

# CARACTERIZAÇÃO DO FATOR DE TERMINAÇÃO DE TRANSCRIÇÃO Rho DE *Caulobacter crescentus*

Valéria Cristina da Silva Italiani

## I. INTRODUÇÃO

*Caulobacter crescentus*, uma bactéria gram-negativa e não patogênica cujo habitat inclui todos os ambientes aquáticos e muitos tipos de solo (Poindexter, 1981) tem sido extensivamente estudada por seu ciclo celular único, no qual duas células filhas distintas são geradas através de diferenciação e de divisão celular assimétrica. O programa gênico envolvido no controle deste ciclo esta bem estudado e várias proteínas regulatórias importantes já foram identificadas e caracterizadas (Laub *et al.*, 2002; Skerker e Laub, 2004). Por outro lado, pouco se conhece a respeito da influência do meio ambiente no ciclo celular dessa bactéria, sendo que poucos genes envolvidos neste aspecto da fisiologia bacteriana foram caracterizados nessa espécie. Em meu trabalho de dissertação de mestrado (Italiani, 2001), cujo objetivo foi o de promover o isolamento de mutantes deficientes na resistência de *C. crescentus* a várias condições ambientais, e fazer a identificação de genes que fossem importantes para a sobrevivência da bactéria nestas condições, foi possível isolar seis mutantes deficientes na sobrevivência ou recuperação da fase estacionária. Em um destes mutantes (linhagem SP3710), o Tn5 interrompeu o gene que codifica para o fator de terminação de transcrição Rho.

A terminação de transcrição em bactérias representa um importante caminho na regulação da expressão gênica. Em procariotos foram descritos dois sistemas distintos de terminação de transcrição. Enquanto um deles requer o fator Rho, o outro depende da estrutura secundária e da seqüência intrínseca do mRNA. O fator Rho é uma proteína multimérica bastante conservada que consiste de seis sub unidades arranjadas em uma estrutura na forma de anel, que se liga nas moléculas de mRNAs nascentes em regiões ricas em citosina que não formam estruturas secundárias, denominadas de sítios de utilização de Rho (*rut*) (Richardson 1990). Uma vez ligado, o hexâmero Rho hidrolisa ATP e se move na direção 5'-3' ao longo do RNA até alcançar o complexo de transcrição. Com sua função de RNA-DNA helicase, Rho desfaz o complexo de transcrição, separando o mRNA da RNA polimerase e do molde de DNA (Morgan *et al.*, 1983; Richardson, 2002). Em nosso trabalho anterior foi demonstrado que a mutação no gene *rho* de *C. crescentus* gerada pela inserção do transposon Tn5 na linhagem SP3710 causou uma deficiência na sobrevivência a alta

concentração de sal, pH ácido e uma extrema sensibilidade ao estresse oxidativo (Italiani *et al.*, 2002). Também foi demonstrado que a transcrição do gene *rho* de *C. crescentus* aumenta na linhagem mutante *rho*, indicando um circuito autoregulatório negativo (Italiani *et al.*, 2002). Neste trabalho aprofundamos a análise do papel da proteína Rho de *Caulobacter crescentus* e de sua regulação, tentando estabelecer os mecanismos moleculares pelos quais a resposta ao estresse oxidativo é afetada por Rho.

## II. MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Linhagens bacterianas, condições de crescimento e procedimentos genéticos.

As linhagens de *C. crescentus* foram cultivadas a 30°C em meio PYE (Ely, 1991) e as linhagens de *E. coli* foram crescidas a 37°C em meio LB. Quando necessário, foram suplementados com os antibióticos apropriados. Os plasmídeos foram introduzidos em *Caulobacter* por conjugação com *E. coli* S17-1 (Simon *et al.*, 1983). A análise da presença de Rho foi feita por ensaio de Western Blot (Towbin *et al.*, 1979) usando soro policlonal anti-Rho obtido através de injeções em coelhos. O ensaio de extensão de oligonucleotídeo foi feito utilizando o oligonucleotídeo Rho1 (Figura 1) como descrito em Sambrook *et al.* (2001). A proteína His-Rho foi expressa no vetor pProEx-HT (Invitrogen) em *E. coli* DH5 e purificada em colunas de resina de níquel (Qiagen). O ensaio de alteração de mobilidade em gel para RNA foi feito como descrito em Jiang *et al.* (1997), utilizando uma sonda de RNA que se estende do oligonucleotídeo Rho6 ao Rho12 (Figura 1) e a proteína His-Rho purificada e dialisada no tampão de ligação. A sensibilidade da linhagem NA1000 de *C. crescentus* a biciclomicina foi determinada pela medida da densidade óptica (600 nm) de culturas crescidas na presença de diferentes concentrações do antibiótico e a análise da expressão das regiões regulatórias de *rho* foram feitas na presença de 100 µg/ml de biciclomicina. Maiores detalhes dos métodos podem ser consultados em Italiani e Marques (2005).

### 2. Construção de linhagens de *C. crescentus* com o gene *rho* deletado e substituído por um cassete de resistência a antibiótico

O fragmento de 3,4 Kb que flanqueia o gene *rho* foi amplificado por PCR e clonado no plasmídeo pNPTS138. Em seguida, um fragmento de 1,0 Kb contendo a região codificadora de *rho* foi substituída por um cassete de resistência a espectinomicina (Prentki and Krisch, 1984). O plasmídeo modificado foi introduzido em *C. crescentus* e o gene *rho* completo foi deletado por troca alélica após duplo evento de recombinação. Uma cópia do gene *rho in trans* no plasmídeo pMR20 (Italiani *et al.*, 2002) foi introduzida nos clones 1S e 4S após o primeiro evento de recombinação. A porcentagem de células que sofreram a segunda

recombinação foi determinada pelo número de clones que se mostraram sensíveis a canamicina e resistentes a espectinomicina. As deleções foram confirmadas por Southern Blot.

### **3. Ensaio de $\beta$ -galactosidase das fusões de transcrição e tradução.**

As regiões regulatórias do gene *rho* foram amplificadas por PCR e clonadas no vetor TOPO (Invitrogen) para confirmação das seqüências. Em seguida foram clonadas nos vetores pRKlacZ290 (Gober and Shapiro, 1992) formando uma fusão de transcrição e no pJBZ282 formando uma fusão de tradução. Em seguida os vetores foram introduzidos nas linhagens de *C. crescentus* por conjugação ou eletroporação. Como o plasmídeo pJBZ282 não se replica em *C. crescentus* ele foi integrado no cromossomo desta bactéria por recombinação homóloga. A atividade de  $\beta$ -galactosidase foi medida através do método de Miller (Miller, 1972).

### **4. Ensaio de RT-PCR**

O RNA total das linhagens foi extraído com Trizol (Invitrogen) e o DNA contaminante foi eliminado pelo tratamento com DNaseI (Promega). Nas reações de RT-PCR semi-quantitativo foram feitas reações padrão para garantir que a amplificação dos genes não atingisse a saturação. As reações foram feitas utilizando o kit SuperScript™ One -Step RT-PCR (Invitrogen). Nas reações de RT-PCR em tempo real os RNAs tratados foram utilizados como molde para a síntese dos cDNAs correspondentes utilizando o kit SuperScript III First - Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) e as reações de qRT-PCR foram feitas utilizando o kit Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen).

## **III. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Este trabalho está dividido em duas grandes partes centrais. A primeira delas aborda o estudo da essencialidade e autoregulação do gene *rho* de *Caulobacter crescentus*, cujos resultados já foram publicados (artigo anexado neste documento). A segunda parte está relacionada com o estudo da participação da proteína Rho na regulação do estresse oxidativo em *Caulobacter crescentus*. É importante lembrar que só estão mostradas as figuras mais importantes para o entendimento do trabalho, devido à falta de espaço.

### **1. Estudo da essencialidade e autoregulação do fator de terminação de transcrição Rho de *Caulobacter crescentus***

#### **A) Análise da essencialidade de Rho em *C. crescentus***

Estudos com *E. coli*, *Rhodobacter sphaeroides* e *Micrococcus luteus* mostraram que o gene *rho* é essencial nestas bactérias (Das *et al.*, 1976; Gomelsky e Kaplan, 1996; Nowatzke

*et al.*, 1997). Todavia, este gene não se mostrou essencial para a viabilidade de *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (Quirk *et al.*, 1993; Washburn *et al.*, 2001). A fim de verificar a importância deste gene na sobrevivência de *C. crescentus*, tentamos gerar um mutante *rho* nulo. Esta estratégia foi utilizada porque através de ensaios de Western blot foi verificado que a linhagem SP3710 ainda produz um polipeptídeo truncado de 45 KDa, mas não apresenta a forma completa da proteína. A tentativa de obtenção do mutante *rho* nulo foi feita substituindo o gene *rho* cromossômico por uma cópia com a região interna trocada por um cassete de resistência ao antibiótico espectinomicina, através de dupla recombinação homóloga. Dois clones (1S e 4S) foram selecionados após o primeiro evento de recombinação e o padrão de resistência aos antibióticos canamicina e espectinomicina foi analisado nos recombinantes obtidos após o segundo evento de recombinação (Tabela 1). Os resultados mostraram que a cópia cromossomal do gene *rho* somente foi perdida nos clones 1S e 4S que carregavam uma cópia do gene *rho* em um plasmídeo (pMR20-Rho), gerando clones resistentes a espectinomicina e sensíveis a canamicina. Estes resultados indicam que o gene *rho* é essencial para a viabilidade de *C. crescentus* e que na linhagem SP3710 a forma truncada da proteína Rho é parcialmente funcional. A essencialidade de Rho para *C. crescentus* foi confirmada pela inibição do crescimento desta bactéria na presença do antibiótico biciclomicina que é um inibidor específico da atividade de Rho em *E. coli* (Zwiefka *et al.*, 1993).

**Tabela 1:** Perfil de resistência a antibióticos das colônias obtidas após o segundo evento de recombinação

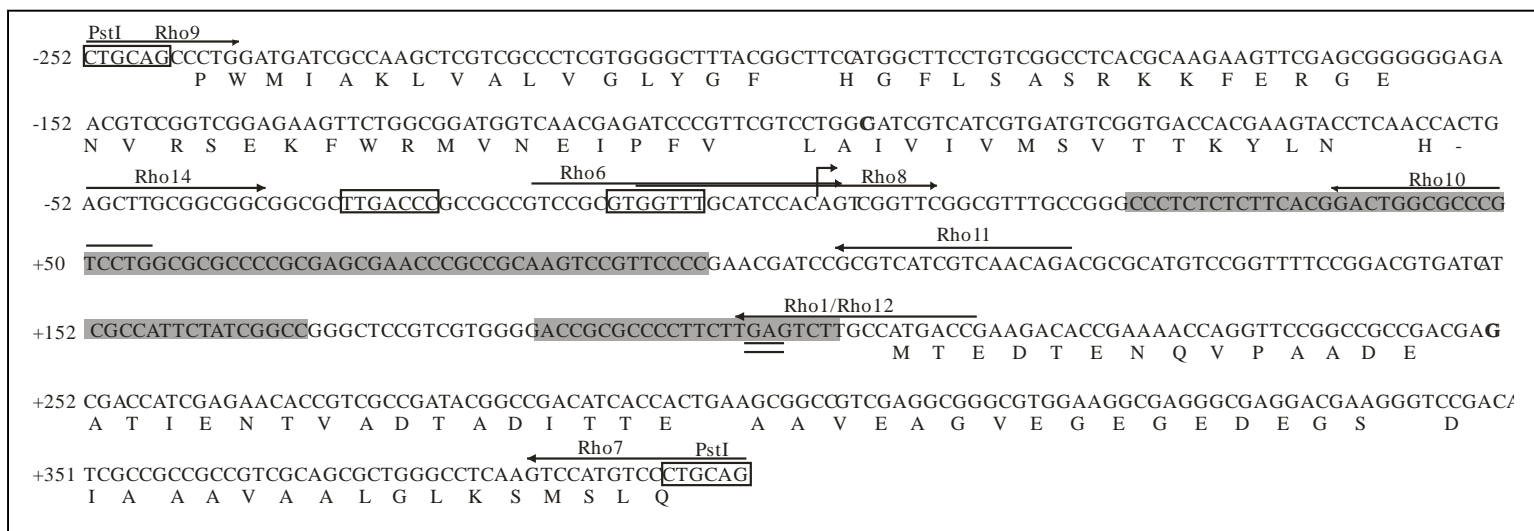
Clone	No. de colônias		
	Sp <sup>r</sup> /Km <sup>s</sup>	Sp <sup>r</sup> /Km <sup>r</sup>	Total
1S	0	73	73
1S(pMR20 <i>rho</i> )	26	51	77
4S	0	79	79
4S(pMR20 <i>rho</i> )	15	68	83

## B) Análise da autoregulação do gene *rho* de *C. crescentus*

Depois de determinado o sítio de início de transcrição do gene *rho* (Figura 1), uma série de deleções na região regulatória de *rho* foram construídas em fusões de transcrição com o

gene repórter *lacZ* no vetor pRK*lacZ*290 (Figura 2A) e a expressão de cada construção foi analisada por ensaio de atividade de  $\beta$ -galactosidase (Figura 2B). A região regulatória completa do gene *rho*, incluindo o promotor e a região 5' não traduzida (construção RhoPstI), produziu 850 unidades de  $\beta$ -galactosidase na linhagem NA1000 e 4.500 unidades na linhagem SP3710, indicando que a autoregulação está ocorrendo nesta construção. Como controle o gene *tacA* (Marques *et al.*, 1997), que não é regulado por Rho, mostrou níveis similares de expressão nas duas linhagens. Entretanto, construções contendo apenas o promotor (Rho14) ou o promotor e apenas 54 pb da região 5' não traduzida (Rho10) mostraram atividade de  $\beta$ -galactosidase muito mais elevada nas duas linhagens, indicando que a regulação autógena foi perdida nesta construção. Estes resultados indicam que a autoregulação não ocorre no início da transcrição e que o promotor de *rho* é um promotor forte. Com o intuito de verificar se a autoregulação poderia ocorrer na região à jusante do nucleotídeo da posição +54, duas outras fusões de transcrição foram testadas (Rho11 e Rho12). Ambas as construções apresentaram atividade de  $\beta$ -galactosidase similares quando comparadas com a construção RhoPstI, restabelecendo a autoregulação. Estes resultados sugerem que sítios atenuadores devem estar presentes na região entre os nucleotídeos +54 e +213. Para averiguar a presença de um segundo promotor na região 5' não traduzida de *rho*, utilizamos a construção Rho7 que não possui a região -35 do promotor de *rho*, mas conserva a região 5' não traduzida completa e 187 pb da região codificante do gene. Nenhuma atividade de  $\beta$ -galactosidase foi detectada nesta construção, confirmando que não existe nenhum promotor a jusante da posição -13. Quando o promotor completo de *rho* está presente na extremidade 5' (Rho15), níveis normais de atividade de  $\beta$ -galactosidase são observados. Estes resultados indicam que sítios atenuadores de transcrição estão presentes entre os nucleotídeos +54 e +213, o que é similar ao descrito para os genes *rho* de *E. coli* e *B. subtilis* (Ingham *et al.*, 1999; Matsumoto *et al.*, 1986). Estes resultados foram confirmados pela medida da expressão de *rho* na presença do antibiótico biciclomicina, indicando que a presença de Rho causa uma diminuição da transcrição de seu próprio gene e que este efeito é dependente da região regulatória que se encontra a jusante da posição +54. Os resultados acima sugerem que devem haver sítios atenuadores de transcrição na região entre as posições +54 e +213 (Figura 1). Esta região é notavelmente rica em citosina/uracila e um forte candidato a conter sítios *rut*. A ligação de Rho nesta região foi testada por ensaio de alteração de mobilidade em gel para RNA e a interação desta proteína com o mRNA da

região 5' não traduzida de *rho*, confirmou a presença de sítios *rut* nesta região e que a expressão do gene *rho* de *C. crescentus* é autoregulada por atenuação de transcrição.



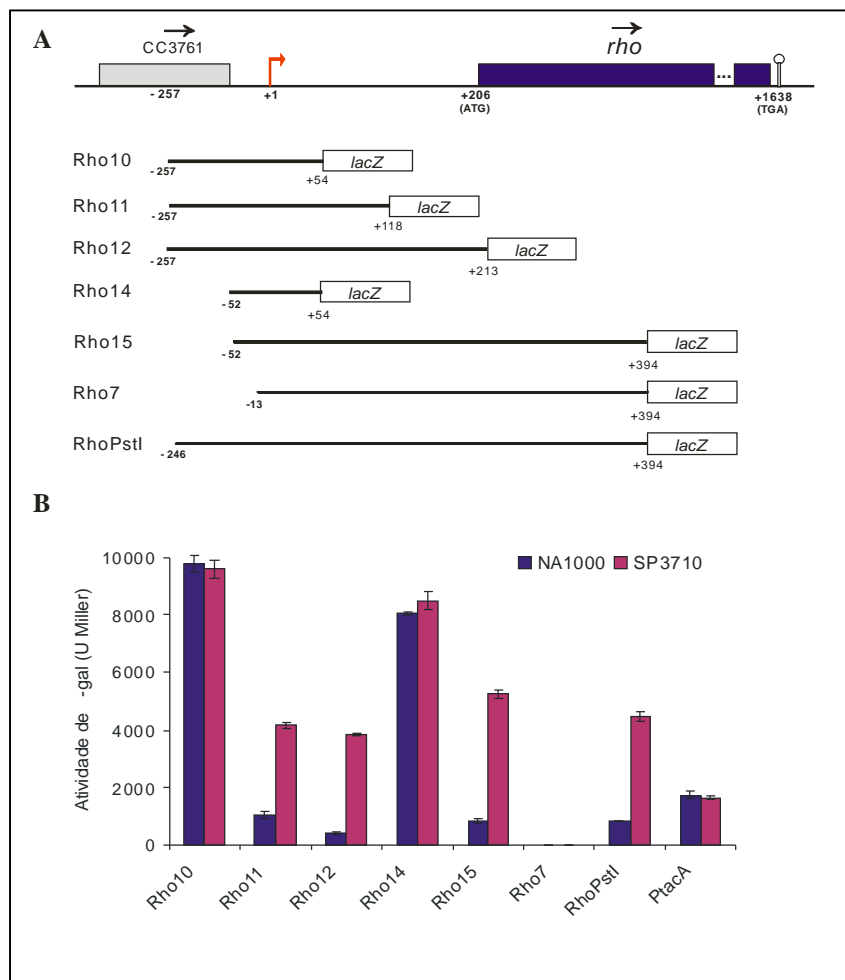
**Figura 1: Sequência nucleotídica da região regulatória do gene *rho*.** A seta inclinada indica o sítio de início de transcrição que foi denominado de posição +1. As sequências promotoras -35 e -10 estão indicadas por caixas e as sequências ricas em C estão sombreadas. O sítio de ligação ao ribossomo está duplamente sublinhado e os sítios de restrição para a enzima PstI estão indicados. As setas indicam a posição de cada oligonucleotídeo usado nos ensaios de extensão de oligonucleotídeo, fusão de transcrição e alteração de mobilidade em gel.

## 2. Estudo da participação da proteína Rho na regulação do estresse oxidativo em *Caulobacter crescentus*

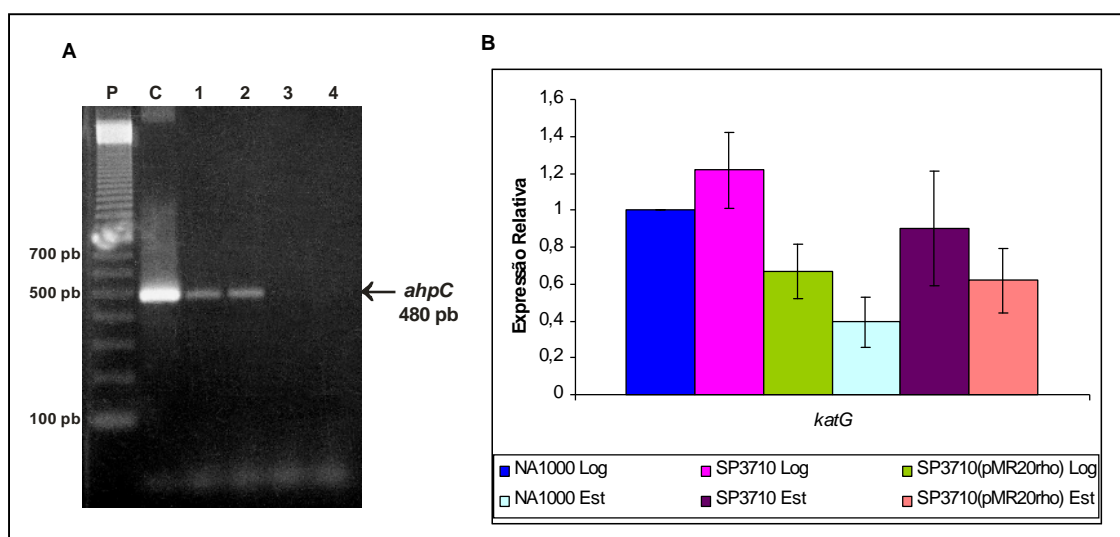
### A) Análise do papel de Rho na expressão de dois genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo

A expressão das duas principais enzimas detoxificadoras de peróxidos de *C. crescentus* foi determinada por ensaios de RT-PCR. Os resultados de RT-PCR semi-quantitativo mostraram que a alquil hidroperóxido redutase (AhpC) é expressa apenas na fase de crescimento exponencial e sua expressão não é alterada pela ausência de Rho funcional (Figura 3A), sugerindo que provavelmente a AhpC seja importante na resposta ao estresse oxidativo na fase exponencial e dispensável na fase estacionária de *C. crescentus*. A expressão relativa da única catalase-peroxidase (KatG) de *C. crescentus* foi avaliada por RT-PCR quantitativo (Figura 3B), mostrando ter expressão aumentada no mutante *rho* tanto na fase de crescimento exponencial quanto na fase estacionária. Este aumento foi reduzido quando a linhagem SP3710 foi complementada com o gene *rho in trans* no vetor pMR20, indicando que este aumento na expressão é devido à ausência parcial do fator de terminação de transcrição Rho. A funcionalidade da enzima catalase-peroxidase no mutante *rho* foi testada através de uma colaboração com o Prof. Dr. Howard Steinman do Departamento de

Bioquímica do Albert Einstein College of Medicine de New York. Os resultados obtidos mostraram que a atividade de KatG está muito diminuída no mutante *rho* na fase estacionária e levemente diminuída na fase exponencial, enquanto que outras enzimas, como a cobre-zinco superóxido dismutase e a alquil hidroperóxido redutase, estão com atividade comparável a linhagem NA1000.



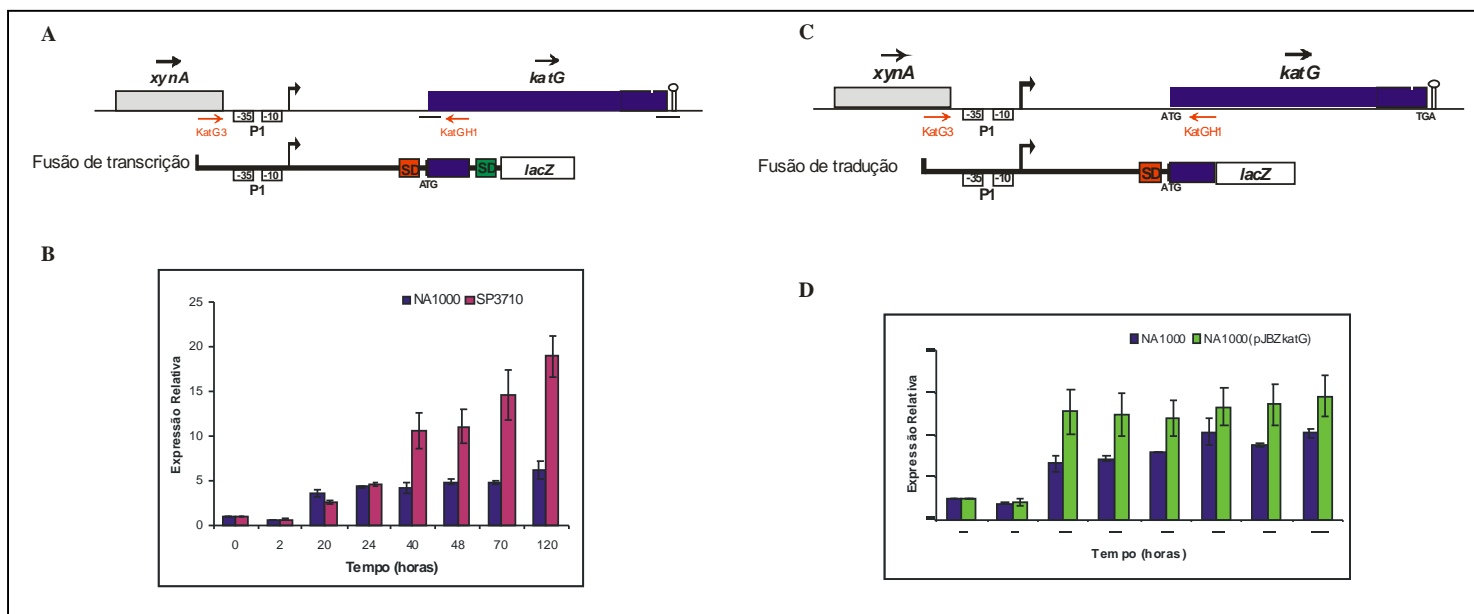
**Figura 2: Análise da expressão da região regulatória de *rho* por ensaio de atividade de -galactosidase. (A):** Esquema da região regulatória do gene *rho* de *Caulobacter crescentus*. Os quadros estão identificados com os códigos dos genes. As setas horizontais pretas indicam a direção em que os genes são transcritos e a seta vermelha vertical o início de transcrição do gene *rho*. P1 indica a região promotora do gene *rho*. Os números +1, +206 e +1638 correspondem às posições relativas ao início de transcrição, ao início de tradução e ao término da tradução do gene *rho*. O símbolo à direita de *rho* indica uma sequência sinal de terminação de transcrição independente de Rho. Abaixo do mapa cada fusão de transcrição está representada e as coordenadas indicam a extensão da região regulatória de *rho* clonada na frente do gene repórter *lacZ*. **(B):** Atividade de -galactosidase de cada uma das construções, nas linhagens NA1000 e SP3710. Os resultados estão expressos em unidades Miller e representam a média de no mínimo três ensaios independentes.



**Figura 3: (A): Reações de RT-PCR do gene *ahpC*** utilizando 500 ng de RNA de cada linhagem. A canaleta 1 representa a linhagem NA1000 na fase exponencial, a canaleta 2 a linhagem SP3710 na fase exponencial, a canaleta 3 a linhagem NA1000 na fase estacionária e a canaleta 4 a linhagem SP3710 na fase estacionária. A banda de 480 pb referente ao gene *ahpC* está indicada pela seta. P: Padrão de peso molecular 100 pb, C: controle positivo da reação de PCR feito com DNA genômico da linhagem NA1000. **(B) Expressão relativa do gene *katG*.** As reações de RT-PCR quantitativo foram realizadas com 50 ng do cDNA das linhagens NA1000, SP3710 e SP3710 complementada com o gene *rho in trans* no vetor pMR20 [SP3710(pMR20 *rho*)] nas fases de crescimento exponencial e estacionária (40 horas). Os níveis de expressão foram normalizados com os valores obtidos para o gene de RNA ribossomal 16S e estão apresentados em relação a linhagem NA1000 na fase exponencial.

### **B) Análise da expressão de *KatG* por fusões de transcrição e tradução**

A fim de verificar se os níveis de transcrição do gene *katG* estavam alterados no mutante *rho*, a expressão deste gene além de ser determinada por RT-PCR em tempo real também foi determinada pela medida da atividade da  $\beta$ -galactosidase em fusão de transcrição com o gene repórter *lacZ* (Figura 4A e B). Nestas condições foi observado que nenhuma mudança significativa ocorreu na transcrição de *katG* na fase exponencial das duas linhagens testadas e que na fase estacionária o promotor de *katG* é mais induzido na linhagem SP3710 do que na linhagem parental. Isto poderia indicar que no mutante *rho*, a transcrição e os níveis de mRNA deste gene estejam aumentados como um mecanismo compensatório para suprir a baixa atividade da proteína catalase-peroxidase observada neste mutante. Além disto, os resultados indicam que a baixa funcionalidade de KatG na linhagem SP3710 não é devido a uma diminuição nos níveis de transcrição e nem na estabilidade da mensagem, indicando que o problema possa estar na regulação da tradução ou na maturação desta proteína. Com o intuito de verificar se a proteína KatG de *C. crescentus* sofre regulação na tradução da proteína, a análise de sua expressão foi avaliada através de uma fusão de tradução cromossomal da região regulatória do gene *katG* com o gene repórter *lacZ* no vetor pJBZ282 (Figura 4C e D). Os resultados obtidos mostram que assim como na transcrição, a tradução da proteína KatG na linhagem NA1000 não apresentou mudança no padrão de expressão na fase exponencial, mas sofreu indução na fase estacionária, como foi previamente reportado por Steinman *et al.* (1997). Comparando a expressão do gene *katG* obtida na fusão de transcrição com a expressão obtida na fusão de tradução, percebemos um pequeno aumento nos níveis de tradução em relação a transcrição. Estes resultados sugerem que a catalase-peroxidase de *C. crescentus* além de ser regulada na transcrição, também pode ser regulada por mecanismos pós-transcricionais. A regulação a nível transcricional do gene *katG* vem sendo demonstrada em várias bactérias, mas a regulação pós-transcricional deste gene ainda não foi descrita em nenhuma delas (Loewen e Hengge-Aronis, 1994; Luo *et al.*, 2005).



**Figura 4: Análise da expressão de *katG* através de fusões de transcrição e tradução com o gene repórter *lacZ*. (A) e (C): Esquema da região regulatória do gene *katG* de *Caulobacter crescentus*. Os quadros estão identificados com os códigos dos genes e as setas horizontais vermelhas correspondem a posição dos oligonucleotídeos utilizados para amplificar a região clonada na frente do gene *lacZ*. Abaixo do mapa as fusões estão representadas. A caixa vermelha indica a sequência Shine-Dalgarno do gene *katG* e a caixa verde de uma sequência Shine-Dalgarno do gene *lacZ*. A caixa azul representa a região codificante de *KatG* (B) e (D): Atividade de  $\beta$ -galactosidase das fusões de transcrição e tradução nas linhagens NA1000 e SP3710. O tempo 0 representa a atividade de  $\beta$ -galactosidase medida quando as culturas apresentaram D.O.<sub>600</sub> de 0,6. Alíquotas foram retiradas nos tempos 2, 20, 24, 40, 48, 70 e 120 horas para medida da atividade de  $\beta$ -galactosidase. Os resultados estão apresentados em relação ao tempo 0 e representam a média de dois ensaios independentes.**

Para sobreviver a vários estresses os organismos desenvolveram sistemas eficientes de expressão gênica. Entretanto, o papel da terminação de transcrição na regulação gênica ainda é pouco compreendido. A nossa descoberta anterior, do envolvimento de Rho de *C. crescentus* na resposta a estresses ambientais, especialmente ao estresse oxidativo, foi de grande importância para a compreensão dos fatores que levam à essencialidade de Rho para algumas bactérias. Neste trabalho foi demonstrado que provavelmente o fator Rho exerça um papel regulatório na atividade da catalase-peroxidase, interferindo em sua regulação pós-transcricional. Sendo assim, este trabalho permitiu fazer alguns avanços no entendimento da complexa rede regulatória que envolve a terminação de transcrição, além de evidenciar a provável existência de um novo mecanismo regulatório da enzima catalase-peroxidase, que futuramente poderá contribuir para um melhor entendimento da virulência de muitos organismos patogênicos e quiçá para o desenvolvimento de novos e potenciais antimicrobianos.

#### IV. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Das A, Court D and Adhya S (1976) Isolation and characterization of conditional lethal mutants of *Escherichia coli* defective in transcription termination factor Rho. Proc Nat Acad Sci USA 73: 1959-1963.

- Ely, B (1991) Genetics of *Caulobacter crescentus*. Methods Enzymol 204: 372-384.
- Gober JW and Shapiro LA (1992) Developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3 enhancer and IHF binding elements. Mol Biol Cell 3: 913-926.
- Gomelsky M and Kaplan S (1996) The *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 *rho* gene: expression and genetic analysis of structure and function. J Bacteriol 178: 1946-1954.
- Ingham CJ, Dennis J and Furneaux PA (1999) Autogenous regulation of transcription termination factor Rho and the requirement for Nus factors in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol 31: 651-663.
- Italiani VCS and Marques MV (2005) The transcription termination factor Rho is essential and Autoregulated in *Caulobacter crescentus*. J Bacteriol 187: 4290-4294.
- Italiani VCS (2001) Identificação de genes envolvidos na resposta a estresses ambientais em *Caulobacter crescentus*. 103 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- Italiani, VCS, Zuleta, LFG and Marques MV (2002) The transcription termination factor Rho is essential for oxidative stress survival in *Caulobacter crescentus*. Mol Microbiol 44: 181-194.
- Jiang W, Hou Y and Inouye M (1997) CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. J Biol Chem 272: 196-202.
- Laub MT, Chen, SL, Shapiro L; Mcadams HH (2002) Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. Proc Natl Acad Sci USA 99: 4632-4637.
- Loewen, PC and Hengge-aronis R (1994) The role of the sigma factor (KatF) in bacterial global regulation. Annu Rev Microbiol 48: 53-80.
- Luo L, Qi MS, Yao SY, Cheng HP, Zhu, JB and Yu GQ (2005) Role of *oxyR* from *Sinorhizobium meliloti* in regulating the expression of catalases. Acta Biochim Biophys Sin 37: 421-428.
- Marques MV, Gomes SL and Gober JW (1997) A gene coding for a putative sigma 54 activator is developmentally regulated in *Caulobacter crescentus*. J Bacteriol 179: 5502-5510.
- Matsumoto Y, Shigesada K, Hirano M and Imai, M (1986) Autogenous regulation of the gene for transcription termination factor Rho in *Escherichia coli*: localization and function of its attenuators. J Bacteriol 166: 945-958.
- Miller JM (1972) Experiments in molecular genetics, p. 352-355. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N.Y.
- Morgan, WD, Bear DG and Von hippel PH (1983) Rho-dependent termination of transcription. I. Identification and characterization of termination sites for transcription from the bacteriophage lambda PR promoter. J Biol Chem 258: 9553-9564.
- Nowatzke WL, Keller E, Koch G and Richardson JP (1997) Transcription termination factor Rho is essential for *Micrococcus luteus*. J Bacteriol 179: 5238-5240.
- Poindexter JS (1981) The *Caulobacters*: ubiquitous unusual bacteria. Microbiol Rev 45: 123-179.
- Prentki P and Krisch HM (1984) *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. Gene 29: 303-313.
- Quirk PG, Dunkley EA, Lee P and Krulwich TA (1993) Identification of a putative *Bacillus subtilis rho* gene. J Bacteriol 175: 647-654.
- Richardson JP (2002) Rho-dependent termination and ATPases in transcript termination. Biochim Biophys Acta 1577: 251-260.
- Richardson JP (1990) Rho-dependent transcription termination. Biochim Biophys Acta 1048: 127-138.
- Sambrook J, Fritch EF and Maniatis T (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Simon R, Prierer U and Puhler A (1983) A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. Biotechnology 1: 784-790.
- Skerker JM and Laub MT (2004) Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. Nature Rev 2: 325-337.
- Steinman HM, Fareed F and Weinstein L (1997) Catalase-peroxidase of *Caulobacter crescentus*: function and role in stationary phase survival. J Bacteriol 179: 6831-6836.
- Towbin H, Staehelin T and Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 76: 4350-4354.
- Washburn RS, Marra A, Bryant AP, Rosenberg M and Gentry DR (2001) *rho* is not essential for viability or virulence in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob Agents Chemother 45:1099-1103.
- Zwiefka A, Kohn H and Widger WR (1993) Transcription termination factor rho: the site of bicyclomycin inhibition in *Escherichia coli*. Biochemistry 32: 3564-3570.