the functionality of the fusion proteins in an *ftsH*-negative *E.coli* strain AR3291. AR3291 cells transformed with this plasmid showed a general growth advantage upon the cells AR3291. The protein produced did not present toxic effects for cells AR3289, which had normal *ftsH* gene. The truncated protein obtained was also analyzed to prediction of the structure "coiled-coil", that is common to the other FtsH studied, and the results showed those truncated proteins did not form "coiled-coil" structure. We also tested whether fusion proteins decreased or inhibited the defective transfer of cytosolic proteins.

Key words: Actinomycetes, *Streptomyces*, *ftsH*, proteases, AAA.

---

# I INTRODUÇÃO

## I.1 Actinomicetos

### I.1.1 Considerações gerais

Os actinomicetos são bactérias Gram-positivas, aeróbias com DNA rico em G+C (maior que 60%) e imóveis. São encontrados praticamente em todos os ambientes, formam filamentos ramificados ou hifas que persistem na forma de micélio. A maioria é quimiorganotróficos, apresentam estruturas que variam de bastonetes e cocos, até uma organização micelial complexa (Holt *et al.*, 1994; Yokota, 1997).

As hifas se parecem morfológicamente com as hifas de fungos, entretanto são mais estreitas, com diâmetro de 0,5 a 1,0  $\mu\text{m}$ , dimensão que é análoga à bacteriana (Alexander, 1977). Estas estruturas podem penetrar no substrato e formar o micélio vegetativo ou primário (micélio substrato), sendo que este depois de algum tempo pode crescer verticalmente e formar o micélio aéreo ou secundário (Locci, 1976; Locci e Sharples, 1984; Vobis, 1997).

Em alguns gêneros como *Micromonospora* e *Actinoplanes*, o micélio pode estar ausente (Vobis, 1997) ou pode não se desenvolver como um micélio verdadeiro e se fragmentar em forma de cocos ou bacilos, como no gênero *Nocardia* (Locci, 1976).

As colônias podem estar aderidas ao substrato ou soltas, com consistência variando de pastosa até extremamente dura. As cores são variáveis, incluindo o branco, preto, marrom, amarelo, laranja, rosa, vermelho, púrpura, azul e verde. O tamanho da colônia varia de acordo com a espécie, idade e condições de crescimento (Vobis, 1997).

As estruturas reprodutivas são bastante diversificadas, sendo que o esporo é utilizado como um dos critérios de caracterização que divide os actinomicetos em esporoactinomicetos e nocardioformas, onde, no primeiro caso, a esporulação ocorre em partes bem definidas do micélio e no segundo, as hifas se fragmentam em elementos que são semelhantes a cocos e bastonetes (Ensing, 1978; Locci e Sharples, 1984; Vobis, 1997).

---

A maioria dos actinomicetos vive no solo como saprófitas, mas podem ser encontrados em associações parasíticas ou simbióticas com plantas ou animais (Williams *et al.*, 1984; Arai, 1997). São organismos capazes de degradar polímeros de origem animal, vegetal e microbiana e ainda com habilidade de fixar nitrogênio na maioria de plantas não leguminosas (Holt *et al.*, 1994; Goodfellow e Williams, 1983).

Apesar do pouco conhecimento sobre a diversidade dos actinomicetos no solo ou em outros ambientes, estes microrganismos têm sido estudados detalhadamente devido a algumas características especiais que os tornam importante na área biotecnológica, como a eficiente habilidade em degradar substâncias que normalmente não são decompostas por outras bactérias e fungos tais como: fenóis, quitina, húmus e parafinas (Piret e Demain, 1988), além de produzirem antibióticos, pigmentos e enzimas hidrolíticas (Goodfellow e Williams, 1983).

### **I.1.2 *Streptomyces***

O gênero *Streptomyces* constitui 90% dos actinomicetos isolados dos solos e também são encontrados em ambientes aquáticos ou no interior de algumas plantas (Williams *et al.*, 1984). São bactérias saprófitas capazes de degradar vários tipos de moléculas orgânicas devido a ampla diversidade de produção de enzimas hidrolíticas, como as celulasas, xilanases, quitinases, amilases e  $\beta$ -glucanases (Magnat 1999).

Os *Streptomyces* também se destacam na produção de antibióticos. Cerca de 70% dos antibióticos conhecidos são produzidos por esses microrganismos (Korn-Wendish e Kutzner, 1992). A partir da descoberta das estreptomicinas um grande número de antibióticos tem sido isolado das culturas de *Streptomyces*. Podemos citar entre os antibióticos produzidos, o cloranfenicol, as tetraciclinas, os macrolídeos como a tilosina (Korn-Wendish e Kutzner, 1992; Bate *et al.*, 2000), as antraciclinas (Kantola *et al.*, 2000), as anguciclinas como a jadomicina (Rohr e Thiericke, 1992) e a urdamicina A, também agente anticâncer (Faust *et al.*, 2000).

A variada produção de exoenzimas é outra característica que tornam os *Streptomyces* alvo de interesse industrial. A hialuronidase, uma enzima amplamente

---

utilizada em aplicações médicas, como auxiliar na difusão de drogas e anestésicos, prevenção de quelóides e aumento da velocidade de absorção de alguns remédios, também são produzidas por *Streptomyces*, como é o caso da hialuronato liase produzida por *Streptomyces hyalurolyticus* e *Streptomyces koganeiensis* (Azeredo *et al.*, 2001).

As enzimas do sistema quitinolítico também vêm despertando grande interesse, devido à ampla variedade de aplicações na pesquisa básica e aplicada (Myashita *et al.*, 1991; Gupta *et al.*, 1995). Estudos citoquímicos de localização de açúcares com a N-acetilglicosamina e quitosana em paredes celulares de fungos (Benhamou, 1989; Grenier *et al.*, 1991) são exemplos de sua aplicação na pesquisa básica. Outro exemplo é a utilização dessas enzimas na produção de protoplastos de fungos, visto que a quitina é um dos principais componentes da parede celular (Vyas e Deshpande, 1989).

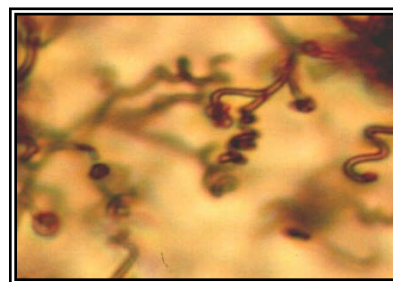
Na agricultura, os *Streptomyces* possuem um papel importante no controle biológico de alguns fitopatógenos (Shapiro *et al.*, 1989; Bliffeld *et al.*, 1999). Os resultados obtidos com *Streptomyces viridificans* demonstraram sua capacidade de produzir altos níveis de quitinase, e hidrolisar o principal componente da parede celular dos fungos, a quitina (Gupta *et al.*, 1995).

### I.1.3 *Streptomyces* sp Y7

O *Streptomyces* sp Y7 isolado de solo de cerrado, (figura 1), apresenta micélio substrato de cor bege, micélio aéreo cinza e esporos brancos, sendo que a cadeia de esporos é do tipo espiralado. É capaz de crescer em meio mínimo contendo como fonte de carbono: quitina, manitol, manose, tirosina, sacarose, amido e maltose além produzir melanina, catalase, gelatinase, agarase e urease, Maitan e Bataus (1997).



(a)



(b)

Figura 1: a) aspecto morfológico do isolado *Streptomyces* sp Y7 cultivado em meio ISP2, incubado a 30°C por 07 dias; b) aspecto microscópico das estruturas reprodutivas do isolado Y7.

O isolado Y7 quando testado para a produção de substâncias antimicrobianas contra bactérias-teste, apresentou atividade contra *Bacillus subtilis*, *Streptococcus aureus*, *Streptococcus epidermidis* e *Rhodococcus equi*, (Maitan e Bataus, 1997).

Sobrinho (1999), estudou a produção de enzimas do sistema quitinolítico do isolado Y7 e seus efeitos na lise da parede celular dos fitopatógenos *Fusarium* sp e *Rhizoctonia solani*. Os resultados obtidos demonstraram que essa nova espécie de *Streptomyces* produz duas quitinases e N-acetilglicosaminidases e, nos testes realizados com os fitopatógenos, foi observada uma lise acentuada da parede celular destes fungos, sugerindo um possível papel como agente no controle biológico.

Com o objetivo de estudar a biologia molecular de dois isolados do gênero *Streptomyces*, foram construídas algumas Bibliotecas Genômicas utilizando diferentes estratégias (Penna, 2001). Uma das Bibliotecas construídas utilizou o DNA total do *Streptomyces* sp Y7 parcialmente digerido com a enzima **Sau3AI**, o que resultou em fragmentos de DNA com uma grande variedade de tamanho. Os fragmentos com tamanho de 2 a 5 kb foram clonados no sítio de **BamHI** do plasmídeo pUC18, resultando na Biblioteca Genômica (BG) 2 e os fragmentos sem restrição de tamanho, clonados no mesmo sítio, resultou na BG 6.

A BG 4 foi construída com a clonagem dos fragmentos de DNA de 2 a 5 kb, obtidos das digestões realizadas com **EcoRI/HindIII**, no plasmídeo pUC18. A BG 8 foi construída a partir do sistema **EcoRI/HindIII**, sem restrição ao tamanho dos fragmentos. Os resultados obtidos com as transformações feitas em *Escherichia coli* XL1-blue (Tabela 1), demonstraram que a BG 2 apresentou a maior representatividade e, levando-se em conta a estratégia utilizada para a construção, o número total de clones recombinantes, e a validação, essa Biblioteca apresentava-se como a mais indicada para a realização de trabalhos de clonagem e caracterização do genoma do *Streptomyces* sp Y7.

**Tabela 1. Análise das Bibliotecas Genômicas.**

B. G.	Nº de transformações	Nº de clones totais	Nº de clones recombinantes	% de recombinação
BG 2	08	11.936	10.776	90
BG 4	03	28.408	6.776	24
BG 6	03	2.344	1.976	84

---

BG 8	03	9.320	9.248	99
------	----	-------	-------	----

---

## I.2 FtsH

### I.2.1 Considerações gerais

As proteínas dentro das células estão sujeitas a vários tipos de danos que levam-nas a não funcionalidade. As proteínas danificadas podem ser substituídas por novas ou então podem ser restauradas por determinados mecanismos desenvolvidos pelas células, como as chaperones moleculares, os reparos enzimáticos e degradação proteolítica (Schumann, 1999).

As chaperones moleculares, como a DnaK e GroEL, interagem com as proteínas que estão com o enovelamento parcial ou errado, facilitando-o ou promovendo microambientes para que esse enovelamento possa ocorrer de maneira adequada (Hartl, 1996) enquanto que as proteases dependentes de ATP e que também apresentam uma intrínseca atividade de chaperone, desdobram seus substratos expondo-os a sua atividade catalítica (Schumann, 1999).

O termo “charonin” foi designado para proteases com atividades associadas a chaperones, isto é, proteínas que podem ter ambas atividades associadas a duas cadeias polipeptídicas diferentes (Clp) ou a uma única cadeia polipeptídica (Lon e FtsH), (Schumann, 1999).

### I.2.2 A proteína FtsH

A FtsH é uma metaloprotease ATP e  $Zn^{2+}$  dependente, pertencente a família AAA (ATPases Associadas a diversas Atividades celulares). Encontra-se ligada à membrana celular desempenhando diversas atividades celulares (Tomoyasu *et al.*, 1995), como a regulação da adaptação ao stress, esporulação (Schumann, 1999), crescimento e viabilidade celular (Jayasekera *et al.*, 2000) e ainda seu uso com em potencial no imunodiagnóstico de tuberculose (Amara *et al.*, 1998). É encontrada desde

---

procariotos até eucariotos em associação a cloroplastos e mitocôndrias (Schumann, 1999).

O gene de *ftsH* foi descoberto primeiramente em *Escherichia coli* por quatro grupos distintos que procuravam por diferentes fenótipos e conseqüentemente recebeu quatro diferentes designações, *hflA* ou *hflB* - fenótipo relacionado com a frequência de lise ou lisogenia (Gautsh e Wulf, 1974), *ftsH* - fenótipo relacionado a filamentação sensível a temperatura (Santos e Almeida, 1975), *tolZ* - fenótipo relacionado com tolerância a colicinas (Matsuzawa *et al.*, 1984) e *mrsC* - fenótipo relacionado com a estabilidade de mRNA (Granger *et al.*, 1998).

O produto do gene *ftsH* em *E. coli* codifica uma proteína de 70 kDa que se encontra ancorada na membrana através de dois segmentos transmembrana localizados próximos a extremidade amino terminal que dão origem a um domínio periplasmático de 70 resíduos de aminoácidos e 520 resíduos de domínio citoplasmático. Logo após as duas regiões transmembranas são encontradas umas séries de motivos, dentre os quais os motivos Walker A e B que caracterizam as proteínas da família AAA e são pontos da atividade ATPásica da FtsH (Tomoyasu *et al.*, 1993a; Akiama *et al.*, 1995; Tomoyasu *et al.*, 1993b).

O módulo denominado AAA, de aproximadamente 200 aminoácidos, apresenta uma região conhecida como segunda região de homologia (SRH) e juntamente com os motivos Walker, caracteriza a FtsH como membro da família AAA (Ogura e Wilkinson, 2001).

No domínio proteásico da FtsH, na região carboxi terminal, entre os resíduos 417-421, é encontrado o motivo de ligação de zinco, HEXGH (Schumann, 1999) cujo coordenador gluzincina é um ácido glutâmico localizado na posição 479 (Saikawa *et al.*, 2002).

Na região carboxi terminal da FtsH foi encontrada uma pequena  $\alpha$ -hélice que forma uma estrutura conhecida como “coiled coil”, que pode ser um possível zíper de leucina (figura 2). Mutações nessa região demonstraram que a atividade proteolítica sobre os substratos  $\sigma^{32}$  e  $\lambda$ CII foram prejudicadas, indicando que essa região é essencial para a atividade da FtsH, tanto “in vivo” como “in vitro” (Shotland *et al.*, 2000).

---

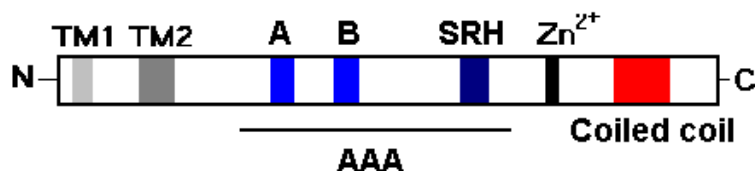


Figura 2 – Esquema dos motivos da proteína FtsH de *Escherichia coli*: TM1 e TM2 - região transmembrana; A e B – motivos Walker; SRH – segunda região de homologia; Zn<sup>2+</sup> - região de ligação de zinco e a região coiled coil. (Shotland *et al.*, 2000)

Estudos cristalográficos demonstraram que a região compreendida entre os aminoácidos 144 e 398 da FtsH de *E. coli* apresenta-se organizada em dois domínios: o  $\alpha/\beta$  (144-323), que contém uma clássica cavidade de ligação a nucleotídeos e o “pacote” de 4  $\alpha$ -hélices (327-398). O domínio  $\alpha/\beta$  compreende os motivos Walker A (195-202) e B (250-257) e a segunda região de homologia (SRH) (299-317), que em conjunto constituem o módulo AAA. O centro do domínio de ligação ao nucleotídeo compreende 6 fitas  $\beta$ -pregueadas dispostas na seguinte ordem:  $\beta$ -6,  $\beta$ -2,  $\beta$ -5,  $\beta$ -4,  $\beta$ -3 e  $\beta$ -1, sendo que a última está orientada no sentido antiparalelo. Flanqueando esse domínio encontram-se 2 pares de  $\alpha$ -hélice:  $\alpha$ -1,  $\alpha$ -2,  $\alpha$ -3 e  $\alpha$ -4 (Krzywda *et al.*, 2002).

A maioria dos estudos realizados sobre a estrutura da proteína FtsH, demonstra que ela apresenta-se como um hexâmero, entretanto a análise do modelo construído demonstrou que a região de FtsH 144-398 não forma um hexâmero como acontece na maioria das outras ATPases, mas sim um dímero (Krzywda *et al.*, 2002). Esse resultado não é totalmente inesperado, pois estudos realizados por Makino *et al.*, (2000) e Akiyama e Ito, (2001) sugeriram que as regiões transmembranas são determinantes para a oligomerização da FtsH e a ausência das duas regiões transmembranas nesse estudo pode ter contribuído para essa formação dimérica.

A FtsH está relacionada com várias funções celulares, que vão desde a degradação de proteínas que não estão na sua forma correta ou estruturadas adequadamente até como chaperones moleculares (Schumann, 1999). A proteína SecY, uma componente essencial da maquinaria de translocação de proteínas de *E. coli*, quando não está associada corretamente com as outras subunidades do seu complexo, é

degradada rapidamente por FtsH (Kihara *et al.*, 1995), assim como a subunidade  $\alpha$  da região F<sub>0</sub> da ATP sintase (Akiyama *et al.*, 1996) e YccA (Kihara *et al.*, 1998), o que demonstra um papel fundamental da FtsH na manutenção da integridade das proteínas de membrana (Krzywda *et al.*, 2002).

Algumas proteínas citoplasmáticas são alvos da ação proteásica de FtsH como por exemplo, a proteína regulatória da resposta “heat-schock” em *E.coli*,  $\sigma^{32}$ , que é muito instável sob condições não estressantes (meia-vida < 1 minuto). A degradação de  $\sigma^{32}$  é mediada pelas chaperones DnaK, DnaJ e GrpE, que competem com o conjunto RNAPol e translocam  $\sigma^{32}$  para a membrana citoplasmática onde está FtsH (Tomoyasu *et al.*, 1995; Tatsuta *et al.*, 2000). Estudos realizados por Bertani *et al.*, (2001) indicaram que a extremidade carboxiterminal de  $\sigma^{32}$  é essencial para sua rápida degradação por FtsH.

As proteínas regulatórias  $\lambda$  CII e CIII, que influenciam na decisão de lise ou lisogenia da bactéria quando infectada pelo fago  $\lambda$ , também são degradadas por FtsH (Shotland *et al.*, 1997; Leffers e Gottesman, 1998), sabe-se que o estabelecimento da lisogenização requer um acúmulo da proteína repressora  $\lambda$  CI, que é regulada positivamente pela proteína  $\lambda$  CII (meia-vida de 2 minutos). A proteína CIII interfere competitivamente com a rápida degradação da proteína CII, aumentando sua meia vida dentro da célula. O primeiro passo para a degradação ocorre após o complexo FtsH/HflKC reconhecer  $\lambda$  CII logo após o reconhecimento, HflKC se dissocia do complexo para ativar a função proteolítica de FtsH. Foi encontrado um novo elemento que participa do controle da lise-lisogenização, a proteína HflD, que age sequestrando  $\lambda$  CII e levando-a para a membrana onde está localizada FtsH, diminuindo assim a frequência da lisogenia de  $\lambda$  (Kihara, *et al.*, 2001).

Estudos realizados por Ogura *et al.* (1999) demonstraram que FtsH tem como função principal controlar a biossíntese dos principais lipídeos de membrana através da degradação regulada da enzima que é responsável pela síntese de lipídeos A. Nesse trabalho os autores demonstraram que o acúmulo de lipopolissacarídeos (LPS) pode levar a morte celular pois o mesmo provoca má formação da membrana externa, tornando a célula inviável. Demonstraram também que uma mutação no gene *ftsH* leva ao acúmulo de LPS através da estabilização da enzima LpxC (UDP-3-O-(R-3-hidroxyristoil)-N-acetilglicosamina deacetilase) confirmando então o principal papel

---

da proteína FtsH em *E. coli*: o controle da biossíntese de lipídeos de membrana, pois a ausência da mesma causa a inviabilidade celular.

## II JUSTIFICATIVA

Os *Streptomyces* são bactérias que apresentam características morfológicas e fisiológicas diferentes dos padrões das demais bactérias, seja pela formação de micélio, alto teor de G+C ou pela produção diversificada de metabólitos secundários. Essas características estão sendo estudadas tanto na pesquisa básica quanto na pesquisa aplicada. O potencial biotecnológico associado a esses microrganismos é grande, pois são bons produtores de enzimas hidrolíticas, antibióticos, fármacos entre outros. O isolamento e caracterização de novos *Streptomyces* é de fundamental importância para se testar seu potencial biotecnológico.

Os trabalhos realizados no laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética da Universidade Federal de Goiás têm como um de seus objetivos avaliar e caracterizar diferentes microrganismos isolados do solo de cerrado, incluindo os *Streptomyces*. Atualmente um dos trabalhos desenvolvidos, é a caracterização da biblioteca genômica do isolado *Streptomyces* Y7.

Análises das seqüências obtidas dessa biblioteca demonstraram a presença do gene *ftsH* que codifica para a proteína FtsH. Essa proteína é uma metaloprotease ATP/Zn<sup>2+</sup> dependente que se encontra ancorada na membrana plasmática e é amplamente distribuída entre os organismos (eucariotos a procariotos) (Schumann, 1999). A proteína FtsH desempenha importantes funções para as células, que vão desde a degradação de proteínas que são instáveis ou que não estão na conformação correta, até a regulação da biossíntese de lipídios de membrana assim como a sua biogênese (Ogura *et al.*, 1999).

A caracterização do gene *ftsH* do *Streptomyces* Y7 e seu produto, será de grande contribuição para os estudos funcionais dessa proteína nesse organismo além de esclarecer um pouco mais das características desse isolado.

---

### III OBJETIVOS

#### III.1 Objetivo geral

- Sequenciar e caracterizar o gene *ftsH* do *Streptomyces* Y7.

#### III.2 Objetivos específicos

- Sequenciar o gene *ftsH* do *Streptomyces* Y7;
  - Analisar as seqüências e caracterizar o gene *ftsH*;
  - Testar a atividade do gene *ftsH* do *Streptomyces* Y7 em células de *E.coli* AR3291.
-

## IV MATERIAL E MÉTODOS

### IV.1 Material

#### IV.1.1 Meios de cultura

##### Meio LB (Lúria-Bertani) - (Sambrook *et al.*, 1989)

NaCl	10 g
Peptona	10 g
Extrato de levedura	5 g
Água destilada q.s.p.	1000 mL

Após dissolução em água destilada, ajustou-se o pH para 7,0 e o meio foi autoclavado.

Para fazer meio LB sólido, acrescentou-se 15 g de ágar e o meio foi autoclavado.

##### Meio SOB (Hanahan, 1983)

Extrato de levedura	2,5 g
KCl	0,09 g
NaCl	0,29 g
Triptona	10,0 g
Água destilada q.s.p.	500 mL

Após autoclavagem adicionou-se 10 mol/L de MgCl<sub>2</sub>.

---

#### IV.1.2 Soluções para eletroforese em gel de poliacrilamida (Laemmli, 1970)

##### Acrilamida:Bisacrilamida (29:1)

Acrilamida	29 g
Bisacrilamida	1 g
Água destilada q.s.p.	100 mL

A solução foi filtrada em filtro Millipore 0.45 $\mu$ m e estocada ao abrigo da luz a 4°C.

##### Tampão de corrida tris-glicina 5x (estoque)

Tris-base	22,7 g
Glicina	112,5 g
Água destilada q.s.p.	1.000 mL

##### Tampão de amostra desnaturante (5x)

$\beta$ -Mercaptoetanol	0,2% (v/v)
Azul de bromofenol	0,001% (p/v)
Glicerol	20% (v/v)
SDS 10%	20% (v/v)
Tris-HCl 0,5M pH 8,8	10% (v/v)

#### IV.1.3 Soluções para método de coloração por prata (Blum *et al.*, 1987)

##### Solução fixadora/parada

---

Acido acético glacial	12%(v/V)
Metanol	50%(v/V)

#### **Solução de tiosulfato de sódio**

Formaldeído 37%	0,075%(v/v)
Tiosulfato de sódio	0,02 %(p/v)

#### **Solução reveladora**

Carbonato de sódio	6%(p/v)
Tiosulfato de sódio 0,02%	2%(p/v)
Formaldeído 37%	0,05%(v/v)

#### **Solução de prata**

Nitrato de prata	0,2%(p/v)
Formaldeído 37%	0,075%(v/v)

### **IV.1.4 Soluções para eletroforese em gel de agarose (Sambrook *et al.*, 1989)**

#### **Agarose 1% (p/v)**

Agarose	1 g
TEB 0,5 x q.s.p	100 mL

#### **Tampão de amostra para DNA**

Tampão de corrida TEB 10X	50%(v/v)
Glicerol	50%(v/v)

---

Azul de bromofenol                      0,001%(p/v)

#### **Tampão de corrida para gel de agarose (TEB 10X)**

Tris base                      0,89 mol/L

Ácido Bórico                      0,89 mol/L

EDTA                      0,08 mol/L

Ajustou-se o pH para 8,4. A solução de uso foi diluída para a concentração final de 0,5x.

#### **IV.1.5 Soluções para transformação de células competentes**

##### **TB (Inoue *et al*, 1990)**

CaCl<sub>2</sub>                      15 mmol/L

KCl                      250 mmol/L

MnCl                      55 mmol/L

PIPES                      10 mmol/L

#### **IV.1.6 Linhagens de *Escherichia coli***

*E. coli* AR3291 – F<sup>-</sup> IN (*rrnD- rrnE*)1)*zad220::Tn10 sfhC21ΔftsH3::kan*

(Tatsuta *et al.*, 1998)

*E. coli* AR3289 - F<sup>-</sup> IN (*rrnD- rrnE*)1) *sfhC21zad220::Tn10* (Tatsuta *et al.*, 1998)

---

## IV.2 Métodos

### IV.2.1 Seqüenciamento e análise dos clones obtidos da biblioteca genômica de *Streptomyces* sp. Y7

Foram selecionados 50 clones aleatoriamente da Biblioteca Genômica BG2 de *Streptomyces* sp.Y7 (Penna, 2001) e parcialmente seqüenciados no aparelho MEGABACE™ (Amersham Biosciences®), utilizando-se o sistema “DYEnamic ET, Dye Terminator Cycle Sequencing” (Amersham Biosciences®). As reações de seqüenciamento foram preparadas utilizando-se 4µL de DYEnamic ET terminator Reagent Premix, 1µL de “primers” universal “forward” e “reverse” respectivamente, 200 ng-500 ng de DNA e água Milli Q para volume final de 10µl.

As seqüências obtidas foram analisadas e comparadas com outras seqüências depositadas em banco de dados (NCBI) usando o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990). O alinhamento entre as seqüências foi feito através do programa CLUSTAL X (Higgins e Sharp, 1988). O dendograma representativo do grau de similaridade das seqüências de FtsH foi construído por comparação das seqüências de aminoácidos utilizando os programas CLUSTAL X (Higgins e Sharp, 1988) e Treeview (Roderic, 1996).

### IV.2.2 Preparo de células competentes para transformação (Inoue *et al.*, 1990)

Foi feito um pré-inóculo com uma colônia de *E.coli* XL10 em 5mL de meio LB e incubado a 37°C por 18 horas sob agitação. Após esse período, 1 mL dessa cultura foi inoculado em 250 mL de meio SOB. O material foi incubado a 37°C, sob agitação, até atingir a absorbância de 0,6 a 600 nm. O frasco foi então levado a um banho de gelo onde se procedeu ao resfriamento da cultura por 10 minutos. Em seguida as células foram coletadas por centrifugação a 2500g por 10 minutos em centrifuga refrigerada e

---

ressuspensas cuidadosamente em 80 mL de TB a 4°C e incubadas por 15 minutos no gelo. Repetiu-se o processo de centrifugação e após o sobrenadante ser descartado, as células foram ressuspensas em 20 mL de TB e incubadas no gelo por mais 10 minutos. Adicionou-se DMSO para uma concentração final de 7% deixando-se a cultura no gelo por mais 10 minutos. Após esse período as células foram alíquotadas, e estocadas a – 80°C até o momento do uso.

#### **IV.2.3 Transformação de células de *E.coli* por choque térmico (Sambrook *et al.*, 1989)**

Para a transformação, as bactérias *E.coli* XL10 foram retiradas do freezer - 80°C e deixadas no gelo por 10 minutos. Foram adicionados em um tubo eppendorf, 150 µL de células competentes e 2 µL (~200 ηg) do plasmídeo de interesse. O material foi incubado em gelo por 30 minutos, sendo a seguir incubado a 37°C por 5 minutos e retornado ao gelo. Adicionou-se ao sistema 1mL de meio LB, incubando-se sob lenta agitação, a 37°C, por 1 hora. Após este período, o sistema foi plaqueado em placas de Petri contendo LB ampicilina (100 µg/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 18 horas.

#### **IV.2.4 Transformação de células *E. coli* pelo método CaCl<sub>2</sub> (Sambrook *et al.*, 1989)**

Foi feito um pré-inóculo de uma colônia de *E.coli* AR3291 em 5mL de meio LB e incubado a 37°C por 18 horas sob agitação. Após esse período, 1 mL dessa cultura foi inoculado em 50 mL de meio LB. O material foi incubado a 37°C, sob agitação, até atingir a absorbância de 0,3 a 600 nm. O frasco foi então levado a um banho de gelo onde se procedeu ao resfriamento da cultura por 10 minutos. Em seguida as células foram coletadas por centrifugação a 2500g por 10 minutos em centrifuga refrigerada e ressuspensas cuidadosamente em 20 mL CaCl<sub>2</sub> 0,1 mol/L a 4°C e incubadas por 10 minutos no gelo. Centrifugou-se nas mesmas condições anteriores e o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 1 mL de CaCl<sub>2</sub> 0,1 mol/L e incubadas no gelo por 2 horas. Após esse período as células estavam prontas para serem transformadas com os plasmídeos de interesse pelo método de choque térmico.

---

#### **IV.2.5 Análise e determinação do tamanho do inserto dos DNAs plasmidiais**

Foram selecionadas colônias das placas e submetidas à extração e purificação de seu DNA plasmidial com o Flex Prep Kit (Amersham Biosciences®). Os DNAs plasmidiais foram digeridos duplamente com as enzimas de restrição **EcoRI/HindIII**, **EcoRI/BamHI**, **BamHI/HindII** e **EcoRI/BamHI** apenas com **PstI**. O sistema de digestão foi composto por 1µg de DNA plasmidial, 10 U de enzima e tampão adequado mais água Mili-Q para um volume final de 20 µL. Após incubação a 37°C por 3 horas, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 1%, com brometo de etídio. As bandas foram visualizadas através de irradiação com luz ultra violeta.

#### **IV.2.6 Tratamento do plasmídeo pUC18 com CIP (Fosfatase alcalina)**

O plasmídeo pUC18 (~200 ng) digerido com o sistema de digestão **PstI**, foi tratado com 1µL de fosfatase alcalina e incubado a 37°C por 30 minutos. Após esse período foi adicionados mais 1µL de fosfatase alcalina e o sistema foi incubado nas mesmas condições anteriores. O sistema foi incubado a 80°C por 20 minutos. Foi adicionado NaCl para a concentração final de 0,3 mol/L mais 2,5 V de etanol 100% e o sistema foi incubado a -20°C por 2 horas. Após esse período centrifugou-se por 15 minutos a 4°C a 10000g. O sobrenadante foi retirado e após secar, o precipitado foi ressuspendido em 20 µL de água Milli Q.

#### **IV.2.7 Ligações dos fragmentos obtidos pela digestão com enzimas de restrição no vetor pUC18**

Os fragmentos obtidos na digestão com a enzima de restrição **PstI**, foram eluídos do gel de agarose de acordo com as orientações do fabricante do GTX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences®). Após a eluição, os fragmentos foram ligados ao vetor pUC18 previamente tratado com CIP. O sistema continha 10µL do plasmídeo pUC18, 15 µL do DNA digerido com **PstI**, 1µL de enzima T4 DNA ligase e 2 µL de tampão ligase (volume final de 1 x). O volume foi completado para 30 µL e o sistema foi incubado a 16°C por 18 horas e mantido a 4°C até o momento da

---

transformação nas células *E.coli* XL10. Os clones obtidos após a transformação foram submetidos ao seqüenciamento para análise posterior.

#### **IV.2.8 Curva de crescimento das células AR3291/pFS8, AR3291/pFS9 e AR3291/pUC18**

Foi feito um pré-inóculo, em 5 mL de meio LB e ampicilina (50 µg/mL), com as células AR3291 transformadas com os plasmídeos pFS8, pFS9 e pUC18. O pré-inóculo foi incubado a 28°C, 180 rpm, por 20 horas. Após esse período 200µL de cada pré-inóculo foi inoculado em 50 mL de meio LB contendo ampicilina (50 µg/mL) e 0,5 mmol/L de IPTG, sendo que cada inóculo foi feito em triplicata. Os inóculos foram incubados a 37°C, 180 rpm. A cada 4 horas foi retirado 1mL de cada inóculo e foi feita a leitura a 600 nm em triplicata.

#### **IV.2.9 Análise das proteínas das células AR3291/pFS8, AR3291/pFS9 e AR3291/pUC18 crescidas a 30°C**

Foram retirados 100µL do pré-inóculo feito com as células AR3291(IV.2.7). Este pré-inóculo foi utilizado para inocular uma nova cultura de 5mL de meio LB com ampicilina (100 µg/mL) e IPTG (concentração final de 1 mmol/L). Esta nova cultura foi incubada a 37°C, 180 rpm. Após 12 horas, as absorbâncias foram medidas a 600nm e anotadas, logo em seguida 1 mL de cada cultura foi retirado e centrifugado por 15 segundos a 10000g. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µL de tampão de amostra e fervidas por cinco minutos. A quantidade de proteína aplicada foi ajustada pela absorbância e os perfis protéicos de cada amostra foram analisados através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%.

#### **IV.2.10 Caracterização eletroforética em gel de poliacrilamida a 12% e coloração por prata**

---

Para a análise do perfil das proteínas das células AR3291 contendo os plasmídeos pFS8, pFS9 e pUC18, foi utilizado um sistema de eletroforese mini VE (Hoefer<sup>®</sup>) em gel de poliacrilamida a 12% em condições desnaturantes segundo metodologia descrita por Laemmli (1970). A corrida foi realizada com a voltagem inicial de 120 V e 40 mA e posteriormente a 60 mA.

Ao final da eletroforese o gel foi corado com prata conforme descrito por Blum *et al.*, (1987). O gel foi transferido pra a solução fixadora por 1 hora, e lavado três vezes em solução de etanol 50%, por 20 minutos em cada lavagem. Em seguida o gel foi incubado em solução de tiosulfato de sódio por 1 minuto e lavado três vezes com água destilada por 20 segundos em cada lavagem. Após este período o gel foi transferido para uma solução de nitrato de prata por 10 minutos e depois lavado com água destilada duas vezes por 20 segundos, cada lavagem. A revelação foi feita com solução reveladora, até que as bandas fossem visualizadas. A reação de coloração foi parada com solução de parada.

#### **IV.2.11 Caracterização do fenótipo de translocação de proteínas citoplasmáticas para o meio de cultura das células *E. coli* XL10 e AR3291/pFS8, AR3291/pFS9 e AR3291/pUC18**

Em uma placa de Petri contendo LB-ágar com ampicilina (100 µg/mL), IPTG (concentração final 1 mmol) e 20 µL de X-Gal foram palitadas uma colônia de cada célula AR3291 e XL10 transformadas com os plasmídeos pFS8, pFS9 e pUC18. A placa foi incubada a 37°C por 20 horas e depois analisadas.

---





Figura 3: Mapa dos plasmídeos pFS8 e pFS9

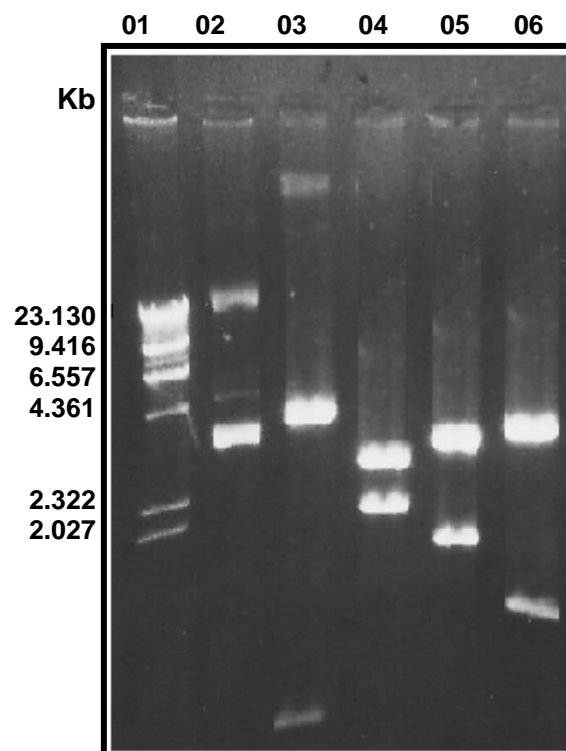


Figura 4: Análise eletroforética, em gel de agarose 1% com brometo de etídio, dos fragmentos obtidos após tratamento do plasmídeo pFS9 com as enzimas **EcoRI/HindIII**, **EcoRI/BamHI** e **PstI**. Na raia 01: marcador  $\lambda$ DNA/**HindIII**; raia 02: pFS9 intacto; raia 03: pFS9 digerido com **EcoRI/BamHI**; raia 04: pFS9 digerido com **EcoRI/HindIII**; raia 05: pFS9 digerido com **PstI** e raia 06: **BamHI/HindIII**.

## V.2 Análise da seqüência do gene *ftsH* e da seqüência deduzida de aminoácidos.

O fragmento de DNA clonado entre os sítios **BamHI/Sau3AI** do plasmídeo pFS9 apresenta 1.845 pb. A análise da seqüência deduzida de aminoácidos indica que a primeira metionina está localizada na posição +1. Na posição 199 encontra-se o início do módulo AAA, que é característico das proteínas pertencentes à família das AAA, ATPases Associadas a diversas Atividades celulares (Confalonieri e Duguet, 1995). Nas posições 236-248 e 281-285 encontram-se os motivos Walker A e B respectivamente. A região SRH (Segunda Região de Homologia) compreende os aminoácidos 341-355. Próxima a região carboxiterminal, na posição 472-476 encontra-se o motivo de ligação ao zinco que é característico das metaloproteases zinco dependente. A análise da seqüência também mostrou que o gene *ftsH* está incompleto, uma vez que não foi encontrado o códon de terminação desse gene. Assim o gene *ftsH* do plasmídeo pFS9 forma uma fusão com o gene *lacZ* do plasmídeo pUC19.

```

GGATCaggagctcgagctgcccggacgagtcagaagttcatggg
-105 ctgaccggtacggcggttcacgacgtacgacgccgagggcgctccc
-60 tcaccggagggggcgccctcagcgcgatgccgggctctttccggtgc
-15 cgtaccgtccgatataATGaccaatgcgccgccaccacggaaaacc
+1      M  T  N  A  P  P  P  R  K  T
28  ccggacaaaccgtggcgcacggagggcacctcggacgagtcgccc
11  P  D  K  P  W  R  T  E  G  T  S  D  E  S  P
73  cggcggatcggcggccggcggggcgccggggcgggtggtgggggtctc
26  R  R  I  G  G  R  R  A  P  G  G  W  W  G  L
118 gccgcccgcgcgggtcatcgtcttcctcatcgtctacgccgcgggtg
41  A  A  A  A  V  I  V  F  L  I  V  Y  A  A  V
163 acctacttcaccgcggccaacgaagcgcaccatctcgtacacggag
56  T  Y  F  T  A  A  N  E  A  T  I  S  Y  T  E
208 ttcagcaagcaggtcgccggcggcaacgtcaccaaggtctactcc
71  F  S  K  Q  V  A  G  G  N  V  T  K  V  Y  S
253 aagggcgacgcgatccaggggcagctgaagcggccgcaaccggag
86  K  G  D  A  I  Q  G  Q  L  K  R  P  Q  P  R
298 ccggggcggcggggagtacaccaccttcaagacgcagcgcggggcg
101 P  G  G  G  E  Y  T  T  F  K  T  Q  R  P  A
343 ttcgcccgcgacaagctctggcagaacctgacgcagcaccacgctc
116 F  A  D  D  K  L  W  Q  N  L  T  Q  H  H  V

```

131

146

155

388 accgtgacagcccagccggtggtgcaggaacgcagcttcctgtcc  
 T V T A Q P V V Q E R S F L S  
 433 aatctgctgatctcgctgctgcccgtgctgatcctggcggcggtg  
 N L L I S L L P L L I L A A V  
 478 tggatcttcatcgcccgtcgggtgcgacgggcctcggcggccccg  
 W I F I A R R V R T G L G G P  
 523 ggaggcatgctggggccgcagggcgccccccaggccggtggagctg  
 G G M L G R R A P P R P V E L  
 568 catccgggcatccgacgcaccacgttcggcggatgctgcccgggatc  
 191 H P G I R R T T F A D V A G I  
 613 gacgaggtcaagggcgagctgaacgacgctcgtcgcacttcctgagg  
 206 D E V K G E L N D V V D F L R  
 658 aaccggacgcgtaccgcagcatggggcgcaagatgccgcgaggc  
 221 N P D A Y R S M G A K M P R G  
 703 gtctgctgacgggcccggcgggacgggcaagacgcttgctggcc  
 236 **V L L T G P P G T G K T L** L A  
 748 cgggagggtggccggcgaggccggcgtgcccgttcttctccgcctcc  
 251 R A V A G E A G V P F F S A S  
 793 gcctccgagttcatcgagatgatcgtggggcgtcggcgcgtcccgc  
 266 A S E F I E M I V G V G A S R  
 838 gtccgcgaactggtcaacgagggcgcgcaaggccgctccctcgatc  
 281 V R E L F N E A R K A A P S I  
 883 atcttcatcgacgagatcgacacgatcggccgcgcccgcggcggc  
 296 I F I D E I D T I G R A R G G  
 928 ggctccggcacgggcccggccacgacgagcgcgagcagaccctgaac  
 311 G S G T G G H D E R E Q T L N  
 973 cagatcctcaccgagatggacggcttctccggctcggagggcgtg  
 326 Q I L T E M D G F S G S E G V  
 1018 atcgtcatcgcgccaccaaccgcgcggacatcctggacgcggcc  
 341 **I V I A A T N R A D I L D A A**  
 1063 ctgaccgggcccggcggccttcgaccgggtggtcagcgtctcgcgg  
 356 L T R P G R F D R V V S V S P  
 1108 ccggacagaggcggcgggaggcggatcctggagatccacacccgc  
 371 P D R G G R E A I L E I H T R  
 1153 gacatgcccctcgcggcggacgtggacctgccgcaggtggcccgg  
 386 D M P L A P D V D L P Q V A R  
 1198 atgaccccgggcatgaccggcgcggaactggccaacctcgccaac  
 401 M T P G M T G A E L A N L A N  
 1243 gaggcggcgtcctcgcgggtcaagcggcaacagcagcaggtggcg  
 426 E A A L L A V K R Q Q Q Q V A  
 1288 cagcacgacttcctggaggccctggagaaggtccagctgggtgccc  
 441 Q H D F L E A L E K V Q L G A  
 1333 gcacgctcgtcctgatgccggaggaggagcggcgccgcaccgccc  
 456 A R S L L M P E E E R R R T A  
 1378 taccacgagagcggacacgcactcctggggatgctgcagcccgggt  
 471 **Y H E S G H** A L L G M L Q P G  
 1423 gccgacccgggtccgcaagggtcaccatcgtgccgcgcggccgagcg  
 486 A D P V R K V T I V P R G R A  
 1468 ctgggggtgacgctgtcgcaccccggaggccgacagatacgcgtac  
 501 L G V T L S T P E A D R Y A Y  
 1513 acggaggagtatctgcgcggccgcacatcctcggcgcctcggcggc  
 526 T E E Y L R G R I I G A L G G  
 1558 atggccgcggaacacgtggtccttcgggggtcgtcaccaccggctcc  
 541 M A A E H V V F G V V T T G S  
 1603 gagaacgacctcgaacaggtcaccggcatcgcggcggcatggctc  
 556 E N D L E Q V T G I A R G M V  
 1648 gcccgctggggcatgagcgcggcgggtgggcccgttctcggccctc  
 571 A R W G M S E R V G R F S A L  
 1693 cccagcgcacgcagcaggcctacggcctcaccgcccggcccgcac  
 586 P S D A Q Q A Y G L T A A P H

1738 acact**GATCC**  
 T L

Figura 5: Sequência de nucleotídeos e aminoácidos deduzidos do gene *ftsH* de *Streptomyces* Y7. Em vermelho indicam o códon de iniciação e em negrito os sítios **BamHI/Sau3AI**. As setas indicam início e término do módulo AAA. Em azul claro e azul claro sublinhado estão identificados o motivo A e o motivo B, respectivamente; em azul escuro a SRH (segunda região de homologia) e destacado em rosa o sítio de ligação ao zinco.

A sequência obtida foi comparada com outras seqüências depositadas em banco de dados (NCBI) utilizando-se o programa BLAST (Altschul *et al.*, 1990). As seqüências de proteínas que já foram melhor estudadas, foram analisadas através do programa CLUSTAL X (Higgins & Sharp, 1988), como mostra a figura 6. Observam-se regiões de homologia ao longo de toda proteína. Observa-se a alta conservação verificada na região do módulo AAA e no sítio de ligação ao zinco. Verificou-se que a seqüência deduzida de aminoácidos apresenta identidade de 75, 44, 42, 43 e 43% com a proteína FtsH de *Streptomyces coelicolor*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Haemophilus influenzae*, *Yersinia pestis* e *Escherichia coli*, respectivamente.

Escherichia	-----MAKNLILWLVIHAVLMSVFSFGP	24
Yersinia	-----MAKNLILWLVIHAVLMSVFSFGP	24
Haemophilus	-----MVKNLVLWVVAVIMMTAYQSFNS	24
Bradyrhizobium	-----MNaNLRNFALWVIIVLLLLALFTLFQN	27
<i>ftsH2</i>	-----MWIVLA--VLAVVVLQVVGSSGGYKT	25
Bacillus	-----MNRVFRNTIFYLLILLVIVVSYFQT	27
Streptomyces	MTNPSPPRKAPEPPWRTEGTPDEPPKPPPGRRMRGGWNLILAALIVYLIANLVLSFFN	60
Y7	MTNAPPPRKTDPKPWRTEGTSDESPRR-IGRRAPGGWGLAAAIVFLIVYAAVTYFT	59
	:: : :	
Escherichia	SESNGRK--VDYSTFLQEVNNDQVREARIN---GREINVTKK-----DSNRYT	67
Yersinia	SESNGRR--VDYSTFMSDVTQDQVREARIN---GREINVSKK-----DNSKYT	67
Haemophilus	S-SVENS--TDYTTFVYDVSNQVTAARFD---ANEITVTKT-----DGSKYS	66
Bradyrhizobium	PGQRASSQDIAFSQLLSEVDRGNVRDVVIQ---GPDIHGTFT-----NGSSFQ	72
<i>ftsH2</i>	VD--TGQ--VVQAINDNRVESAKLTTGDEQTIK-VQLKDGQKVE-----GSSKIQ	70
Bacillus	SNPKTEN--MSYSTFIKNLDDGKVDVSVQPVVGVYEVKQQLK-----NYDKDQ	74
Streptomyces	E---GDEPTISYTEFSKQVDEGNVSKIYAK---GDAIQGQLKKNARDNPE-GDGYTKFT	
112		
Y7	A---ANEATISYTEFSKQVAGGNVTKVYSK---GDAIQGQLKRPQPRP--GGGEYTTFK	
110		
	: : :: .	
Escherichia	TYIP-VQDPKLLDNLTKNVKVVG-----EPP-EEPSLLASIFISWFPMLLLIGVWIFFM	
120		
Yersinia	TFIP-VNDPKLLDNLTKNVKVVG-----EPP-EEQSLASIFISWFPMLLLIGVWIFFM	
120		
Haemophilus	TVMPPLEDKKLLDNLTKNVKVVG-----TPF-ERRGFLSQILISWFPMLFLVGVWVFFM	
120		
Bradyrhizobium	TYAP--NDPTLVKRLYDSKVQITA-----KPPGDNPWFVSLVSWLPFIALIGVWIFLS	
125		
<i>ftsH2</i>	ASYIGDQGVTLANTLQNKYQDKQIPDGYTVSPKQNP-FVGILLSLLPFVLIVVVFLLFM	
129		
Bacillus	YFLTHVPEKGGADQIFNALKKTVDV---KVEPAQETSGWVTFLLTTIIPFVVIIFILFFLL	
130		







vermelho a o sítio de ligação ao zinco. Os aminoácidos destacados em verde são aqueles mais importantes para a determinação da região coiled coil.

### V.3 Dendograma representativo do grau de similaridade de seqüências de FtsH.

A análise filogenética da seqüência parcial deduzida de aminoácidos de FtsH de *Streptomyces* sp Y7 com outras depositadas em banco de dados forneceu o dendograma mostrado na figura 7.

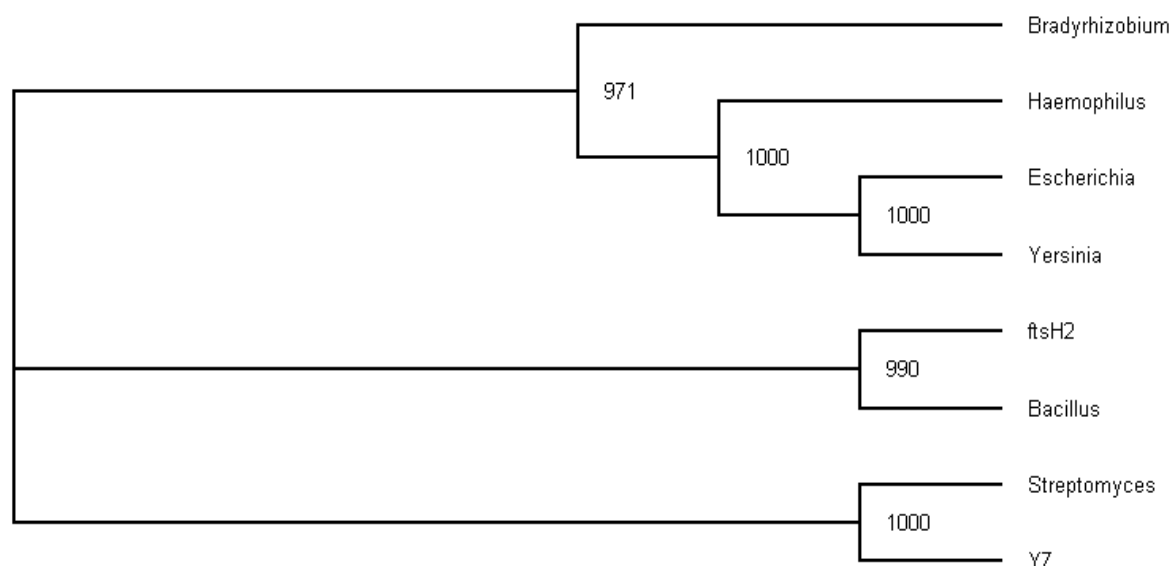


Figura 7: Dendograma agrupando FtsH de vários organismos. As seqüências utilizadas foram: Escherichia (*Escherichia coli*, n° de acesso:NP\_417645); Yersinia (*Yersinia pestis*, n° de acesso: NP\_668019); Haemophilus (*Haemophilus influenzae*, n° de acesso: NP\_439486); Bradyrhizobium (*Bradyrhizobium japonicum*, n° de acesso:CAB51029); ftsH2 (*Streptomyces coelicolor* 2, n° de acesso: NP\_); Bacillus (*Bacillus subtilis*, n° de acesso); Streptomyces (*Streptomyces coelicolor*, n° de acesso: NP\_629721) e Y7 (*Streptomyces* Y7). Os números nos nós representam os valores de bootstrap.

#### V.4 Predição das estruturas coiled-coil das proteínas FtsH codificadas pelos plasmídeos pFS8 e pFS9

Como o gene *ftsH* do *Streptomyces* Y7 clonado não está completo, ocorre uma fusão com trechos dos plasmídeos pUC18 (pFS8) e pUC19 (pFS9). As proteínas FtsH codificadas pelos plasmídeos pFS8 e pFS9, são portanto proteínas de fusão. Para se analisar a presença de estruturas tipo coiled-coil, foi utilizado a seqüência de aminoácidos das proteínas de fusão de pFS8 e pFS9 e só da proteína FtsH.

A seqüência deduzida de aminoácidos dos plasmídeos pFS8 (que contém o fragmento gênico no sentido contrário ao do promotor **lac** do plasmídeo pUC18) e pFS9 (contém o fragmento gênico no sentido do promotor **lac** do plasmídeo pUC19) foram analisadas através do programa Coils (Lupas, 1996). Os resultados dessas análises estão apresentados na figura 8.

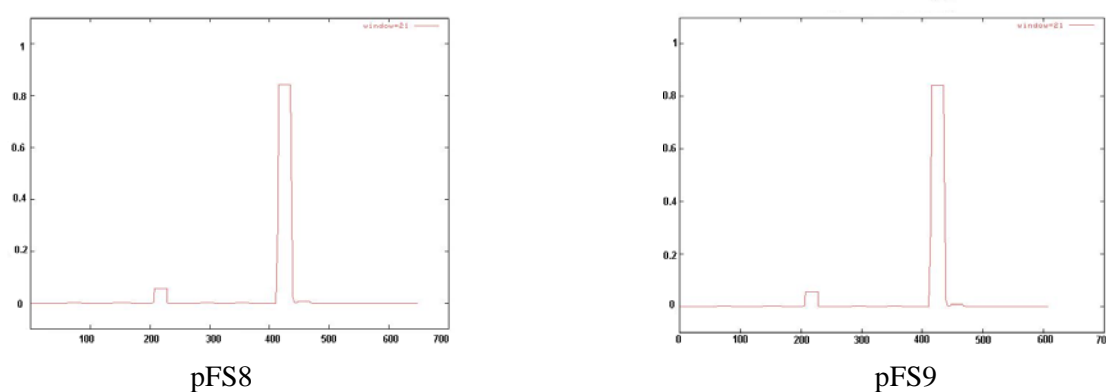
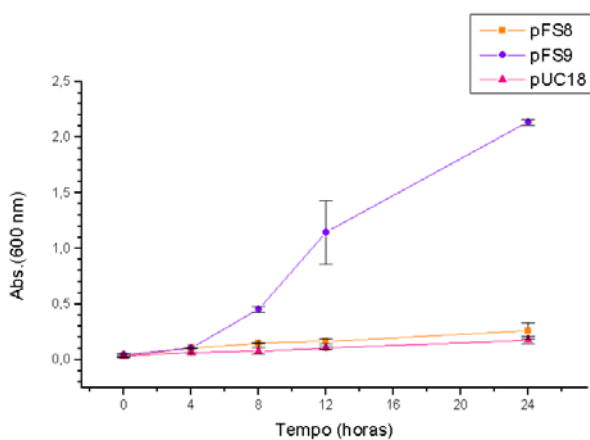


Figura 8: Predição da estrutura “coiled coil” na seqüência deduzida de aminoácidos dos plasmídeos pFS8 e pFS9. O programa coils foi rodado seguindo os seguintes parâmetros: matriz MTIDK, janela 21 e reforço nas posições **a** e **d** de 2.5x. O eixo x indica a posição dos aminoácidos e o eixo Y a probabilidade de formar “coiled coil”.

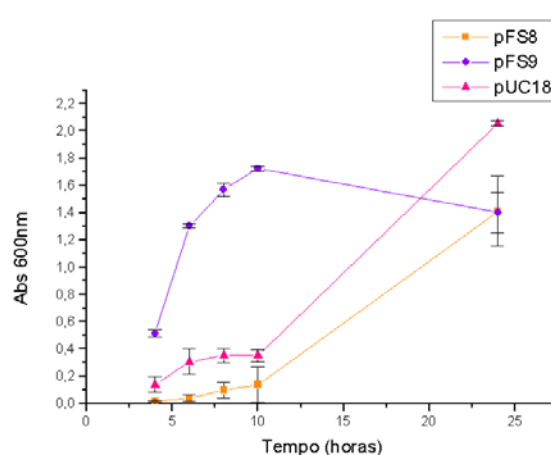
### V.5 Curva de crescimento das células AR3291 e AR3289 transformadas com os plasmídeos pFS8, pFS9 e pUC18

A expressão da seqüência parcial do gene *ftsH* de *Streptomyces cerradensis* foi avaliada em células AR3291 e AR3289 transformadas com os plasmídeos pFS8, pFS9 e pUC18. Os resultados da curva de crescimento demonstram que as células AR3291, transformadas com o plasmídeo pFS9 (AR3291/pFS9) recuperaram o crescimento, entretanto as células AR3291/pFS8 não apresentaram a mesma vantagem de crescimento, diferenciando-se muito pouco da célula AR3291/pUC18, que foi usada como controle, figura 9 a.

A curva de crescimento das células AR3289 transformada com os mesmos plasmídeos demonstrou que AR3289/pFS9 apresenta uma vantagem de crescimento nas primeiras 5 horas decaindo após 10 horas, entretanto para as células AR3289/pFS8 e AR3289/pUC18 esse crescimento é maior a partir das 10 horas, figura 9 b.



(a)



(b)

Figura 9: Curvas de crescimento das células AR3291 (a) e AR3289 (b) transformadas com os plasmídeos pFS8, pFS9 e pUC18. As células foram crescidas a 37°C em meio LB contendo ampicilina e IPTG.

#### V.6 Análise do fenótipo de translocação de proteínas citoplasmáticas (std) para o meio de cultura das células AR3291 e XL10 transformadas com os plasmídeos pFS8, pFS9 e pUC 18

A análise do fenótipo std demonstrou que as células AR3291/pUC18 apresentavam extravasamento da proteína  $\beta$ -galactosidase para o meio de cultura, assim como AR3291/pFS9. As células AR3291/pFS8 e XL10 transformadas com os mesmo plasmídeos não apresentaram essa característica, figura 10.

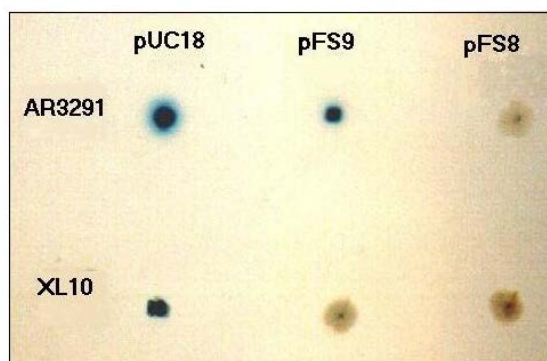


Figura 10: Análise do fenótipo std. Células AR3291 e XL10 crescidas a 37° em placas contendo LB-ágar, ampicilina, IPTG e X-Gal. As colônias com extravasamento de proteínas apresentam halo azul.

### V.7 Análise eletroforética das proteínas intracelulares das células AR3291 transformadas com os plasmídeos pFS8, pFS9 e pUC18

A análise das proteínas intracelulares das células AR3291 transformadas com os plasmídeos pFS8, pFS9 e pUC18 foi feita através de eletroforese em gel de poliacrilamida a 10%. Os resultados demonstram que não há diferença acentuada na produção das proteínas intracelulares.

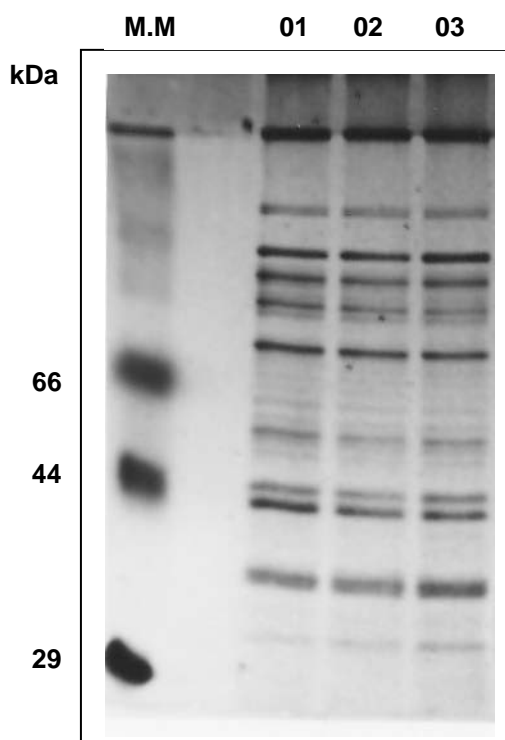


Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% corado com prata. M.M: marcador molecular; raia 01: AR3291/pFS8; raia 02: AR3291/pFS9; raia 03 AR3291/pUC18.

## VI DISCUSSÃO

Após análise dos clones isolados de bibliotecas genômicas construída por Penna (2001), foi selecionado o clone que apresentava homologia com o gene *ftsh* de outros organismos. A razão pela qual esse clone foi selecionado para estudo, deve-se ao fato de que a proteína codificada por esse gene em outros organismos desempenha diversas atividades na célula, que vão desde a manutenção de proteínas citoplasmáticas como as proteínas  $\sigma^{32}$  e  $\sigma^{24}$  (Tomoyasu *et al.*, 1995 e Shotland *et al.*, 1997) e proteínas de membrana como a SecY (Kihara *et al.*, 1995), além de ser a proteína responsável pela biossíntese de lipídeos de membrana (Ogura *et al.*, 1999).

As análises da digestão do plasmídeo original com enzimas de restrição (pFS8) demonstraram que o inserto apresenta aproximadamente 2.200 pb e os dados do seqüenciamento mostraram que o fragmento gênico estava clonado no sentido contrário ao do promotor **lac** e que estava incompleto sendo que a homologia com o gene de *ftsH* do *Streptomyces coelicolor* é perdida logo após um sítio de **BamHI/Sau3AI**. Assim a proteína FtsH produzida pelo plasmídeo pFS8 é resultante de uma fusão com o gene  $\beta$ -galactosidase do plasmídeo pUC18. Quando o inserto foi subclonado no plasmídeo pFS9 também houve a formação de uma proteína de fusão, a qual difere da codificada pelo plasmídeo pFS8 na extremidade carboxiterminal.

As seqüências deduzidas de aminoácidos foram comparadas com outras seqüências depositadas em banco de dados. As análises comparativas de homologia da seqüência de 640 resíduos de aminoácidos mostraram identidade de 75, 44, 42, 43 e 43% com a proteína FtsH de *Streptomyces coelicolor*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Haemophilus influenzae*, *Yersinia pestis* e *Escherichia coli*, respectivamente. A proteína de fusão produzida pelos plasmídeos pFS8 e pFS9 apresentam o módulo AAA, na região compreendida entre os nucleotídeos 657 a 1288, que é característico as outras proteínas FtsH, assim como o sítio de ligação ao zinco na posição 1383, que está relacionado com a atividade proteásica da proteína FtsH (Ogura e Wilkison, 2001; Schumann, 1999).

---

A seqüência deduzida de aminoácidos foi utilizada para se realizar uma análise filogenética com outras proteínas FtsH indicando que a proteína FtsH do *S. Y7* está muito próxima da proteína FtsH do *S. coelicolor* (figura 7).

A fim de verificar se o produto do gene *ftsH*, clonado nos plasmídeos pFS8 e pFS9 apresentavam atividade biológica, foi utilizada uma linhagem *Escherichia coli* AR3291, mutante em  $\Delta ftsH$ , que apresenta uma mutação supressora em *sfhC* e permite a viabilidade da célula (Ogura *et al.*, 1999). Essa célula apesar de ser viável, apresenta uma grande dificuldade de crescimento em temperaturas maiores do que 30°C. As células AR3291/pUC18 apresentaram uma grande dificuldade de crescimento, entretanto quando transformadas com o plasmídeo pFS9 recuperaram um padrão normal de crescimento. As células com os plasmídeos pFS8 apresentaram uma melhora no crescimento quando comparadas com as células transformadas com pUC18, mas não demonstraram uma recuperação semelhante à apresentada pelas células transformadas com pFS9. Esses resultados sugerem que a proteína de fusão produzida pelo plasmídeo pFS9 compensa a ausência do gene *ftsH*, o que entra em acordo com os trabalhos realizados por Naberhaus *et al.*, (1999), onde a proteína heteróloga produzida pelo gene de *ftsH* de *Bradyrhizobium japonicum* complementa a mutação em *ftsH* nas células AR3291 (figura 9).

As diferenças observadas entre o crescimento das células transformadas com pFS8 e pFS9 podem ser devido a dois fatores: 1 – a concentração da proteína FtsH deve ser maior nas células transformadas com pFS9, uma vez que nesse plasmídeo o gene de *ftsH* está sob controle do promotor **lac**. 2 – Nesses 2 plasmídeos a proteína FtsH é resultado de uma fusão com o plasmídeo pUC18 ou pUC19. Assim a extremidade carboxiterminal é diferente dependendo do sentido de clonagem do inserto. Uma mudança na extremidade carboxiterminal pode ocasionar uma diferença na atividade da proteína. Shotland *et al.*, (2000) demonstrou que na extremidade carboxiterminal existe uma  $\alpha$ -hélice que forma uma estrutura conhecida como coiled-coil. Essa estrutura é conservada em bactérias, cloroplastos e mitocôndrias e está relacionada com a atividade da proteína e alterações nessa região provocam modificações no perfil de atuação da FtsH, como por exemplo a queda na degradação de  $\lambda$ CII e  $\sigma^{32}$ .

A fim de verificar se o gene *ftsH* apresenta o mesmo efeito de toxicidade, descrito no trabalho de Akyama *et al.*, (1994), células de *E. coli* AR3289 foram transformadas com os plasmídeos pUC18, pFS8 e pFS9. Os resultados apresentados

---

mostraram que as células AR3289/pFS9 apresentaram um ganho de crescimento em relação às outras células nas primeiras 10 horas de cultivo. Após esse período observou-se uma queda acentuada no crescimento dessas células. As células transformadas com pUC18 e pFS8 demonstraram um crescimento contínuo, mesmo após 24 horas de incubação. Esses dados sugerem que o acúmulo de FtsH produzida pelo plasmídeo pFS9 é tóxico para essa célula (figura 9), estando de acordo com os trabalhos realizados por Akiyama . *et al.*, (1994).

A predição da região de coiled-coil para a proteína FtsH de *E. coli* sugere a existência de uma hélice anfipática na porção carboxiterminal. Em *S. coelicolor* essa região apresenta duas possíveis hélices, sendo a da porção carboxiterminal semelhante à apresentada pela FtsH de *E. coli*. A proteína FtsH de *B. subtilis* apresenta 3 possíveis hélices, sendo a última semelhante a de *E. coli* (figura 12). Os resultado da predição das proteínas de fusão dos plasmídeos pFS8 e pFS9 não apresentam a  $\alpha$ -hélice característica desses organismos, justamente devido a fusão com o plasmídeo pUC18 e pUC19.

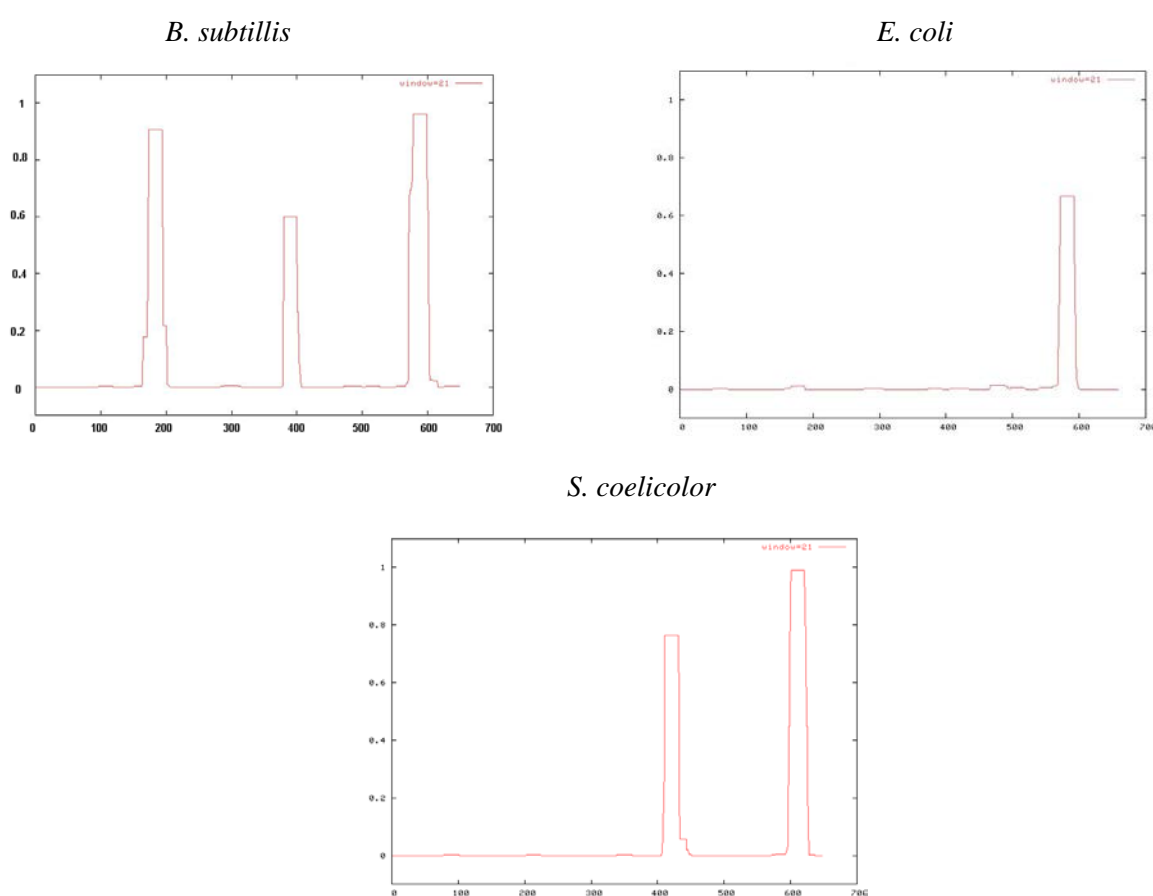


Figura 12: Predição das regiões de “coiled coil” das proteínas FtsH de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Streptomyces coelicolor*.

Vários fenótipos têm sido observado em mutantes *ftsH* tais como o, Tol<sup>-</sup> (tolerância a colicina) (Qu *et al.*, 1996) e Hfl<sup>-</sup> (alta frequência de lisogenização) (Herman *et al.*, 1993) e Std<sup>-</sup> (translocação anormal de proteínas) (Akiyama *et al.*, 1994). Em *E. coli* a proteína SecY é importante na translocação de proteínas, ela existe na membrana e encontra-se complexada com SecE, quando ocorre algum problema e SecY não forma esse complexo, ela se torna alvo da proteína FtsH. Assim na ausência de FtsH e com o acúmulo de SecY ocorre um translocação anormal de proteínas citoplasmáticas para o exterior, o que caracteriza o fenótipo Std<sup>-</sup>.

Para verificar se a proteína de fusão produzida por pFS9 e pFS8 complementavam a mutação para o fenótipo Std<sup>-</sup>, células AR3291 e XL10 foram transformadas com esses plasmídeos e com o plasmídeo controle pUC18. Nas células AR3291/pUC18 pode se observar que a proteína  $\beta$ -galactosidase extravasa para o meio de cultura. Células de XL10 transformadas com o mesmo plasmídeo não apresentam esse extravasamento. As células de AR3291/pFS8 apresentaram um fenótipo semelhante ao das células de XL10, as quais não apresentam o fenótipo de extravasamento. Essas diferenças devem ser resultantes das diferenças entre as extremidades carboxiterminais, que de alguma forma levam a uma maior ou menor capacidade de degradar SecY. Os resultados demonstraram que a proteína de fusão produzida por pFS8 é capaz de inibir a translocação de proteínas do meio citoplasmático para o meio externo, provavelmente por conseguir degradar SecY, indicando sua atividade (figura 10).

---

## VI CONCLUSÃO

- Os dados do seqüenciamento mostraram que o gene *ftsH* clonado não está completo;
  - A clonagem desse gene nos plasmídeos pUC18 e pUC19 resulta na formação de proteínas de fusão diferentes;
  - Células de *E. coli* AR3291 transformadas com os plasmídeos pFS8 e pFS9 apresentam fenótipos diferentes. A transformação com pFS9 é capaz de recuperar o crescimento dos mutantes AR3291;
  - A análise das proteínas de fusão produzidas pelos plasmídeos pFS8 e pFS9 através do programa Coils, mostra que estas não formam a estrutura “coiled coil” na região carboxiterminal, característica das FtsH;
  - A proteína produzida por pFS8 inibe a translocação errada das proteínas citoplasmáticas (fenótipo Std).para o meio de cultura, enquanto a proteína produzida pelo pFS9 diminui, porém não inibe totalmente essa a translocação.
-

## VII PERSPECTIVAS

- Obtenção da seqüência completa do gene *ftsH* do *Streptomyces* Y7;
  - Análise da expressão da proteína através de experimentos Western-blot e Northern-blot;
  - Estudar como as proteínas de fusão agem sobre as proteínas  $\sigma^{32}$  e SecY.
-

## VIII BIBLIOGRAFIA

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W. e LIPMAN, D.A. Basic local alignment search tools. **J. Mol. Biol.** 215: 403-410, 1990.

AKIYAMA, Y.; SHIRAI, Y.; e ITO, K. Involvement of FtsH in protein assembly into and through the membrane. **J. Biol. Chem.** 269: 5225-5229, 1994.

AKIYAMA, Y.; YOSHIHISA, T. e ITO, K. FtsH a membrane-bound ATPase forms a complex in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** 270:23485-23490, 1995.

AKIYAMA, Y., KIHARA, A., ITO, K. Subunit a of proton ATPase Fo sector is a substrate of the FtsH protease in *Escherichia coli*. **FEBS Lett.** 399(1-2):26-8, 1996.

AKIYAMA, Y., ITO, K. Roles of homooligomerization and membrane association in ATPase and proteolytic activities of FtsH *in vitro*. **Biochemistry**, 40(25):7687-93, 2001.

ALEXANDER, M. Microbial ecology. *In*: \_\_\_\_ (ed.). **Introduction to soil microbiology**. New York: John Wiley and Sons, 1977, p.36-51.

AMARA, R. R., SHANTI, S., SATCHIDANANDAM, V. Characterization of novel immunodominant antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology**,

---

144(Pt5):1197-203,1998.

ANILKUMAR, G., CHAUHAN, M.M., AJITKUMAR, P. Cloning and expression of the gene coding for FtsH protease from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. **Gene**,214(1-2):7-11,1998.

ARAI, T. What are actinomycetes? *In*: MIYADOH, S.; HAMADA, M.; HOTTA, K.; KUDO, T.; SEINO, A.; VOBIS, G.; YOKOTA, A. **Atlas of actinomycetes**. Japan: The Society of Actinomycetes, Asakura Publishing CO., ltda., p. 180-191, 1997.

AZEREDO, L.A.I; LEITE, S.G.F.; FREIRE, D.M.G.; BENCHETRIT, L.C.; COELHO, R.R.R. **Journal of Microbiology Methods**, 45: 207-212, 2001.

BATE, N.; BUTLER, A. R.; SMITH, I. P.; e CUNDLIFE, E. The mycarose-biosynthetic genes of *Streptomyces fradiae*, producer of tylosin. **Microbiology**, 146, 139-146, 2000.

BENHAMOU, N. Cytochemical localization of  $\alpha$ -D-glucans in plant and fungal cells using in exoglucanase-gold complex. **Electronic Microscopy review**, 2: 123-138, 1989.

BERTANI, D.; OPPENHEIM, A.B. e NARBERHAUS, F. An internal region of the RpoH heat shock transcription factor is critical for rapid degradation by the FtsH protease. **FEBS L.** 493: 17-20, 2001.

BLIFFELD, M.; MUNDY, J.; POTRYKUS, I. & FÜTTERER, J. Genetic engineering of wheat for increased resistance to powdery mildew disease. **Theor. Appl. Genet.** 98:1079-1086, 1999.

BLUM, H.; BEIER, H. e GROSS, H. Binding and substrates specificities of a *Streptomyces olivaceoviridis* chitinase in comparison with its proteolitically processed form. **European Journal Biochemistry** 229: 132-139, 1987.

---

BRASIL, M. M. e BATAUS, L. A. M. Relatório bolsa de ITI - RHAE. **Levantamento da diversidade microbiana do solo de cerrado**. Universidade Federal de Goiás - ICB - DCF - Laboratório de Bioquímica Engenharia Genética. Goiânia - Goiás. 1998.

CONFALONIERI, F. e DUGUET, M. A 200 aminoacid ATPase module in search of a basic function. **BioEssays** 17:639-650, 1995.

ENSING, J. C. Formation, properties and germination of actinomycetes spores. **Annual Review of Microbiology**, 32:185-219, 1978.

FAUST, B.; HOFFMEISTER, D.; WEITNAUER, G.; WETRICH, L.; HAAG, S.; SCNEIDER, P.; DECKER, H.; KÜNZEL, E.; ROHR, J.; BECHTHOLD, A. Two new tailoring enzymes, a glycosyltransferase and an oxygenase, involved in biosynthesis of the angucycline antibiotic urdamycin A in *Streptomyces fradiae* Tü 2717. **Microbiology**, 146: 147-154, 2000.

GAGNAT, J.; CHOUAYEKH, H.; GERBAUD, C.; FRANCOU, F.; & VIROLLE, M. J. Disruption of *sblA* in *Streptomyces lividans* permits expression of a heterologous  $\alpha$ -amilase gene in the presence of glucose. **Microbiology**, 145: 2303-2312, 1999.

GAUTSH, J.W.; WULFF, D. L. Fine structure mapping complementation and physiology of *Escherichia coli hfl* mutants. **Genetics**, 77: 435-448, 1974.

GRANGER LL, O'HARA EB, WANG RF, MEFFEN FV, ARMSTRONG K, YANCEY SD, BABITZKE P, KUSHNER SR. The *Escherichia coli mrsC* gene is required for cell growth and mRNA decay. **J. Bacteriol.** 180(7):1920-1928, 1998.

GOODFELLOW, M. e WILLIAMS, S. T.. Ecology of actinomycetes. **Ann. Rev. Microbiol.**, 37:189-216,1983.

GRANGER, I. I.; O'HARA, E. B.; WANG, R. F.; MEFFEN, F. Y.; ARMSTRONG, K.; YANCEY, S. D.; BABITZKE, P. e KUSHNER, S. R. The *Escherichia coli mrsC* gene is required for cell growth and mRNA decay. **J. Bacteriol.** 114: 207-218, 1998.

---

GRENIER, J.; BENHAMOU, N. e ASSELIN, A. Coloidal gold complexed chitosanase: a new probe for ultrastructural localization of chitosan in fungi. **J. Gen. App. Microbiol.**,137: 2007-2015, 1991.

GUPTA, R.; SAXENA, R. K.; CHATURVEDI, P. e VIRDI, J. S. Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. **J. App.Bacterial.**, 78:378-383, 1995.

HARTL, F.U. Molecular chaperones in cellular protein folding. **Nature**, 381: 571-580, 1996.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, 166(4):557-580, 1983.

HERMAN, C.; OGURA, T.; TOMOYASU, T.; HIRAGA, S.; AKIYAMA, Y.; ITO, K.; THOMAS, R.; D'ARI, R. e BOULOC, P Cell growth and  $\lambda$  phage development controlled by the same essential *Escherichia coli* gene, *ftsH hflB*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90: 10861-10865, 1993.

HIGGINS, D.G. e SHARP, P.M. CLUSTAL: a package for performing multiple sequence alignment on a microcomputer. **Gene** 73, 237-244, 1988.

HOLT, J. G.; KRIEG, N. R.; SNEATH, P. H.; STALEY, J. T.; WILLIAMS, S. T. **Berguey's manual of determinative bacteriology.**, 9 ed., Baltimore: Williams & Wilkins, 1994.

INOUE, H.; NOJIMA, H. e OKAYAMA, H. High efficiency of *Escherichia coli* with plasmids. **Gene**, 96:23-28,1990.

JAYASEKERA M. M, FOLTIN S. K, OLSON E. R, HOLLER T. P. *Escherichia coli* requires the protease activity of FtsH for growth. **Arch. Biochem. Biophys.**, 380(1):103-7, 2000.

---

KANTOLA, J.; KUNNARI, T.; HAUTALA, A.; HAKALA, J.; YLINHONKO, K.; MÄNTSÄLA, P. Elucidation of anthracyclinone biosynthesis by stepwise cloning of genes for anthracyclines from three different *Streptomyces* spp. **Microbiology**, 146: 155-163, 2000.

KIHARA, A.; AKIYAMA, Y.; ITO, K. FtsH is required for proteolytic elimination of uncomplexed forms of SeCY, an essential protein translocase subunit. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92:4532-4536, 1995.

KIHARA, A.; AKIYAMA, Y.; ITO, K. Different pathways for protein degradation by the FtsH/HflKC membrane-embedded protease complex: an implication from the interference by a mutant form of a new substrate protein, YccA. **J. Mol. Biol.** 279, 175-198.

KIHARA, A.; AKIYAMA, Y.; ITO, K. Revisiting the lysogenization control of bacteriophage lambda. Identification and characterization of a new host component, HflD. **J. Biol. Chem.**, 276(17): 13695-700., 2001.

KORN-WENDISH, F.; KUTZNER, H. J. The family Streptomycetaceae. *In*: BALOWA, A.; TRÜPER, H. G.; DWORKIN, M.; HARDER, W. e SCHLEIFER, K. H. (eds.). **The prokaryotes**. Springer-Verlag, 1992. p. 921-995.

KRZYWDA S, BRZOZOWSKI A, VERMA C, KARATA K, OGURA T, WILKINSON A. The Crystal Structure of the AAA Domain of the ATP-Dependent Protease FtsH of *Escherichia coli* at 1.5 Å Resolution. **Structure (Camb)**, 10(8):1073, 2002.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227: 680-685, 1970.

LEFFERS, G. G. e GOTTESMAN, S. Lambda Xis degradation in vivo by Lon and FtsH. **J. Bacteriol.** 171: 1573-1577, 1998.

---

LOCCI, R. Developmental micromorphology of actinomycetes. *In*: Arai, T. (ed.). **Actinomycetes: The boundary microorganisms**. Baltimore. University Park Press: 1976, p.249-297.

LOCCI, R.; SHARPLES, G. P. Morphology. *In*: GOODFELLOW, M., MORDASKI, M.; WILLIAMS, S. T. (ed.). **The biology of actinomycetes**. London, Academic Press: 1984. cap.3, p. 165-199.

LUPAS, A. Coiled coils: new structures and new functions. **Trends. Biochem. Sci.** 21:375-398, 1996.

LYSENKO E, OGURA T, CUTTING SM. Characterization of the ftsH gene of *Bacillus subtilis*. **Microbiology**, 143 ( Pt 3):971-8, 1997.

MAITAN, V. R.; BATAUS, L. A. M. **Levantamento da diversidade microbiana em solos de Cerrado**, 1997, Relatório bolsa DTI – RHAE, Universidade Federal de Goiás – ICB – DCIF- Laboratório de Bioquímica e Engenharia Genética. Goiânia – Goiás.

MAKINO, S.; MAKINO, T.; ABE, K.; HASHIMOTO, J.; TATSUTA, T.; KITAGAWA, M.; MORI, H.; OGURA, T.; FUJI, T.; FUSHINOBU, S.; WAKAGI, T.; MATSUZAWA, H.; MAKINO, T. Second transmembrane segment of FtsH plays a role in its proteolytic activity and homo-oligomerization. **FEBS Lett.**, 467(2-3):365, 2000.

MATSUZAWA, H.; USHIYAMA, S.; KOYAMA, Y.; OHTA, T. *Escherichia coli* K-12 *tol-Z* mutants tolerant to colicins E1, E2, E3, D, Ia and Ib: defect in generation of electrochemical proton gradient. **J. Bacteriol.** 160: 733-739, 1984.

MIYASHITA, K.; FUJII, T. SAWADA, Y. Molecular cloning and characterization of chitinase genes from *Streptomyces lividans* 66. **J. Gen. Microbiol.**137: 2065-2072, 1991.

---

NARBERHAUS, F.; URECH, C.; HENNECKE, H. Characterization of the *Bradyrhizobium japonicum* *ftsH* gene and its product. **J. Bacteriol.**, 181(23):7394-7, 1999.

OGURA, T. INOUE, K. TATSUTA, T. SUZAKI, T.; KARATA, K.; YOUNG, K.; SU, L.H.; FIERKE, C.A.; JACKMAN, J.E.; RAETZ, C.R.; COLEMAN, J.; TOMOYASU, T.; MATSUZAWA, H. Balanced biosynthesis of major membrane components through regulated degradation of the committed enzyme of lipid A biosynthesis by the AAA protease FtsH (HflB) in *Escherichia coli*. **J. Mol Microbiol.**, 31(3): 833-844 1999.

OGURA, T. e WILKISON, A. J. AAA<sup>+</sup> superfamily ATPases: commom structure-diverse function. **Genes Cells**, 6: 575-595, 2001.

PENNA, K.G. B. D. Construção de bibliotecas genômicas de duas espécies de *Streptomyces* isoladas de solo de cerrado. 2001. Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Goiânia: Universidade Federal de Goiás.

PIRET, J. M. e DEMAINE, A. L. Actinomycetes in biotechnology: An overview. *In: Actinomycetes in biotechnology.* (eds.). GOODFELLOW, M., WILLIAMS, S. T. & MODARSKI, M., Academic Press, cap.11, p. 461-482. 1988

PRIDHAM, T. G.; ANDERSON, P.; FOLEY, C.; LINDENFELSER, L. A.; HESSELTINE, C. W.; BENEDICT, R. G. A selection of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. **Antibiotics Ann.**, 947-953, 1956. apud SHIRLING, E. B.; Gottlieb, D. (1966). *Methods of characterization of Streptomyces*.

QU, J-N.; MAKINO, S.; ADACHI, H.; KOYAMA, Y.; AKIYAMA, Y.; ITO, K.; TOMOYASU, T.; OGURA, T.; e MATSUZAWA, H. The *tolZ* gene of *Escherichia coli* is identified as the *ftsH* gene. **J. Bacteriol.** 178: 3457-3461, 1996.

RODERIC D.M., TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers **Unpublished in the Biosciences.** 12 357-358, 1996.

---

ROHR, J.; THIERICKE, R. Angucycline group antibiotics. **Nat. Prod. Rep.** 9: 103-137, 1992.

SAIKAWA N, ITO K, AKIYAMA Y. Identification of glutamic acid 479 as the gluzincin coordinator of zinc in FtsH (HflB). **Biochemistry**, 41(6):1861-1868, 2002.

SAMBROOK, J.; Fritsch, E. F. ; Maniatis, T. Molecular cloning – A laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989.

SANTOS, D.; ALMEIDA, D.F. Isolation and characterization of a new temperature sensitive cell division mutant of *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.** 174: 1502-1507, 1975.

SCHUMANN, W. FtsH--a single-chain chaperonin? **FEMS Microbiol. Rev.**,23(1): 1-11,1999.

SHAPIRO, R.; ORDENTLICH, A.; CHET, I. & OPPENHEIM, A. B. Control of plant diseases by chitinase expressed from cloned DNA in *Escherichia coli*. **Phytopathol.** 79:1246-1249, 1989.

SHOTLAND, Y.; KOPY, S.; TEFF, D.; MANSUR, N.; OREN, D. A.; TATEMATSU, K.; TOMOYASU, T.; KESSEL, M. e OPPENHEIM, A. B. Proteolysis of the phage  CII regulatory protein by FtsH (HFLB) of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 24: 1303-1310, 1997.

SHOTLAND, Y.; SHIFRIN, A.; ZIV, T.; TEFF, D.; KOPY, S.; KOBILER, O.; OPPENHEIM, A.B. Proteolysis of bacteriophage lambda CII by *Escherichia coli* FtsH(HflB). **J. Bacteriol.**, 182(11):3111-3116, 2000.

SHOTLAND, Y.; TEFF, D.; KOPY, S.; KOBILLER, O.; e OPPENHEIM, A. B.; Characterization of a conserved alpha-helical, coiled-coil motif at the C-terminal domain of the ATP-dependent FtsH (HflB) protease of *Escherichia coli*. **J. Mol Biol.**, 299(4):953-64, 2000.

---

SOBRINHO, I. S. Jr. Estudos de uma N-acetil-glucosaminidase produzida por *Streptomyces sp* , 1999, Dissertação de Mestrado. Instituto de Ciências Biológicas, Goiânia: Universidade Federal de Goiás.

TATSUTA, T.; TOMOYASU, T.; BUKAU, B.; KITAGAWA, M.; MORI, H.; KARATA, K.; e OGURA, T. Heat shock regulation in the *ftsh* null mutant of *Escherichia coli*: dissection of stability and activity control mechanisms of sigma 32 *in vivo*. **Mol. Microbiol.** 30:583-593, 1998.

TATSUTA ,T.; JOOB, D.M.; CALENDAR, R.; AKIYAMA, Y.; OGURA, T. Evidence for an active role of the DnaK chaperone system in the degradation of sigma(32). **FEBS Lett.**, 478(3):271-5, 2000.

TOMOYASU, T.; YAMANAKA, K.; MURATA, K.; SUZAKI, T.; BOULOC, P.; KATAO, A.; NIKI, H.; HIRAGA, S.; OGURA, T. Topology and subcellular localization of FtsH protein in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 175: 1352-1357, 1993(a).

TOMOYASU, T.; YUKI, T.; MORIMURA, S.; MORI, H; YAMANAKA, K.; NIKI, H.; HIRAGA, S.; OGURA, T. The *Escherichia coli* FtsH protein is a prokaryotic member of a protein family of putative ATPases involved in membrane functions, cell cycle control and gene expression. **J. Bacteriol.** 175: 1344-1351, 1993(b).

TOMOYASU, T.; GAMER, J.; BUKAU, B; KANEMORI, M.; MORI, H.; RUTMAN, A.J.; OPPENHEIM, A.B., YURA, T.; YAMANAKA, K.; NIKI, H. *Escherichia coli* FtsH is a membrane bound, ATP-dependent protease which degrades the heat-shock transcription factor  $\sigma^{32}$  **EMBO J.** 14: 2551-2560, 1995.

TOMOYASU, T.; ARSENE, F.; OGURA, T.; BUKAU, B. The C terminus of sigma(32) is not essential for degradation by FtsH. : **J. Bacteriol.**, 183(20): 5911-7, 2001.

---

VOBIS, G. Morphology of actinomycetes. *In*: MIYADOH, S.; HAMADA, M.; HOTTA, K.; KUDO, T.; SEINO, A.; VOBIS, G.; YOKOTA, A. **Atlas of actinomycetes**. Japan: The Society of Actinomycetes, Asakura Publishing CO., Itda, 1997. p. 180-191.

VYAS, P.R. e DESHPANDE, M. V. Chitinase production by *Myrothecium verrucaria* and its significance for fungal mycelial degradation. **J. Gen. App. Microbiol.** 35: 343-350, 1989.

WILLIAMS, S. T., LANNING, S.; WELLINGTON, M. H. Ecology of actinomycetes. *In*: GOODFELLOW, M., MORDASKI, M. E WILLIAMS, S. T. (ed.). **The biology of actinomycetes**. London: Academic Press, 1984, cap.3, p. 481-527.

YOKOTA, A. Philogenetic relationship of actinomycetes. *In*: MIYADOH, S.; HAMADA, M.; HOTTA, K.; KUDO, T.; SEINO, A.; VOBIS, G.; YOKOTA, A. **Atlas of actinomycetes**. Japan: The Society of Actinomycetes, Asakura Publishing CO., Itda, 1997. p. 194-197.

---