MIRIAN MOLNAR RODRIGUES

Estudo do papel de duas ferritinas no metabolismo
de ferro de *Caulobacter crescentus* e sua regulação

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Microbiologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre de
Ciências.

São Paulo
2012

MIRIAN MOLNAR RODRIGUES

Estudo do papel de duas ferritinas no metabolismo
de ferro de *Caulobacter crescentus* e sua regulação

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Microbiologia do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para
obtenção do Título de Mestre de Ciências.

Área de concentração: Microbiologia
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marilis do Valle
Marques

Versão corrigida. A versão original
eletrônica encontra-se disponível tanto
na Biblioteca do ICB quanto na
Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo

2012

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Rodrigues, Mirian Molnar.

Estudo do papel de duas ferritinas no metabolismo de ferro de *Caulobacter crescentus* e sua regulação / Mirian Molnar Rodrigues. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Profa. Dra. Marilis do Valle Marques.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Fisiologia de microrganismos.

Versão do título para o inglês: Study of the role of two ferritins in *Caulobacter crescentus* iron metabolism and their regulation.

1. Regulação gênica 2. Metabolismo de ferro 3. Ferritinas 4. RNA regulatório 5. Genética bacteriana 6. *Caulobacter crescentus* I. Marques, Profa. Dra. Marilis do Valle II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB066/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Mirian Molnar Rodrigues.

Título da Dissertação: Estudo do papel de duas ferritinas no metabolismo de ferro de *Caulobacter crescentus* e sua regulação.

Orientador(a): Profa. Dra. Marilis do Valle Marques.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado,
em sessão pública realizada a/...../.....,

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 316, referente ao projeto intitulado: “*Estudo do papel de duas ferritinas no metabolismo de ferro de *Caulobacter crescentus* e sua regulação por um pequeno RNA*” sob a responsabilidade de **Mirian Molnar Rodrigues**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 16 de junho de 2009.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais, Ivone e Moacir, meu
irmão Maurício, e aos amigos verdadeiros,
pelo amor, compreensão e incondicional força.

AGRADECIMENTOS

Agradeço e dedico essa Dissertação à Prof^a Dr^a Marilis do Valle Marques por ter sido, acima de tudo, amiga. Por ter me orientado e ensinado em todos os momentos, por ter contribuído imensamente na execução do trabalho, apesar de todos os percalços, e por ser um exemplo em diversas ocasiões.

Ao Dr. José Freire da Silva Neto, meu co-orientador informal, que desempenhou papel fundamental em grande parte do trabalho, sempre disposto a me assistir, e me ensinar sobre essa área de estudo.

Ao pessoal do Laboratório de Fisiologia de Microrganismos, realçando o Dr. Ricardo Ruiz Mazzon, que cumpriu grande papel na primeira metade de minhas tarefas, e sem o qual eu sequer teria ali iniciado o Mestrado. À Heloise Balhesteros, cuja participação foi crucial na segunda metade de meu projeto, e que, ademais, representou um grande ganho pessoal, cuja amizade é deveras preciosa. No intento de não me alongar em demasia, agradeço também aos colegas de lab Carolina, Daniela, Juliana, Maristela, Valéria Italiani, Vânia e Ynés, por todo o aprendizado.

Aos professores com quem tive contato durante todo esse período, pelos valiosos ensinamentos compartilhados. Em especial à Dra. Suely Gomes por ceder material biológico.

Aos funcionários do ICB, em especial Íris, Alice, Bruno, Marlene e Emílio pela dedicação técnico-administrativa. À Eva Aparecida da Silva Oliveira, pela contribuição nas etapas de revisão técnica.

À Helói e Maristela, meus olhos, braços e pernas nas etapas finais de confecção da Dissertação, sempre de prontidão para os momentos que demandaram auxílio.

A todos os meus amigos verdadeiros e fiéis, cujos nomes não cabem citar, neste momento, mas que seguramente sabem o valor que possuem em minha vida, pessoas sem as quais o trajeto seria evidentemente mais árduo e consideravelmente menos aprazível.

À minha família, base de tudo o que fui, sou e serei, cujo amor incondicional por si basta.

À FAPESP e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos que inadvertidamente não citei, mas que exerceram papel fundamental ao longo dessa jornada.

"Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, eles são a abertura para achar as que estão certas."

Carl Sagan

RESUMO

RODRIGUES, M. M. **Estudo do papel de duas ferritinas no metabolismo de ferro de *Caulobacter crescentus* e sua regulação.** 2012. 129 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

As bactérias usam proteínas intracelulares de estocagem de ferro (ferritinas) que permitem acesso ao metal quando está em baixa quantidade. Neste trabalho, o papel das ferritina Bfr e Dps foi estudado através da análise de fenótipo de linhagens mutantes, e sua regulação foi estudada utilizando o gene repórter *lacZ*, em ensaios de atividade de β -galactosidase. Os resultados mostraram aumento de expressão de *bfr* em excesso de ferro, e que este gene é positivamente regulado por Fur. A expressão de *dps* teve aumento em carência de ferro e na fase estacionária. Ensaios de expressão nas linhagens mutantes $\Delta oxyR$, $\Delta sRNA1$ e $\Delta sRNA2$, mostraram diferenças nos níveis de expressão em comparação aos atingidos na linhagem selvagem. O fator sigma ECF SigJ é importante para níveis máximos de expressão de *bfr* e o fator SigT para máxima expressão de *dps*. Foram deletadas as regiões codificadoras de *bfr* e *dps* separadamente, ou ambas. Os resultados mostraram que o mutante Δdps e o mutante duplo apresentaram maior sensibilidade a H_2O_2 , tendo a linhagem Δbfr padrão similar à linhagem NA1000. O ensaio de quantificação de ferro mostrou que as ferritinas têm papel equivalente na estocagem de ferro intracelular.

Palavras-chave: Regulação gênica. Metabolismo de ferro. Ferritinas. RNA regulatório. Genética bacteriana. *Caulobacter crescentus*.

ABSTRACT

RODRIGUES, M. M. **Study of the role of two ferritins in *Caulobacter crescentus* iron metabolism and their regulation.** 2012. 129 p. Masters thesis (Microbiology) - Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2012.

Bacteria utilize intracellular iron storage proteins (ferritins) that allow access to the metal when it is present in low amount. In this study the role of ferritins Bfr and Dps was studied by analyzing the phenotype of mutant strains, and their regulation was studied using the *lacZ* reporter gene, in β -galactosidase activity assays. The results showed increased expression of *bfr* in iron excess, and that this gene is positively regulated by Fur. *dps* expression was increased under iron deficiency and in the stationary phase. Expression assays in the mutant strains $\Delta oxyR$, $\Delta sRNA1$ and $\Delta sRNA2$ showed differences in expression levels compared to wild type. ECF sigma factor SigJ is important for maximum levels of *bfr* expression and SigT for maximal *dps* expression. The coding regions of *bfr*, *dps* or both have been deleted. The results showed that the Δdps and double mutant strains showed increased susceptibility to H₂O₂, and Δbfr showed a similar pattern to the NA1000 strain. The iron concentration determination showed that both ferritins play equivalent roles in intracellular iron storage.

Keywords: Gene regulation. Iron metabolism. Ferritins. Regulatory RNA. Bacterial genetics. *Caulobacter crescentus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação esquemática do sistema de captação de ferro mediada por sideróforos em bactérias Gram-negativas	21
Figura 2 - Estrutura das proteínas Ftn	26
Figura 3 - Estrutura das proteínas Bfr	28
Figura 4 - Sítio heme de Bfr	28
Figura 5 - Estrutura da proteína Dps	30
Figura 6 - Regulação de ferro (recém-captado) por Fur e RyhB	34
Figura 7 - Modelo de silenciamento gênico por RyhB	37
Figura 8 - Ciclo de vida de <i>Caulobacter crescentus</i>	42
Figura 9 - Organização genética da região CC0682-sRNA1-CC0681-sRNA2	46
Figura 10 - Marcador de peso molecular	58
Figura 11 - Estratégia de construção dos vetores pNPTS138 Δ <i>bfr</i> (a) e pNPTS138 Δ <i>dps</i> (b)	65
Figura 12 - Estratégia de construção dos vetores pMR20 <i>bfr</i> (a) e pMR20 <i>dps</i> (b)	69
Figura 13 - Esquema da região promotora do gene <i>bfr</i> de <i>C. crescentus</i> (5' $\rightarrow$ 3')	73
Figura 14 - Esquema da região promotora do gene <i>dps</i> de <i>C. crescentus</i> (5' $\rightarrow$ 3').....	74
Figura 15 - Esquema da região promotora do possível sRNA1 de <i>C. crescentus</i> (5' $\rightarrow$ 3')	75
Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR isolados a serem clonados no vetor pRK/ <i>lacZ</i> 290	76
Figura 17 - Ensaio de atividade de β -galactosidase com o vetor pRK/ <i>lacZ</i> 290 vazio	77
Figura 18 - Ensaio de expressão do gene <i>bfr</i>	78
Figura 19 - Ensaio de expressão do transcrito contendo o possível sRNA	82
Figura 20 - Ensaio de expressão do gene <i>dps</i>	86
Figura 21 - Ensaio de expressão do gene <i>dps</i> em escala temporal	91
Figura 22 - Ensaio de expressão dos genes <i>bfr</i> e <i>dps</i> em diferentes fases de crescimento	95
Figura 23 - Ensaio de expressão do gene <i>dps</i> na presença de H ₂ O ₂	98

Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR a serem clonados no vetor pGEM-T Easy	101
Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose de confirmação da ligação dos dois fragmentos flaqueadores do gene <i>bfr</i> ao vetor pNPTS138.....	102
Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose confirmação da ligação dos dois fragmentos flaqueadores do gene <i>dps</i> ao vetor pNPTS138	102
Figura 27 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCRs para confirmação dos eventos da primeira e da segunda recombinações homólogas nas construções do mutante Δbfr	104
Figura 28 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCRs para confirmação dos eventos da primeira e da segunda recombinações homólogas nas construções do mutante Δdps	105
Figura 29 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCRs para confirmação do evento da segunda recombinação homóloga nas construções do mutante $\Delta bfr \Delta dps$	107
Figura 30 - Eletroforese em gel de agarose confirmação da obtenção de pMR20 <i>bfr^c</i>	109
Figura 31 - Curvas de Crescimento dos mutantes Δbfr , Δdps e $\Delta bfr \Delta dps$ (Δ duplo)	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens utilizadas	51
Tabela 2 - Plasmídeos utilizados	52
Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados	55
Tabela 4 - Ensaio de halo de inibição de crescimento com peróxido de hidrogênio	110
Tabela 5 - Quantificação de Ferro por ICP-AES	115

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DDP - 2,2'-dipiridil

DNA - ácido desoxirribonucléico

dNTP - desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO₆₀₀ - densidade óptica a 600 nanômetros

ECF - função extracitoplasmática

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

EMSA - ensaio de alteração de mobilidade eletroforética em gel

IPTG - isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo

kb - quilobase(s)

kDa - quilodáton(s)

M - molar

mRNA - RNA mensageiro

ONPG - orto-nitrofenil- β -galactosídeo

pb - pares de bases

PCR - reação em cadeia da polimerase

RNA - ácido ribonucleico

RNAse - ribonuclease

ROS - espécies reativas de oxigênio

rpm - rotações por minuto

RT-PCR - PCR em tempo real

SDS - dodecil sulfato de sódio

sRNA - pequeno RNA não-codificante

U - unidade(s)

x g - vezes a aceleração da gravidade

X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
1.1 Homeostase de ferro em bactérias	19
1.2 Proteínas estocadoras de ferro	23
1.2.1 Ferritinas	24
1.2.1.1 Ferritinas bacterianas (Ftn)	25
1.2.1.2 Bacterioferritinas	26
1.2.1.3 Proteínas Dps	29
1.3 Mecanismos regulatórios	30
1.4 Pequenos RNAs não-codificantes	33
1.5 Regulação da expressão das ferritinas	38
1.6 <i>Caulobacter crescentus</i>	40
1.6.1 Operon dos pequenos RNAs	46
1.6.2 Fatores sigma de função extracitoplasmática	47
2 OBJETIVOS	49
2.1 Objetivos gerais	49
2.2 Objetivos específicos	49
3 MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo	50
3.2 Oligonucleotídeos	55
3.3 Soluções utilizadas	56
3.4 Extração de DNA cromossômico	56
3.5 Reações em cadeia da polimerase (PCR) e clonagens	57

3.6 Protocolo de “A-Tailing” e clonagem no pGEM-T Easy	58
3.7 Transformação de células competentes por eletroporação	59
3.8 Minipreparação de DNA plasmidial (lise alcalina)	59
3.9 Sequenciamento	60
3.10 Análise do padrão de expressão	61
3.10.1 Ensaio de β -galactosidase	62
3.11 Obtenção das linhagens mutantes	63
3.12 Obtenção das linhagens complementadas	68
3.13 Análise dos fenótipos dos mutantes	70
3.13.1 Medição da quantidade celular de ferro	70
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4.1 Análises de Expressão Gênica	72
4.1.1 Ensaios em diferentes linhagens e concentrações de ferro	76
4.1.1.1 Ensaios em escala temporal	90
4.1.1.2 Ensaios em diferentes fases de crescimento	93
4.1.1.3 Ensaios em presença de H_2O_2	97
4.2 Construção e obtenção de mutantes nulos	100
4.2.1 Mutantes simples	101
4.2.2 Mutante duplo	106
4.2.3 Linhagens complementadas	108
4.3 Análises Fenotípicas	110
4.3.1 Halo de inibição de crescimento	110
4.3.2 Curvas de crescimento	112
4.3.3 Quantificação de ferro	114

5 CONCLUSÕES	118
REFERÊNCIAS	120

1 INTRODUÇÃO

1.1 Homeostase de ferro em bactérias

O ferro é um micronutriente essencial para a maioria dos organismos, incluindo bactérias, nas quais serve como cofator em múltiplas reações enzimáticas. Ele está presente universalmente em sítios de enzimas ligantes a ferro, participando de muitos processos biológicos, tais como fotossíntese, fixação de nitrogênio, produção e consumo de hidrogênio, respiração, transporte de oxigênio, regulação gênica, biossíntese de DNA, entre outros (ANDREWS et al., 2003; MASSÉ et al., 2007).

Embora o ferro seja um dos metais mais abundantes na terra, ele é virtualmente inacessível por causa de sua baixa solubilidade em condições aeróbicas em pH neutro (ANDREWS et al., 2003). Dada à importância da captação de ferro extracelular, as bactérias desenvolveram mecanismos elaborados para a sua aquisição, incluindo a utilização de fontes de ferro presentes no hospedeiro e a secreção de quelantes de ferro de alta afinidade, denominados sideróforos, para que seu transporte para dentro da célula seja possível. Sideróforos são geralmente produzidos e secretados pela bactéria em resposta a limitação de ferro (WANDERSMAN; DELEPELAIRE, 2004).

Complexos Fe^{3+} -sideróforo são muito grandes e não passam pelas porinas, que permitem a entrada de pequenos solutos pela membrana de bactérias Gram-negativas. Assim, sua internalização requer proteínas receptoras de membrana externa que liguem ao complexo ferro-sideróforo com alta afinidade (receptores dependentes de TonB). Alguns desses receptores são bem conhecidos (FepA, FecA e FhuA) e levam o complexo através da membrana externa para o periplasma. Esse

transporte requer energia, que é providenciada pelo gradiente eletroquímico da membrana citoplasmática e repassado pelo complexo TonB-ExbB-ExbD. O transporte do complexo ferro-sideróforo, através do periplasma e membrana citoplasmática, é mediado por proteínas periplasmáticas associadas a transportadores da membrana citoplasmática do tipo ABC. Uma vez internalizado, o complexo ferro-sideróforo precisa ser dissociado por meio de sua redução, liberando o ferro para o metabolismo celular (ANDREWS et al., 2003). Esse mecanismo está esquematizado abaixo (Figura 1).

Figura 1 - Representação esquemática do sistema de captação de ferro mediada por sideróforos em bactérias Gram-negativas.

O complexo TonB-ExbB-ExbD fornece a energia necessária para o transporte do sideróforo contendo ferro através do receptor de membrana externa. A proteína de ligação periplasmática leva o sideróforo até o complexo transportador do tipo ABC, na membrana citoplasmática. O sideróforo é internalizado através da hidrólise do ATP e o ferro é separado do sideróforo através de uma reação de redução. O sideróforo é degradado ou reutilizado (OM, membrana externa; CM, membrana citoplasmática).

FONTE: Andrews et al. (2003).

Muitas bactérias e outros organismos desenvolveram sistemas de regulação precisos para manter o ferro dentro de uma faixa de uso fisiológico. Os níveis intracelulares de ferro devem ser altos o bastante para possibilitar as funções celulares, mas também baixos o bastante para prevenir danos causados por radicais hidroxila ($\text{OH}^\bullet$) altamente reativos (MASSÉ et al., 2007). Organismos aeróbicos utilizam oxigênio molecular (O_2) para respiração ou oxidação de nutrientes a fim de obter energia; subprodutos do oxigênio, como o radical superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila, são constantemente gerados nas células em crescimento aeróbico. Os alvos biológicos destas espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) são DNA, RNA, proteínas e lipídeos. Muitos dos estragos causados pelo H_2O_2 ocorrem pela reação de Fenton, que requer ferro (CABISCOL et al., 2000). O ferro interage com produtos de redução de oxigênio gerando radicais hidroxila altamente reativos e extremamente danosos. Reações destes tipos são demonstradas abaixo:

Bactérias, leveduras e mamíferos possuem respostas adaptativas a níveis elevados de estresse oxidativo, indicando que essas células percebem elevações nos níveis de ROS e transmitem o sinal, levando ao aumento da expressão de atividades de defesa. Para se protegerem dos danos causados pelo estresse oxidativo, as células possuem inúmeras enzimas antioxidantes e atividades de reparo, muitas delas expressas em níveis baixos em crescimento normal (STORZ; IMLAY, 1999). Enzimas específicas diminuem os estados

reativos de ROS, como é o caso das superóxido dismutases (SODs), que convertem O_2^- para H_2O_2 e O_2 , e a seguir o peróxido de hidrogênio é removido por catalases (CABISCOL et al., 2000).

A reatividade do ferro é contra-atacada pelas bactérias pelo sequestro do metal em proteínas estocadoras de ferro (comumente denominadas ferritinas). Tipicamente, o ferro intracelular é sequestrado de maneira reversível pelas ferritinas e as ROS são destoxificadas por enzimas específicas. Assim, os organismos desenvolveram estratégias que permitem a captação do ferro para solubilizá-lo e estocá-lo de maneira não tóxica, deixando-o pronto para uso (CHIANCONE et al., 2004).

1.2 Proteínas estocadoras de ferro

A captação de ferro e sua estocagem há muito são reconhecidos como problemas complexos para as bactérias: elas precisam evitar o excesso de ferro livre que leva a vários danos, e também precisam encontrar fontes adequadas de ferro que permitam seu crescimento. As proteínas estocadoras de ferro (ou ferritinas) ajudam a prevenir danos causados pelo metal removendo-o do citoplasma, e também servem como uma fonte de ferro quando ele se torna escasso (THEIL, 2007). Ferritinas podem sequestrar ferro de maneira reversível em uma forma mineral inerte, até que o metabolismo intracelular o mobilize novamente em condições de limitação de ferro (VELAYUDHAN et al., 2007).

As proteínas estocadoras de ferro captam ferro na forma Fe^{2+} , mas o depositam na cavidade central em forma de ferro oxidado (Fe^{3+}). Portanto, a estocagem de ferro requer um passo de ferro-oxidação que é catalisado por sítios específicos dentro da própria proteína estocadora (ANDREWS et al., 2003). O Fe^{2+} é oxidado em sítios com atividade de

ferroxidase, cujos aminoácidos ligantes de ferro são altamente conservados evolutivamente (CHIANCONE et al., 2004). As estruturas conservadas das ferritinas ocorrem desde Archaea até humanos (THEIL, 2007).

Há três tipos de ferritinas reconhecidas em bactérias: as ferritinas arquetípicas, ou ferritinas bacterianas, como a ferritina A (FtnA), também encontradas em eucariotos; as bacterioferritinas (Bfr), exclusivas de bactérias; e as pequenas proteínas ligantes de DNA (Dps), presentes apenas em procariotos (ANDREWS et al., 2003; VELAYUDHAN et al., 2007). Todos os tipos de proteínas estocadoras de ferro podem existir na mesma bactéria e múltiplos genes de ferritinas e bacterioferritinas são comuns. Embora os três tipos de proteínas estocadoras formem famílias evolutivamente distintas, elas são relacionadas distantemente entre si e mantêm estruturas e funções similares. São compostas de 24 (ferritinas e bacterioferritinas) ou 12 (proteínas Dps) subunidades similares que se juntam para formar uma proteína esférica com cavidade central para reserva de ferro (ANDREWS et al., 2003).

E. coli adquire ferro por meio de múltiplos sistemas de transporte e possui diversas proteínas de estocagem de ferro e destoxificação, como: duas ferritinas, uma bacterioferritina e uma proteína Dps (CHIANCONE et al., 2004). *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium possui quatro ferritinas: bacterioferritina (Bfr), ferritina A (FtnA), ferritina B (FtnB) e Dps. A bacterioferritina é responsável pela maior parte da estocagem do ferro neste organismo, seguida pela ferritina A (VELAYUDHAN et al., 2007).

1.2.1 Ferritinas

As ferritinas contêm múltiplos canais para entrada e saída de ferro e sítios para enzimas relacionadas a reações de oxidorredutases. Diferenças entre as famílias de

ferritinas incluem os tamanhos das cavidades onde se incorpora o ferro, sua sequência de aminoácidos, localização dos sítios ativos, entre outros. As características principais da superfamília de ferritinas são as formações das cavidades ocas, simétricas, formadas de 12 a 24 subunidades, geralmente com 4 feixes de α -hélices, em que o interior dessas cavidades é preenchido em 60% de seu volume por óxido ferroso (Fe_2O_3), o estado chamado "biomineral" (THEIL, 2011). A mineralização ocorre quando o ferro, captado pelas ferritinas na forma Fe^{2+} , é posteriormente oxidado a Fe^{3+} , e então hidratado. Esse processo se dá no que é chamado centro de ferroxidase (CROW et al., 2009). Os diâmetros das cavidades variam entre 5 a 12 nm, dependendo do tipo de ferritina, assim como a quantidade de íons de ferro estocados pode variar de 1000-1500 em condições normais, a 3000-4000 quando o ferro extracelular atinge níveis elevados (THEIL, 2011).

1.2.1.1 Ferritinas bacterianas (*Ftn*)

A Ferritina A (*FtnA*) de *E. coli* é reconhecida por acumular ferro no crescimento bacteriano em meio a excesso do metal, guardando-o como uma fonte de ferro intracelular para subsequente crescimento em condições limitantes do mesmo. Assim, *FtnA* se caracteriza como uma importante proteína estocadora de ferro, sendo responsável por estocar mais de 50% do ferro celular. Ferritinas homólogas a *FtnA*, em outras bactérias (*Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*), também se mostraram capazes de estimular crescimento em limitação de ferro, aparentando também atuar como proteínas estocadoras (ANDREWS et al., 2003). O gene *ftnA* também é induzido no crescimento em fase estacionária (ABDUL-TEHRANI et al., 1999).

As ferritinas bacterianas desta família geralmente consistem de 24 subunidades arranjadas em forma de dodecaedros com simetrias 4,3,2 (Figura 2). O arranjo simétrico

das subunidades dá origem a um número de canais através da proteína, que ligam a cavidade central com o ambiente externo. Possuem 8 canais *3-fold* e seis canais *4-fold*. Os canais *3-fold* estão alinhados tanto por resíduos hidrofílicos quanto por hidrofóbicos, e são significativamente menos polares do que seus equivalentes em ferritinas eucariotas. Já os canais *4-fold* são polares e em ambas as pontas são hidrofóbicos, em contraste com sua parte central. Outros tipos de canais, chamados "canais B" também estão presentes, e ocorrem quando um dímero de subunidades encontra outro dímero (BRUN et al., 2010). As ferritinas bacterianas são capazes de acomodar cerca de 2500 átomos de ferro em sua cavidade central (BRIAT et al., 2010).

Figura 2 - Estrutura das proteínas Ftn.

(A) Representação esquemática dos dímeros das subunidades da FtnA de *E. coli*. (B) Estrutura geral de um 24-mero da FtnA.

FONTE: Brun et al. (2010).

1.2.1.2 *Bacterioferritinas (Bfr)*

Bacterioferritinas são mais comuns em bactérias do que ferritinas, tendo, inclusive, sido descobertas antes. As bacterioferritinas compartilham somente de 10 a 15 % de

similaridade de sequência de aminoácidos com as Ftn. Elas protegem os componentes celulares dos danos oxidativos e, conseqüentemente, atuam de maneira importante no combate ao estresse oxidativo (CHIANCONE et al., 2004).

As proteínas Bfr podem acomodar cerca de 1800 átomos de ferro em sua cavidade central (BRIAT et al., 2010), e são compostas por 4 feixes de α -hélices, com uma quinta hélice pequena em posição C-terminal. Uma longa alça liga as hélices B e C, de modo que tais hélices são paralelas. Suas 24 subunidades estão dispostas de uma maneira altamente simétrica, com um dímero de subunidades formando cada face de um dodecaedro (Figura 3). As bacterioferritinas são na maioria dos casos homopolímeros. Algumas bactérias, como, por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa* e *P. putida* codificam em seus genomas duas subunidades distintas de Bfr, mas não está claro se estas estão organizadas em heteropolímeros. Bfr contém oito canais de simetria *3-fold* e seis canais de simetria *4-fold* (Figura 3); ambos os tipos de canais são hidrofílicos. Além destes, existem 12 canais B por bacterioferritina. Dentre todas as ferritinas, somente as Bfr contém grupos heme (cerca de 12 por 24-mero), representados na Figura 4 (BRUN et al., 2010).

Figura 3 - Estrutura de Bfr.

(A) Representação esquemática de Bfr em *E. coli*, FD: centro de ferroxidase. (B-D) Estruturas gerais dos 24-meros. Eixos de simetria: (B) 2-fold. (C) 4-fold (D) 3-fold.

FONTE: Brun et al. (2010).

Figura 4 - Sítio heme de Bfr.

Representação esquemática mostrando sítio de ligação heme via dois resíduos de metionina (um pra cada monômero).

FONTE: Brun et al. (2010).

1.2.1.3 Proteínas Dps

A primeira proteína Dps foi descoberta em *E. coli*, e verificou-se tratar de uma proteína ligante de DNA, não específica, com papel de proteger o DNA de estresse oxidativo. Assim, o principal papel de Dps em *E. coli* é proteger o DNA contra a ação combinada do ferro (Fe^{2+}) e H_2O_2 na produção de radicais hidroxila livres (ANDREWS et al., 2003). Desse modo, além de Dps nas bactérias possuir capacidade de estocagem de ferro, também apresenta capacidade de destoxificação, atenuando o efeito das ROS (CHIANCONE et al., 2004).

Todas as proteínas Dps (também chamadas miniferritinas) são caracterizadas por uma arquitetura tridimensional comum e são encontradas como dodecâmeros esféricos com uma cavidade central oca. Os monômeros de Dps se dobram formando quatro hélices compactas (Figura 5). Tal dobramento é essencialmente semelhante ao das ferritinas e bacterioferritinas, sugerindo uma evolução ancestral comum. No entanto, em contraste com estas, que formam 24 subunidades, os monômeros de Dps se compactam em conjunto para formar uma estrutura de 12 subunidades (Figura 5b). A falta nas Dps de uma quinta hélice, presente nas demais ferritinas, tem sugerido que esta hélice seria responsável pela formação dos 24-meros. Cada dodecâmero tem uma arquitetura esférica com uma cavidade no meio capaz de acomodar até 500 átomos de ferro, quantidade menor que nos outros tipos de ferritinas (HAIKARAINEN; PAPAGEOURGIOU, 2010).

Figura 5 - Estrutura da proteína Dps.

(A) Os monômeros da proteína. (B) 12-mero visto ao longo do eixo de simetria.

FONTE: Haikarainen e Papageorgiou (2010).

A estrutura proteica tridimensional e as funções das ferritinas são conservadas (THEIL, 2007) e sugere-se que as características de regulação gênica relativas às necessidades dos organismos também sejam. Os detalhes destes mecanismos regulatórios e de mecanismos regulatórios relacionados ao metabolismo de ferro serão especificados abaixo.

1.3 Mecanismos regulatórios

Várias situações de estresse e mudanças no crescimento levam à indução de respostas globais, geralmente afetando a atividade ou síntese de um regulador transcricional (GOTTESMAN, 2005). Respostas genéticas a estresse oxidativo ocorrem em bactérias, leveduras, mamíferos, e em praticamente todos os organismos aeróbicos. Os organismos vivos tiveram que desenvolver mecanismos para se proteger contra o estresse

oxidativo, com enzimas como catalases ou superóxido dismutases; e as respostas bacterianas contra tais estresses são controladas por dois principais reguladores transcricionais, OxyR e SoxRS (CABISCOL et al., 2000).

Bactérias tipicamente regulam o metabolismo de ferro em resposta à sua disponibilidade. Em *E. coli*, e muitas outras bactérias, essa regulação é mediada pela proteína Fur (do inglês *Ferric-uptake regulator*) que controla a expressão de mais de 90 genes dependentes de ferro em *E. coli* (SALVAIL; MASSÉ, 2012). Nessa bactéria, *fur* é induzido por OxyR em resposta a estresse oxidativo mediado por H₂O₂ (ANDREWS et al., 2003).

Fur atua como um clássico repressor transcricional, reprimindo a transcrição por meio da interação com o corepressor Fe²⁺. O complexo Fe-Fur normalmente se liga entre os sítios -10 e -35 dos promotores reprimidos por ele. O sítio de ligação de Fur é comumente denominado 'Fur box', tendo sido proposta em *E. coli* uma sequência consenso palindrômica de 19-pb: 5' GATAATGATAATCATTATC 3' (ESCOLAR et al., 1998). Essas sequências geralmente estão localizadas na região promotora do gene alvo e tal ligação ferro-dependente bloqueia o acesso da RNA polimerase ao promotor (MASSÉ; GOTTESMAN, 2002).

A principal função fisiológica de Fur é reprimir genes de captação de ferro, em condições de níveis de ferro suficientes. Entretanto, também há evidências de que genes não envolvidos no metabolismo de ferro (tais como *cyoA* – respiração, *gpmA* – glicólise, *metH* – biossíntese de metionina, *sodA* – resistência a estresse oxidativo, *nrdH* – síntese de DNA, entre outros) também sejam reprimidos por Fur, caracterizando-o como um regulador global. Em seguida à descoberta inicial de Fur em *E. coli*, homólogos de Fur

foram subsequentemente encontrados em um grande número de bactérias Gram-negativas e algumas Gram-positivas (ANDREWS et al., 2003).

Quando ferro se torna escasso para a célula, Fur é inativado pela liberação do cofator (o íon de ferro), e genes sob o controle de Fur são transcritos. Essencialmente todos os genes envolvidos na captação de ferro são Fur-dependentes (MASSÉ; GOTTESMAN, 2002). Assim, a inativação de *fur* resulta na desregulação do metabolismo de ferro e aumenta a sensibilidade da bactéria ao estresse oxidativo, possivelmente devido ao aumento da quantidade de ferro livre intracelular. Isso sugere que Fur regula a concentração de ferro livre intracelular por meio da modulação da captação de ferro e consumo (estocagem) do mesmo; assim, na ausência de Fur, a captação e a estocagem ficam desbalanceadas tornando excessivos os níveis de ferro livre intracelular.

Muitos genes de *E. coli* (*bfr*, *ftnA*, *sodB*, entre outros) são conhecidamente induzidos por ferro de maneira Fur-dependente. Entretanto, tais genes aparentemente não possuem 'Fur box' e, portanto, parecem ser indiretamente regulados por Fur. Nesta bactéria, o gene induzido por Fe-Fur mais bem estudado é *sodB*, que codifica a superóxido dismutase dependente de ferro, relacionado à resposta a estresse oxidativo. Sabe-se que Fur não se liga a *sodB* e trabalhos com um gene reprimido pelo complexo Fe-Fur (denominado *ryhB*), que codifica um pequeno RNA regulatório (RyhB), demonstraram que o mecanismo de ativação de transcrição de *sodB* e de vários outros genes ativados por Fur é indireto e mediado por RyhB (WASSARMAN et al., 2001; MASSÉ; GOTTESMAN, 2002).

1.4 Pequenos RNAs não-codificantes

Pequenos RNAs (abreviados como sRNAs do inglês *small RNAs*), são RNAs não-codificantes geralmente contendo menos que 300 nucleotídeos que estão envolvidos em uma variedade de funções celulares, como a modulação da atividade da RNA polimerase, marcação de proteínas para degradação (no caso de SsrA ou tmRNA¹), e regulação da tradução (MASSÉ; GOTTESMAN, 2002). Pequenos RNAs podem atuar na regulação tanto da síntese de proteínas, afetando a transcrição do mRNA, sua tradução e estabilidade, quanto na atividade de proteínas específicas, ligando-se a elas (GOTTESMAN, 2005).

A regulação da expressão de genes por sRNAs é conhecida há muito em *E. coli*, desde a descoberta de MicF, envolvido na regulação da expressão de *ompF*, que codifica uma porina da membrana externa (ANDERSEN et al., 1987). A caracterização de diversos outros sRNAs, como DsrA e OxyS, mostrou que esses sRNAs são amplamente envolvidos na regulação da expressão gênica, em níveis pós-transcricionais (AIBA, 2007).

Em *E. coli* aproximadamente 80 sRNAs foram identificados, porém a função da maioria deles ainda é pouco conhecida. Os sRNAs de *E. coli* são codificados em regiões intergênicas e é geralmente conservados apenas entre espécies muito relacionadas, o que dificulta sua identificação em outros organismos apenas com base em análises por similaridade de sequência. Um artigo publicado em 2008 por Landt et al. identificou e

¹ SsrA ou tmRNA: RNA mensageiro de transferência (abreviado tmRNA, também conhecido como 10Sa RNA, ou por SsrA) é uma molécula de RNA bacteriano com dupla propriedade de RNA transportador e RNA mensageiro. Estruturas formadas com esses RNAs interagem com complexo traducional, liberando o ribossomo e marcando polipeptídeos e RNAm para degradação (KEILER, 2008).

validou 27 novos sRNAs para *Caulobacter crescentus*. Outros possíveis candidatos a sRNA foram também mencionados, mas não investigados em detalhe neste estudo.

Em bactérias, quando o nível de ferro aumenta, a proteína Fur reprime a iniciação de transcrição de genes de captação de ferro. Adicionalmente, Fur também regula positivamente genes de proteínas que usam ferro; Fur reprime o sRNA RyhB, que facilita a degradação dos mRNAs positivamente regulados por Fur (MASSÉ et al., 2007; STORZ et al., 2004). Tal mecanismo de regulação é esquematizado na Figura 6.

Figura 6 - Regulação de ferro recém-captado por Fur e RyhB.

Depois de o íon de ferro ter sido captado, ele fica momentaneamente livre no citoplasma, antes de ser incorporado por proteínas (essenciais e não essenciais) ligantes de ferro. Em condições em que o nível de ferro livre aumenta consideravelmente, Fur torna-se ativo e reduz a expressão de genes de aquisição de ferro. Entretanto, quando o nível de ferro livre diminui, a proteína Fur é inativada, o que induz à expressão de genes de aquisição de ferro e do pequeno RNA RyhB. Em seguida, RyhB rapidamente bloqueia a síntese de proteínas não essenciais ligantes de ferro, permitindo o uso do ferro disponível pelas proteínas essenciais.

FONTE: Massé et al. (2007).

Em situações de limitação de ferro ou em mutantes *fur*, *ryhB* é fortemente expresso, como resultado da liberação da repressão pela proteína Fur, e isto causa uma dramática diminuição nos níveis de muitos RNA mensageiros, sendo alguns destes alvos os genes codificantes para proteínas envolvidas na estocagem de ferro, como bacterioferritina (*bfr*) e ferritina (*ftnA*), ou para a enzima superóxido dismutase dependente de ferro (*sodB*) (MASSÉ et al., 2003; MASSÉ; GOTTESMAN, 2002; SALVAIL; MASSÉ, 2012). Assim, Fur indiretamente participa da mediação da estocagem intracelular de ferro e sua utilização, bem como da aquisição do metal (MASSÉ; GOTTESMAN, 2002). Fur regula *ryhB* negativamente, e RyhB regula negativamente outros genes, resultando numa regulação positiva de Fur (dependente de RyhB) (MASSÉ et al., 2003). Em outras palavras, RyhB, sendo um regulador negativo reprimido por Fe²⁺-Fur, age sobre os genes induzidos (indiretamente) pelo complexo Fur.

Embora Fur e ferro diretamente regulem RyhB, evidências fortes sugerem que RyhB sozinho também é capaz de influenciar o nível de ferro intracelular (MASSÉ et al., 2007). A expressão de RyhB resulta em aumento de 50 % da concentração de ferro intracelular. Esse aumento ativa Fur, que reprime a transcrição de muitos genes envolvidos na captação de ferro. Deste modo, RyhB reduz a ligação do ferro recém-captado por proteínas não essenciais, permitindo que apenas proteínas essenciais tenham acesso ao metal. Essa regulação reforça a ideia de que as ações de Fur e RyhB ajustam a manipulação interna de ferro (MASSÉ et al., 2007).

Além disso, um estudo de Massé e colaboradores (2005) realizou ensaios usando a técnica de microarranjos de DNA, e confirmou a maior parte dos alvos de RyhB previamente identificados. Este estudo também mostrou que o pequeno RNA regula pelo

menos 18 transcritos, codificando um total de 56 proteínas, a maior parte delas envolvida no metabolismo de ferro.

Há diversos mecanismos pelos quais RyhB regula a expressão gênica. Dentre eles, ocorre uma repressão de tradução de seu próprio regulador transcricional Fur, onde RyhB afeta a tradução da ORF à montante de Fur, de maneira que, com essa repressão, se possa prevenir a superacumulação de Fur em situações de escassez de ferro (VECEREK et al., 2007). Através de regulação gênica pós-transcricional, RyhB é capaz de estimular a expressão de grande número de genes envolvidos no metabolismo de ferro, apesar de, até o momento, o único alvo direto positivo a ser caracterizado é o mRNA do gene *shiA*, que codifica uma permease de shikimato, um composto requerido para a síntese de sideróforos (PRÉVOST et al., 2011). Entretanto, o mecanismo mais comum, que foi primeiramente caracterizado e que neste estudo é mais relevante, é a ação do pequeno RNA levando à degradação de mRNA-alvos, descrito a seguir.

O primeiro passo no mecanismo de ação de RyhB (Figura 7) é o pareamento de maneira complementar com seu mRNA alvo. A presença da chaperona de RNA Hfq é essencial para manter a estabilidade de RyhB e o pareamento com seu mRNA-alvo (GOTTESMAN, 2005; STORZ et al., 2004). A seguir, ocorre à rápida codegradação do híbrido sRNA/mRNA por meio da RNase E, que é parte de um complexo multiproteico chamado degradossomo. Esse mecanismo providencia um rápido desligamento de RyhB assim que o estresse pela falta de ferro é aliviado (MASSÉ et al., 2007).

Figura 7 - Modelo de silenciamento gênico por RyhB.

Hfq associa-se com a região C-terminal da RNase E formando o complexo Hfq/RNase. A transcrição de *ryhB* é induzida por Fur em resposta à limitação de ferro. RyhB forma um complexo ribonucleoproteico com o Hfq/RNase para agir no sítio de ligação do ribossomo em mRNAs-alvo, por meio do emparelhamento imperfeito das bases. Isso leva à inibição da tradução e à rápida degradação dos mRNAs-alvo.

FONTE: Modificado de Aiba (2007).

Apesar de RyhB ser extensivamente caracterizado em *E. coli*, um pequeno RNA homólogo a RyhB regulado por Fur-Fe também foi caracterizado em *Vibrio cholerae*, em *Shigella dysenteriae* e em *Shigella flexneri*. Estão presentes em outras espécies mecanismos de expressão gênica pós-transcricionais em resposta ao metabolismo de ferro, como os reguladores PrrF1/PrrF2 em *Pseudomonas aeruginosa*, ArrF em *Azobacter vinelandii*, NrrF em *Neisseria meningitidis*, RfrA/RfrB em *Salmonella enterica*, FsrA em

Bacillus subtilis, todos esses pequenos RNAs também induzidos na escassez de ferro e regulados por Fur (SALVAIL; MASSÉ, 2012).

Na atualidade, o conhecimento sobre metabolismo de ferro e sua maquinaria regulatória tem avançado juntos. Como RyhB regula vários genes, ele é considerado um regulador global do metabolismo de ferro e o número de genes regulados por ele pode ser muito maior do que o atualmente conhecido. Por regular todos esses genes, RyhB é essencial para o funcionamento normal das funções como crescimento em limitação de ferro, formação de biofilme ou quimiotaxia. Esse grande nível de complexidade no metabolismo celular reforça a noção de que o ferro é um dos nutrientes mais cruciais e que os organismos desenvolveram elegantes estratégias para mantê-lo sob controle.

1.5 Regulação da expressão das ferritinas

Há muitos genes codificando ferritinas que, em geral, respondem a diferentes sinais ambientais. Do ponto de vista do organismo, o desenvolvimento de regulação da expressão das ferritinas é devido à estocagem de ferro para a próxima geração de organismos ou outras células da comunidade (THEIL, 2007).

Estudos diversos sobre as ferritinas existem em várias bactérias, mas quanto aos mecanismos regulatórios as conclusões mais bem estabelecidas são em *E. coli*. Nesta bactéria, a ferritina A e a bacterioferritina são indiretamente reguladas por Fur, que reprime a síntese de RyhB e que, por sua vez, regula negativamente a síntese de muitas proteínas, inclusive estas estocadoras de ferro (VELAYUDHAN et al., 2007). O gene *ftnA* é induzido por ferro e também em fase estacionária (ANDREWS et al., 2003). Muitos dos genes *bfr* estão associados a um gene (*bfd*) que codifica uma possível ferredoxina conhecida como Bfd (do inglês *Bfr-associated ferredoxin*). Essa proteína em *E. coli* é induzida por limitação

de ferro e tem baixo potencial redox (QUAIL et al., 1996). Há indícios de que Bfd atua mediando a redução de Bfr, levando a liberação de ferro em situações limitantes (GARG et al., 1996). Além disso, a primeira proteína Dps foi descoberta em *E. coli* e verificou-se que é induzida em fase estacionária pelo fator sigma, σ^s (ALMIRON et al., 1992). Em *E. coli*, a expressão de *dps* também é regulada pela atividade do fator de transcrição OxyR (CHIANCONE et al., 2004).

No estudo de Velayudhan et al. (2007) foi mostrado, entre outros, que Bfr é a maior estocadora de ferro em *Salmonella enterica* sv. Typhimurium. Mutantes para proteínas estocadoras apresentam aumento de susceptibilidade a estresse oxidativo, e as proteínas estocadoras são reguladas diferencialmente por um equivalente a Fur (possivelmente com intermédio de equivalente a RyhB). Em *Salmonella* há a repressão de *dps* por Fur e a indução deste gene em condições de limitação de ferro, na qual *bfr* é altamente expresso em condições abundantes de ferro. O estudo também mostrou que a inativação de *bfr* eleva a concentração intracelular de ferro livre e aumenta a susceptibilidade ao estresse provocado por peróxido de hidrogênio. Também indicou para *Salmonella* o que já havia sido notado em *E. coli*, que defeitos na estocagem de ferro são apenas evidentes em células crescidas em meio com excesso de ferro em fase estacionária.

Em *Pseudomonas putida*, estudo realizado por Chen et al. (2010) mostrou que suas duas bacterioferritinas, *bfr α* e *bfr β* , são reguladas por Fur. Nesta espécie, há ausência de "fur boxes", a bactéria possui dois pequenos RNAs, PrrF1 e PrrF2, com função similar à RyhB, mas que não afetam a expressão das bacterioferritinas. Portanto, os mecanismos pelos quais Fur regula positivamente *bfr α* e *bfr β* permanecem desconhecidos. Já na bactéria *Erwinia chrysanthemi*, que possui em seu genoma *bfr* e *ftnA*, ambos os genes são

regulados indiretamente por Fur via o pequeno RNA RyhB (BOUGHAMMOURA et al., 2008).

Outros estudos mostram que *Bacillus subtilis* possui duas proteínas Dps reguladas pelo fator sigma B no crescimento exponencial (THEIL, 2007) e por PerR, que também regula Dps em outras bactérias (HAIKARAINEN; PAPAGEORGIOU, 2010). Em *Porphyromonas gingivalis* a expressão de Ftn e Dps é regulada por OxyR (CHIAZONE et al., 2004), assim como DpsA de *Burkholderia pseudomallei* (LOPRASERT et al., 2004).

Em muitos organismos, a presença de um fator similar a RyhB ainda não foi demonstrada. Entretanto, evidências cada vez mais sugerem a existência de moléculas (sRNA ou uma proteína) que reprimem a codificação de genes de proteínas de ferro durante limitação deste metal (MASSÉ et al., 2007).

1.6 *Caulobacter crescentus*

Vários genes envolvidos em funções regulatórias são encontrados em bactérias de vida livre, posto que elas necessitam responder a flutuações amplas das condições ambientais (CASES et al., 2003). Porém, muito pouco se sabe a respeito da regulação gênica em resposta a ferro em alfa-proteobactérias, sendo os poucos estudos concentrados em Rhizobiales e Rhodobacterales (JOHNSTON et al., 2007). As alfa-proteobactérias incluem muitos gêneros importantes, dentre eles os fixadores de nitrogênio, patógenos de plantas e mamíferos, e muitos outros de interesse ambiental, ou também estudados por suas particularidades não usuais.

Caulobacter crescentus é uma alfa-proteobactéria oligotrófica de água doce que tem sido um importante modelo de estudo do processo de diferenciação em bactérias. Em

seu ciclo celular (Figura 8) verifica-se que ela se divide assimetricamente gerando uma célula-talo (séssil) e outra célula flagelada (móvel) (LAUB et al., 2007). Os dois tipos celulares não são apenas morfologicamente distintos, mas também possuem programas de desenvolvimento e funções biológicas diferentes: a célula móvel não pode iniciar a replicação de seu cromossomo até que um terço do ciclo celular tenha ocorrido. Neste momento, os pili são reabsorvidos, o flagelo é ejetado e um talo é sintetizado neste sítio, transformando-se na célula-talo; esta é capaz de iniciar a replicação do DNA e promove o brotamento de nova célula flagelada no pólo oposto (AUSMEES; JACOBS-WAGNER, 2003).

Figura 8 - Ciclo de vida de *Caulobacter crescentus*.

A fase G₁, correspondente à célula móvel, e antecede a fase de replicação do material genético (a fase S). Durante a fase S, a célula móvel perde o flagelo e inicia a formação de um talo no mesmo pólo. A seguir, tem início a fase G₂, caracterizada pela citocinese e formação de duas células filhas distintas, uma flagelada e móvel e outra séssil, portando o talo.

FONTE: Curtis e Brun (2010).

A célula-talo é séssil e adere a superfícies através de um polissacarídeo adesivo localizado na extremidade do talo, que é uma extensão do envelope celular. A célula móvel possui um único flagelo, vários pili e quimiorreceptores, apresentando motilidade e atividade quimiotática. Para que estas células repliquem o DNA e reiniciem o ciclo, elas devem se diferenciar em células-talo. Um cromossomo é distribuído para cada pólo da célula pré-divisional e, a seguir, ocorre à formação do septo e, finalmente, a divisão celular (JENAL, 2000; SKERKER; LAUB, 2004; VIOLLIER; SHAPIRO, 2004).

O dimorfismo celular de *C. crescentus* apresenta relação com a adaptação às condições ambientais em que esta bactéria vive. *Caulobacter* comumente vive em condições de baixos nutrientes por longos períodos de tempo. Assim, suas células são equipadas com sensores ambientais, sistemas de transportadores e caminhos metabólicos adaptáveis à exploração de metabólitos provenientes de material em decomposição. A adaptação da bactéria para sua sobrevivência em condições oligotróficas inclui a habilidade de crescer lentamente em condições de baixos nutrientes, e de parar a progressão do ciclo celular em condições de escassez de carbono e nitrogênio. Há sistemas de sensores de resposta especializados para lidar com a resposta a diversas situações ambientais (osmolaridade, temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes). Em cada caso, a progressão do ciclo celular tem que se adaptar rapidamente à situação externa (LAUB et al., 2007). Sendo assim, o dimorfismo de *C. crescentus* possibilita a exploração de ambientes mais favoráveis pela forma flagelada e a colonização do nicho pela forma séssil replicativa, evidenciando a relação entre a percepção das condições ambientais, a diferenciação celular e a adaptação ao ambiente (HALLEZ et al., 2004). Ainda, o fato de *C. crescentus* habitar ambientes com baixas concentrações de nutrientes e ter metabolismo aeróbio obrigatório torna interessante o estudo dos mecanismos

utilizados por esta bactéria para adquirir ferro do ambiente e manter níveis adequados do metal, a fim de contrabalançar a toxicidade e a solubilidade deste em condições aeróbias.

Caulobacter crescentus possui um genoma de 4.016.942 pares de bases em um único cromossomo circular, codificando 3.767 genes, e foi a primeira α -proteobactéria de vida livre que teve o genoma sequenciado, possibilitando a investigação deste organismo por uma variedade de técnicas genéticas, bioquímicas e de biologia celular (NIERMAN et al., 2001).

A resposta ao estresse oxidativo em *Caulobacter crescentus* tem sido bastante estudada e, recentemente, muitos dos passos regulatórios têm sido elucidados. *C. crescentus* tem diversas enzimas antioxidantes: uma superóxido dismutase de ferro citossólica (SodB), uma superóxido dismutase de cobre-zinco periplasmática (SodC), e uma catalase-peroxidase (KatG). Radicais superóxido são removidos pelas superóxido-dismutases, gerando peróxido de hidrogênio, o qual é removido pelas catalases e pelas peroxidases. O gene *katG* codifica a única enzima com função catalase-peroxidase em *Caulobacter*. Italiani e colaboradores (2011) mostraram que *katG*, em *C. crescentus*, é regulado por OxyR, um fator de transcrição responsável por regular diferentes proteínas envolvidas na resposta a estresse oxidativo.

Recentemente, também foi mostrado para *Caulobacter* que Fur atua como ativador e repressor, integrando o metabolismo de ferro e a resposta a estresse oxidativo (ITALIANI et al., 2011; SILVA NETO et al., 2009). Trabalho realizado em nosso laboratório (SILVA NETO et al., 2009) levou à identificação de genes regulados em resposta à carência de ferro e permitiu identificar um subconjunto de genes regulados pelo repressor Fur. A análise destes dados permitiu concluir que Fur é importante para a resposta a ferro e também para a resistência a estresse oxidativo.

Sítios de ligação de Fur foram identificados em regiões regulatórias de vários genes, mostrando que genes envolvidos na tomada de ferro são reprimidos por Fe-Fur, enquanto que genes codificando proteínas que utilizam ferro são ativados por Fe-Fur. Vários genes regulados por pequenos RNAs em outras bactérias mostraram ser diretamente regulados por Fur em *Caulobacter*, mas um aspecto interessante deste trabalho foi a identificação de um sítio de ligação de Fur a montante de um possível pequeno RNA regulatório, na região do gene CC0682. Esta região foi descrita como codificando um (ou mais) pequenos RNAs regulatórios, mas não foi possível validar experimentalmente a predição (LANDT et al., 2008). O fato da presença de uma 'Fur box' na região regulatória do gene pressupõe que este poderia ser o pequeno RNA regulatório de resposta a ferro de *Caulobacter*.

Análise da sequência do genoma de *C. crescentus* (NIERMAN et al., 2001) indicou a presença de dois genes (*bfr* e *dps*) que codificam para ferritinas. Uma questão importante é que não foram encontrados sítios ligantes de Fur nas suas regiões regulatórias em *C. crescentus*, o que pode indicar que sejam regulados indiretamente, talvez por um pequeno RNA. Além disto, poderiam ser regulados pelo regulador OxyR em resposta a estresse oxidativo. Recentemente, foi obtida em nosso laboratório uma linhagem mutante deficiente no fator global de transcrição OxyR, responsável pela ativação de inúmeros genes de resposta a estresse oxidativo, que permitirá definir este ponto (ITALIANI et al., 2011).

1.6.1 Operon dos pequenos RNAs

Concomitantemente à realização deste projeto, o Dr. José Freire da Silva Neto, atualmente no Instituto de Biociências da USP / IB-USP, investigou se um possível operon contendo dois sRNAs, aqui chamados sRNA1 e sRNA2, e duas pequenas proteínas hipotéticas (CC0681 e CC0682) poderia mediar a resposta a ferro em *C. crescentus* (Figura 9). Em seu trabalho, dois sítios de ligação de Fur preditos na região regulatória deste possível operon foram validados por ensaios de alteração de mobilidade eletroforética em gel (EMSA), utilizando a proteína Fur purificada, e ensaios de RT-PCR confirmaram a existência do mRNA policistrônico CC0682-sRNA1-CC0681-sRNA2. Ensaios de Northern *blot*, usando sondas específicas para cada região, confirmaram que este operon é induzido em limitação de ferro e positivamente regulado por Fur (José F. S. Neto, comunicação pessoal).

Linhas mutantes com deleção em sRNA1, sRNA2 e CC0682 (aqui chamada $\Delta mhip$) foram obtidas por Silva Neto e utilizadas em experimentos neste trabalho.

Figura 9 - Organização genética da região CC0682-sRNA1-CC0681-sRNA2.

As setas indicam a direção da transcrição. Os números dentro de cada seta indicam o tamanho de cada região, em nucleotídeos. Para *sRNA1* e *sRNA2* os tamanhos correspondem às regiões intergênicas. Os dois sítios de ligação de Fur estão indicados pelas barras vermelhas.

FONTE: Modificado de Silva Neto (dados não publicados).

1.6.2 Fatores sigma de função extracitoplasmática

Outra linha de pesquisa liderada pela Dra Suely L. Gomes, do Instituto de Química da USP, vem estudando fatores sigma de função extracitoplasmática (ECF; *extracytoplasmic function sigma factors*) envolvidos em respostas a estresse em *Caulobacter crescentus*.

Fatores sigma são subunidades da RNA polimerase que conferem especificidade no reconhecimento dos seus promotores-alvo, para que assim transcorra o processo de transcrição. Geralmente, existe um fator sigma principal responsável pelo reconhecimento da maioria dos promotores, e vários fatores sigma alternativos que se acumulam em resposta a estresses específicos, direcionando a RNA polimerase para outros conjuntos de promotores, de modo que os genes agora expressos auxiliem a célula a enfrentar o estresse em questão (MAGNUSSON et al., 2005).

Dentre os fatores sigma alternativos, existem aqueles designados como tendo função extracitoplasmática (ECF), sendo responsáveis principalmente pela expressão de genes em resposta a sinais ambientais, como choque de calor, estresse osmótico e estresse oxidativo (HELMANN, 2005; LONETTO et al., 1994; MISSIAKAS; RAINA, 1998).

Alvarez-Martinez e colaboradores (2007) realizaram um estudo de fatores sigma ECF envolvidos em resposta a estresse oxidativo em *Caulobacter*. Nesse estudo foi demonstrada a indução de expressão gênica por dois fatores sigma (σ^T e σ^U , ou *sigT* e *sigU*) em diversas condições de estresse. Esses fatores sigma possuem o mais alto grau de similaridade dentre os 13 sigmas ECF presentes e identificados previamente no genoma de *Caulobacter crescentus* (NIERMAN et al., 2001). Neste trabalho de 2007 foi mostrado que *sigT* é essencial em resposta a estresses oxidativo (em tratamento com

H₂O₂) e osmótico (gerado por NaCl e sacarose). Também foram identificados 40 genes putativos do seu regulon, incluindo *sigU*, cuja expressão mostrou ser totalmente dependente de *sigT*. Os dados do trabalho sugerem que estes genes estão envolvidos na regulação de diversas respostas a estresse, controlando a expressão de uma vasta quantidade de genes, sugerindo-se também que SigT seja um importante regulador geral de resposta a estresses em *Caulobacter*.

Num trabalho mais recente do mesmo grupo (LOURENÇO et al., 2011) foram identificados, pela técnica de microarranjo, outros genes que fazem parte do regulon de SigT, dentre eles CC2873 que codifica Dps, aqui objeto de estudo. As linhagens mutantes para os genes *sigT* e *sigU* foram gentilmente cedidas ao nosso laboratório, com as quais realizamos ensaios que visaram esclarecer os mecanismos regulatórios da expressão das ferritinas em resposta à homeostase de ferro.

Assim, neste trabalho apresenta-se o estudo fenotípico das linhagens de *Caulobacter* mutantes para as ferritinas Bfr e Dps, e a análise dos sinais e fatores reguladores de sua expressão. O estudo da expressão dos genes das ferritinas baseou-se em respostas a níveis de ferro e ao estresse oxidativo nas diversas linhagens averiguadas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Os objetivos gerais deste trabalho são:

- a. A definição do papel de duas proteínas estocadoras de ferro (ferritinas) envolvidas no metabolismo de ferro em *Caulobacter crescentus*, bem como a averiguação de seus mecanismos regulatórios;
- b. A análise da expressão tanto das ferritinas quanto do transcrito putativo do pequeno RNA, em resposta a níveis de ferro e ao estresse oxidativo.

2.2 Objetivos específicos

- a. Deleção dos genes codificantes das duas ferritinas (CC3262 – Bfr e CC2873 – Dps);
- b. Análise dos fenótipos dos mutantes quanto ao metabolismo de ferro e estresse oxidativo;
- c. Clonagem das regiões regulatórias dos genes à frente de um gene repórter de transcrição *lacZ* e ensaios de expressão dos genes das ferritinas e do transcrito contendo o pequeno RNA;
- d. Avaliação do papel de cada ferritina no acúmulo de ferro por dosagem de ferro intracelular.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

A linhagem sincronizável NA1000 de *Caulobacter crescentus* (EVINGER; AGABIAN, 1977) foi usada como linhagem parental. As linhagens de *Escherichia coli* DH5 α (HANAHAHAN, 1983) e S17-1 (SIMON et al., 1983) foram utilizadas para procedimentos de clonagem e conjugação, respectivamente.

E. coli foi cultivada a 37 °C em meio LB (triptona 10 g/l; extrato de levedura 5 g/l; NaCl 10 g/l; pH 7,5) (AUSUBEL et al., 1995) ou 2xTY (triptona 16 g/l; extrato de levedura 10 g/l; NaCl 5 g/l; pH 7,4), suplementados com antibióticos adequados (ampicilina 100 μ g/ml, tetraciclina 12,5 μ g/ml, canamicina 50 μ g/ml), quando necessários.

C. crescentus foi cultivada a 30 °C em meio rico PYE (peptona 2 g/l; extrato de levedura 1 g/l; MgSO₄ 0,2 g/l; CaCl₂ 0,5 mM) (ELY, 1991), adicionando-se antibióticos (ácido nalidíxico 20 μ g/ml, tetraciclina 1 μ g/ml, canamicina 5 μ g/ml, espectinomicina 20 μ g/ml) ou 3 % sacarose, quando necessários.

Os meios sólidos para placas continham 1,5 % de ágar.

As linhagens e plasmídeos usados neste trabalho estão listadas nas Tabelas 1 e 2, a seguir.

Tabela 1 - Linhagens utilizadas.

	Linhagens	Descrição	Referência
<i>Caulobacter crescentus</i>	NA1000	Linhagem sincronizável utilizada como padrão	Evinger e Agabian, 1977
	Δbfr	NA1000 ($\Delta CC3262$)	Este trabalho
	Δdps	NA1000 ($\Delta CC2873$)	Este trabalho
	$\Delta bfr/dps$	NA1000 ($\Delta CC3262$ / $\Delta CC2873$)	Este trabalho
	SP0057	NA1000 (Δfur)	Silva Neto et al., 2009
	SP3811	NA1000 $\Delta oxyR::\Omega spec$	Italiani et al., 2011
	SP1004	NA1000 ($\Delta sRNA1$)	José F. S. Neto
	SP1005	NA1000 ($\Delta sRNA2$)	José F. S. Neto
	SP1003	NA1000 ($\Delta CC0682$ ou $\Delta mhip$)	José F. S. Neto
	$\Delta sigJ$	NA1000 $\Delta sigJ$	Suely L. Gomes
	ML161	$\Delta sigT$, deleção em fase	Alvarez-Martinez et al., 2007
	SG546	$\Delta sigU::\Omega spec$	Alvarez-Martinez et al., 2007
<i>Escherichia coli</i>	S17-1	294::RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)	Simon et al., 1983
	DH5 α	<i>supE44</i> $\Delta lacU169$ ($\Phi 80/lacZ\Delta M15$) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983

Tabela 2 - Plasmídeos utilizados (continua).

	Plasmídeo	Características	Fonte ou referência
<i>Escherichia coli</i>	pGEM-T Easy	Vetor de clonagem, Apr ^r	Promega ²
	pGEM <i>bfrdel12</i>	Vetor de clonagem contendo região flanqueadora à montante do gene <i>bfr</i>	Este trabalho
	pGEM <i>bfrdel34</i>	Vetor de clonagem contendo região flanqueadora à jusante do gene <i>bfr</i>	Este trabalho
	pGEM <i>dpsdel12</i>	Vetor de clonagem contendo região flanqueadora à montante do gene <i>dps</i>	Este trabalho
	pGEM <i>dpsdel34</i>	Vetor de clonagem contendo região flanqueadora à jusante do gene <i>dps</i>	Este trabalho
	pGEM <i>sRNA1del12</i>	Vetor de clonagem contendo região flanqueadora à montante do suposto gene do pequeno RNA entre as ORFs CC0681 e CC0682	Este trabalho
	pGEM <i>sRNA1del34</i>	Vetor de clonagem contendo região flanqueadora à jusante do suposto gene do pequeno RNA entre as ORFs CC0681 e CC0682	Este trabalho

(continua)

² Promega Co., Madison, WI, E.U.A.

Tabela 2 - *Plasmídeos utilizados* (continuação).

Plasmídeo	Características	Fonte ou referência
pGEM <i>mhipdel12</i>	Vetor de clonagem contendo região flanqueadora à montante do gene da proteína hipotética CC0682	Este trabalho
pGEM <i>mhipdel34</i>	Vetor de clonagem contendo região flanqueadora à jusante do gene da proteína hipotética CC0682	Este trabalho
pMR20	Vetor de clonagem, de baixo número de cópias e ampla gama de hospedeiros, Tc ^r , <i>oriT</i>	Roberts et al., 1996
pMR20 <i>bfr</i> ^c	Vetor de Clonagem, contendo o gene CC3262 contendo sua região promotora	Este trabalho
pNPTS138	Replicon ColE1, <i>oriT</i> , <i>npt</i> (<i>Km</i>) <i>sacB</i> , derivado do pNPTS129	Tsai e Alley, 2000
pNPTS138 Δ <i>bfr</i>	Vetor pNPTS138 contendo as regiões flanqueadoras do gene CC3262	Este trabalho
pNPTS138 Δ <i>dps</i>	Vetor pNPTS138 contendo as regiões flanqueadoras do gene CC2873	Este trabalho

(continua)

Tabela 2 - *Plasmídeos utilizados* (conclusão).

	Plasmídeo	Características	Fonte ou referência
<i>Escherichia coli</i>	pNPTS138 $\Delta bfrl$ <i>dps</i>	Vetor pNPTS138 contendo as regiões flangeadoras dos genes CC3262 e CC2873	Este trabalho
	pUCBM21	Vetor de clonagem derivado do pUC19, Ap ^r	Boehringer -Manheim
	pUCBM21 <i>bfr</i>	Vetor de clonagem derivado do pUC19, Ap ^r , contendo o gene CC3262	Este trabalho
	pRK/ <i>lacZ</i> 290	Vetor de fusão de transcrição <i>lacZ</i> , Tc ^r , replicon IncP1, <i>oriT</i>	Gober e Shapiro, 1992
	pRK/ <i>lacZ</i> 290P <i>bfr</i>	Vetor de fusão de transcrição pRK/ <i>lacZ</i> 290 contendo a região promotora do gene CC3262	Este trabalho
	pRK/ <i>lacZ</i> 290P <i>dps</i>	Vetor de fusão de transcrição pRK/ <i>lacZ</i> 290 contendo a região promotora do gene CC2873	Este trabalho
	pRK/ <i>lacZ</i> 290P <i>sRNA1</i>	Vetor de fusão de transcrição pRK/ <i>lacZ</i> 290 contendo a possível região promotora do operon contendo o provável sRNA1	Este trabalho

3.2 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados nesta etapa do trabalho estão listados na Tabela 3.

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados.

Nome	Sequência (5'→3') *
bfr fw lac	<u>TGGATCC</u> GAAGCGCTGGCTTACGCCG ⁽¹⁾
bfr rev lac ^α	TAAGCTTCGTTGAGCAGTCGGATGATGC ⁽²⁾
dps fw lac	<u>TGGATCC</u> GGGAAAAAGGGCTGGGTCGC ⁽¹⁾
dps rev lac ^α	TAAGCTTGGTGTTCAAAGCGGCGGCC ⁽²⁾
sRNA1 fw lac	<u>TGGATCC</u> CAGGACGCGGGACGGGAC ⁽¹⁾
sRNA1 rev lac ^α	TAAGCTTCAACTCACGCACGTTTCATCGC ⁽²⁾
bfr del1	GGACGATCGTTCAGGATCACC
bfr del3	TAAGCTTGCGAAGCCAACTACCTCCAG ⁽²⁾
bfr del4	<u>TGGATCC</u> GACGTTTCGCGATGATCGAG ⁽¹⁾
dps del1	<u>TGAATTCC</u> AGGCCGATCATCCGCACC ⁽³⁾
dps del3	TAAGCTTCTCGGCCTAAAGTAGCCATC ⁽²⁾
dps del4	CGTCTCATTGCCCCGAGTAAC
sRNA1 del1 ^α	<u>TGGATCC</u> GACAGGGTCGAGGCCTCCTG ⁽¹⁾
sRNA1 del2	TAAGCTTCAATACGACTCCGGCTACCGC ⁽²⁾
sRNA1 del3	TAAGCTTCTACGAAGCGGTGGACGGATC ⁽²⁾
sRNA1 del4 ^α	<u>TGAATTC</u> GTCGAATGAGCCTCGGAAAG ⁽³⁾
mhip del3	TAAGCTTGTTGGTGCTATCGGCGGG ⁽²⁾
lacZ290up	TGACGGCTACCATCA
M13 Forward -20	GTAAAACGACGGCCAG

* Nucleotídeos sublinhados indicam sítios de restrição incorporados aos oligonucleotídeos, precedidos de uma timina: ⁽¹⁾ *Bam* HI, ⁽²⁾ *Hind* III, ⁽³⁾ *Eco* RI.

^α bfr del2 = bfr rev lac; dps del2 = dps rev lac; mhip del1 = sRNA1 del1; mhip del2 = sRNA1 rev lac; mhip del4 = sRNA1 del4.

3.3 Soluções utilizadas

- Solução I para extração de DNA plasmidial: Glicose 50 mM; EDTA 10 mM; Tri-HCl 25 mM pH 8,0.
- Solução II para extração de DNA plasmidial: NaOH 0,2 N; SDS 1%.
- Solução III para extração de DNA plasmidial: Acetato de potássio 5 M pH 5,5.
- Tampão de lise para extração de DNA genômico: Tris-acetato 40 mM pH 7,8; Acetato de sódio 20 mM; EDTA 1 mM; SDS 1%.
- TE: Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0.
- TBE 5X: Tris base 0,45 M; Ácido bórico 0,44 M; EDTA 0,5 M.
- Tampão GLB (10X): Sacarose 40%; Azul de bromofenol 0,25.
- ONPG para ensaio de atividade de β -galactosidase: 4 mg/ml 0-nitrofenil- β -D-galactosídeo em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0.
- Tampão Z para ensaio de atividade de β -galactosidase: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60 mM; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mM; KCl 10 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM; β -mercaptoetanol 50 mM.

3.4 Extração de DNA cromossômico

Procedeu-se à extração do DNA cromossômico conforme descrito por Chen e Kuo (1993). Células de *Caulobacter* foram inoculadas em 2 ml de meio PYE e incubadas a 30 °C por 16h, com agitação constante de 200 rpm. Foram transferidos 1,5 ml da cultura para tubo Eppendorf e houve centrifugação por 1 minuto a 12000 x g. Ressuspenderam-se as células em 200 μ l de tampão de lise e estas foram pipetadas com vigor. Em seguida, adicionou-se 66 μ l de uma solução de NaCl 5 M, seguido de agitação para

homogenização. Esta mistura foi centrifugada a 4 °C por 10 minutos a 12000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, aonde foi adicionado um volume igual de clorofórmio. Esses tubos foram invertidos vagarosamente, até não mais apresentar separação de fases. Esta mistura foi centrifugada por 3 minutos a 12000 x g e o sobrenadante foi transferido para outro tubo, aonde foi adicionado o dobro do volume de etanol. Em seguida a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 12000 x g. O DNA foi lavado com etanol 70% por duas vezes, seco e ressuspendido em 50 µl de TE contendo RNase A (20 µg/ml).

3.5 Reações em cadeia da polimerase (PCR) e clonagens

As PCR foram realizadas com 0,5 µl de DNA cromossômico de NA1000, 50 pmol de cada oligonucleotídeo (bfr fw lac / bfr rev lac; dps fw lac / dps rev lac; sRNA1 fw lac / sRNA1 rev lac; bfr del1 / *bfr del2*, bfr del3/ bfr del4; dps del1 / *dps del2*, dps del3 / dps del4; sRNA del1 / sRNA1 del2; sRNA1 del3 / sRNA1 del4; *mhip del1* / *mhip del2*, mhip del3 / *mhip del4*); 0,2 mM de uma mistura de dNTPs (Invitrogen); 1,25 U de Platinum Pfx DNA Polymerase (Invitrogen Brasil, São Paulo, SP, Brasil); 3 mM de MgSO₄; 0,5X de Enhancer e 1X tampão PCR fornecidos pelo fabricante. As condições do PCR foram de 94°C por 4 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, [(T_m dos oligonucleotídeos³) – 10 °C] por 30 segundos e 68 °C por 1 minuto. Após os 30 ciclos a reação permaneceu a 68 °C por 7 minutos e foi mantida a 4 °C. Alíquotas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1 % em tampão de corrida TBE, utilizando como marcador de peso molecular 1kb Plus DNA ladder – Invitrogen (Figura 10) – para confirmação da amplificação. O gel foi

³ T_m = temperatura de *melting*.

corado com brometo de etídeo. As reações foram purificadas com o kit QIAquick (QIAGEN Biotecnologia Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Após serem purificadas, as reações foram submetidas à adição de um nucleotídeo de adenosina nas extremidades (A-Tailing).

Figura 10 - Marcador de peso molecular.

1kb Plus DNA ladder.

FONTE: Invitrogen.

3.6 Protocolo de “A-Tailing” e clonagem no pGEM-T Easy

As reações de adição de nucleotídeos de adenosina foram realizadas com 3 µl das reações de PCR, 0,2 mM de dATP (Invitrogen); 2,5 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen); 1,5 mM de MgCl₂ e 1X tampão PCR fornecido pelo fabricante. As reações permaneceram a 72 °C por 15 minutos e posteriormente foram mantidas a 4 °C. Os fragmentos de PCR com *A-tail* obtidos foram ligados no vetor de clonagem pGEM-T Easy (Promega) conforme instruções do fabricante, transformados em *E. coli* DH5α e confirmados por sequenciamento de DNA.

3.7 Transformação de células competentes por eletroporação

As transformações ocorreram por eletroporação (a 1,8 kV, 200 Ω e 25 μ F) da mistura de 40 μ l de cultura com 1 μ l das ligações, e a seguir as células foram inoculadas em 1 ml de meio LB num tubo de vidro estéril, e estes foram incubados a 37 °C por 1 hora. Quando as construções foram destinadas à conjugação com *Caulobacter*, foi utilizada para a transformação a linhagem conjugativa *E. coli* S17-1; para os passos de clonagem foi utilizada a linhagem *E. coli* DH5 α . Após a recuperação das células, a cultura foi distribuída em placas de meio LB contendo o antibiótico apropriado, que permaneciam incubadas a 37°C por 16 horas. Quando os vetores possuíam seleção por α -complementação, eram adicionados 40 μ l de X-Gal (40 mg/ml) e 40 μ l de IPTG (100 mM) ao meio de cultura das placas.

3.8 Minipreparação de DNA plasmidial (lise alcalina)

A minipreparação de DNA plasmidial foi realizada pelo método de lise alcalina (SAMBROOK et al., 1989). Colônias brancas de *E. coli* DH5 α transformadas foram inoculadas em 2 ml de meio LB, contendo o antibiótico apropriado, e incubadas a 37 °C por 16h, com agitação constante de 200 rpm.

Foram transferidos 1,5 ml de cada cultura para tubos Eppendorf, centrifugando-se por 5 minutos a 12000 x *g*. As células foram ressuspensas em 100 μ l de Solução I gelada e em seguida foram adicionados 200 μ l de Solução II. Inverterem-se os tubos, homogeneizando as amostras, adicionou-se 150 μ l de Solução III gelada e agitou-se por 10 segundos. Esses tubos foram centrifugados por 5 minutos a 4 °C e 12000 x *g* e os

sobrenadantes transferidos para outro tubo. Adicionou-se o mesmo volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugou-se por 5 minutos a 4 °C e 12000 x *g*. Em todos os tudo foram adicionados 1 mL de etanol gelado, permanecendo as amostras por 5 minutos em gelo, e centrifugou-se por 5 minutos a 4 °C e 12000 x *g*. Os precipitados foram lavados com etanol 70 %, secos e ressuspensos em 50 µl de TE contendo 20 µg/ml RNase A. Após a extração do DNA plasmidial foi realizada a digestão com as enzimas apropriadas, seguida de confirmação do resultado obtido em gel de agarose.

3.9 Sequenciamento

Para realizar o sequenciamento dos clones contendo os fragmentos clonados no pGEM-T Easy foi feita alternativamente a extração do DNA plasmidial através do “Wizard® Plus SV Minipreps Kit” (Promega) e foram utilizados oligonucleotídeos que flanqueiam a região de clonagem do plasmídeo. Aproximadamente 1 µg de cada minipreparação de DNA plasmidial foi transferido para um tubo contendo os iniciadores ‘Forward’ ou ‘Reverse’ 3,2 pmol/µl, adicionou-se 2 µl do tampão 5x e 1 µl do mix ‘Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit’ (Applied Biosystems do Brasil, São Paulo, SP, Brasil), e o volume foi completado com H₂O MilliQ para 10 µl. As condições do PCR foram 95 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 52 °C por 20 segundos e 60 °C por 4 minutos. Após os 35 ciclos a temperatura foi mantida 4 °C. A fim de precipitar as reações foram adicionados 50 µl de isopropanol 75 % aos 10 µl de reação final. Esta mistura foi homogeneizada e mantida a temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida os tubos foram centrifugados por 50 minutos a 4000 rpm a 20 °C. Os precipitados foram lavados

com etanol 70 % por duas vezes e o DNA foi seco a 37 °C por 30 minutos. As amostras secas foram encaminhadas ao Serviço de Sequenciamento de DNA, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (SSDNA IQUSP).

3.10 Análise do padrão de expressão

As regiões promotoras foram amplificadas por PCR, clonadas diretamente no pGEM-T Easy (Promega), digeridas com *Bam* HI e *Hind* III, em seguida clonadas no vetor pRK/*lacZ*290 (GOBER; SHAPIRO, 1992), que contém o gene repórter *lacZ* sem promotor. Trezentos nanogramas dos fragmentos foram utilizados para uma reação de ligação com 50 ng do vetor pRK/*lacZ*290 digerido com o mesmo par de enzimas, com 1 U de T4 DNA ligase (Invitrogen) em tampão fornecido pelo fabricante, na presença de ATP (0,5 mM). A reação de ligação foi feita por 16h a 16 °C. Na confirmação da clonagem, os oligonucleotídeos utilizados (*lacZ*290up e M13 Forward -20) amplificam o sítio múltiplo de clonagem do vetor pRK/*lacZ*290. Quando não há fragmento clonado, o resultado da reação de PCR é um fragmento de 150 pb. Quando ocorreu a clonagem, o resultado da reação é um fragmento de 150 pb mais o tamanho do inserto.

As construções foram introduzidas por eletroporação na linhagem *E. coli* S17-1 doadora (SIMON et al., 1983) e, em seguida, passadas por conjugação para as linhagens de *Caulobacter* NA1000 (parental) e mutantes (Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sRNA1$, $\Delta sRNA2$, $\Delta mhip$, $\Delta sigJ$, $\Delta sigT$ e $\Delta sigU$). Após as conjugações, as células foram semeadas em meio PYE-água acrescido de tetraciclina e ácido nalidíxico.

3.10.1 Ensaio de β -galactosidase

Células da linhagem *C. crescentus* NA1000, contendo o plasmídeo pRK/*lacZ*290 com inserto da região promotora de interesse e pRK/*lacZ*290 sem inserto, foram inoculadas em meio PYE contendo tetraciclina e incubadas a 30 °C durante a noite. Estas culturas foram diluídas para uma densidade óptica inicial (a 600 nm) de 0,1 e incubadas a 30 °C até se encontrarem em uma densidade óptica de aproximadamente 0,5. Em algumas amostras houve a adição de agentes oxidantes (ver adiante) e esperou-se 2 horas de indução para a realização dos ensaios.

Os promotores clonados à frente do gene *lacZ* geraram níveis de expressão deste gene determinados por ensaio de atividade de β -galactosidase, através do qual se pôde medir a atividade do promotor segundo o método Miller (1972).

Em um tubo Eppendorf foram adicionados 800 μ l de tampão Z, 200 μ l das culturas em fase logarítmica e 100 μ l de clorofórmio, sendo o tubo agitado brevemente e incubado por 5 minutos a 30 °C. A seguir, foram adicionados 200 μ l de ONPG ao tubo, que foi agitado e incubado a 30 °C por 5 minutos exatos, e, em seguida, a reação foi parada com a adição de 400 μ l Na₂CO₃ 1M. A mistura centrifugada por 5 minutos a 12000 x *g*. A fase aquosa foi retirada para leitura da absorbância a 420 nm e a absorbância das culturas foi lida a 600 nm. As unidades de atividade de β -galactosidase foram calculadas da forma seguinte.

$$\text{Unidades} = 1000 \times \frac{(\sum_n^1 A_{420n}) / n}{(T \times V \times A_{600})} \quad (4)$$

Onde T = tempo de incubação em minutos, V = volume de cultura utilizado em ml, n = número de réplicas do experimento.

Os ensaios de cada cultura foram realizados em triplicata (n=3). Como controle negativo foi utilizado uma cultura da linhagem *C. crescentus* NA1000 contendo somente o pRK/*lacZ*290 sem promotor. A expressão dos genes foi analisada durante a fase de crescimento exponencial (log) na presença de FeSO₄ ou 2,2'-dipiridil (DDP), ambos numa concentração final de 100 µM. Também foi avaliada a expressão na fase estacionária em tempos de 24 h e 48 h.

Para o gene *dps* também foram avaliadas possíveis alterações na fase log em presença de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), nas concentrações 30 µM e 1 mM, após os tempos de 20 e 40 minutos de exposição.

3.11 Obtenção das linhagens mutantes

As regiões do genoma que flanqueiam os genes CC3262 e CC2873, bem como a região contendo o possível sRNA entre as ORFs CC0681 e CC0682, foram amplificadas

por PCR e clonadas no pGEM-T Easy (Promega) separadamente. Em seguida, para cada mutante das ferritinas, estas regiões foram clonadas conjuntamente no plasmídeo suicida pNPTS138 (M.R.K.Alley, não publicado). A estratégia utilizada se encontra esquematizada na Figura 11. Este procedimento de mutagênese por troca alélica tem sido utilizado com sucesso para a obtenção de mutantes nulos em *C. crescentus*.

Uma alíquota dos clones contendo os fragmentos flanqueadores dos genes das ferritinas (fragmentos 1 de *bfr* e 2 de *dps*) foi digerida com *Apa* I e *Hind* III. A seguir, 200 ng destes fragmentos purificados foram ligados a 20 ng do vetor pNPTS138, previamente digerido com o mesmo par de enzimas, utilizando-se 1 U de T4 DNA ligase (Invitrogen) em volume final de 20 µl. A reação ocorreu a 16 °C por 16 horas.

Figura 11 - Estratégia de construção dos vetores pNPTS138 Δbfr (a) e pNPTS138 Δdps (b).

(a) e *pNPTS138*Δ*dps* (b). Cada flaqueador dos genes das ferritinas clonados no vetor pGEM-T Easy foram digeridos pelos pares de enzimas de restrição apropriados (*Apa* I / *Hind* III; *Hind* III / *Bam* HI e *Eco* RI/ *Hind* III; *Hind* III / *Apa* I), havendo a seguir as ligações dos fragmentos no vetor pNPTS138.

FONTE: Rodrigues (2012).

A seguir, as culturas de *E. coli* DH5 α receberam os plasmídeos por eletroporação, adicionando-se também IPTG e X-Gal para proporcionar a seleção dos clones positivos. Foi realizada a extração de DNA plasmidial dos clones para identificar os positivos, e aqueles contendo os fragmentos 2 de *bfr* e 1 de *dps* foram digeridos com o par de enzimas adequado (*bfr*: *Bam* HI / *Hind* III e *dps*: *Eco* RI / *Hind* III). Os fragmentos foram ligados ao vetor pNPTS138 contendo os primeiros insertos já clonados (previamente digerido com o mesmo par de enzimas). A fim de confirmar a clonagem, digestões com enzimas de restrição revelaram a presença dos insertos no vetor.

Após a ligação das regiões flanqueadoras dos genes no pNPTS138, os plasmídeos foram inseridos por eletroporação em *E. coli* DH5 α . As colônias resultantes foram cultivadas em 2xTY contendo canamicina, e o DNA plasmidial foi extraído. As preparações foram utilizadas na eletroporação de *E. coli* S17-1, que por sua vez foi utilizada na conjugação com *C. crescentus* para a mobilização do plasmídeo contendo os fragmentos.

As culturas da linhagem *E. coli* S17-1 carregando o pNPTS138 Δbfr e o pNPTS138 Δdps com a linhagem NA1000 de *Caulobacter crescentus* foram semeadas em placas PYE contendo 5 μ g/ml de canamicina e 20 μ g/ml de ácido nalidíxico, a fim de evitar o crescimento de *E. coli* e permitindo apenas o desenvolvimento das linhagens de *Caulobacter* contendo o plasmídeo integrado ao genoma. Posteriormente, colônias advindas destas placas foram incubadas a 30 °C sob agitação em PYE sem adição de antibióticos por 48 horas, para favorecer o segundo evento de recombinação homóloga, onde há a saída do plasmídeo da célula juntamente com uma cópia do gene alvo. Estas culturas foram, então, semeadas em placas contendo 3 % de sacarose, que é convertida em um metabólito tóxico pelo produto do gene *sacB* presente no pNPTS138. Sendo assim,

apenas linhagens que perderam o plasmídeo são capazes de sobreviver neste meio de cultura, permitindo a seleção das células que sofreram a segunda recombinação.

A primeira e segunda recombinações resultantes do processo de obtenção dos mutantes das ferritinas nas linhagens *C. crescentus* NA1000 foram detectadas através de PCR, utilizando-se 0,5 µL de DNA genômico, 50 pmol de cada oligonucleotídeo (*bfr* del1-4 e *dps* del1-4), 12,5 µl PCR Master Mix 2x (Promega) que possui Taq DNA polimerase 50 U/ml, 0,2 mM de uma mistura de dNTPs (Invitrogen) e 3mM de MgCl₂. As condições do PCR foram de 94 °C por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 54 °C por 1 minuto e 72 °C por 2,5 minutos, e então foi mantida a 4 °C. Em seguida, as reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão de corrida TBE.

Um mutante nulo para os genes *bfr* e *dps* simultaneamente (mutante duplo) foi obtido pelo mesmo procedimento, partindo-se do vetor pNPTS138 contendo os dois fragmentos de *bfr* e movendo por conjugação para a *C. crescentus* NA1000 já mutada para o gene *dps*. A seleção e confirmação das 1ª e 2ª recombinações deram-se de maneira similar aos mutantes simples.

3.12 Obtenção das linhagens complementadas

As regiões do genoma contendo os genes CC3262 e CC2873, incluindo as suas regiões promotoras, foram amplificadas por PCR, clonadas no vetor pGEM-T Easy e subclonadas no vetor pMR20 separadamente (Figura 12). Para confirmação das clonagens, digestões com enzimas de restrição específicas revelaram a presença dos insertos no vetor. Os plasmídeos foram inseridos por eletroporação em *E. coli* DH5α. As colônias resultantes foram cultivadas em 2xTY contendo tetraciclina, e o DNA plasmidial foi

extraído e digerido para confirmação dos clones positivos. As preparações dos clones positivos foram utilizadas na eletroporação de *E. coli* S17-1, que por sua vez foi utilizada na conjugação com *C. crescentus* para a mobilização do plasmídeo contendo os fragmentos.

Figura 12 - Estratégia de construção dos vetores pMR20**bfr^c** (a) e pMR20**dps^c** (b).

As regiões do genoma contendo os genes das ferritinas e suas regiões promotoras foram amplificadas por PCR e clonadas no vetor pGEM-T Easy. A seguir, foram realizadas as subclonagens necessárias até a ligação do fragmento de interesse no vetor pMR20.

FONTE: Rodrigues (2012).

3.13 Análise dos fenótipos dos mutantes

Visando verificar a sensibilidade dos mutantes a peróxido de hidrogênio, foi realizado um experimento de inibição de crescimento por H₂O₂ em placa, também conhecido como 'Ensaio do Halo de Inibição'. Em placas PYE foram espalhados os mesmos volumes de culturas de *C. crescentus* NA1000 e dos mutantes das ferritinas; após a secagem das mesmas, um filtro de papel 3MM 6 mm cortado em círculo de 1 cm de diâmetro foi posicionado no centro da placa, adicionando-se 10 µl de peróxido de hidrogênio 3 %, e comparando-se a inibição no crescimento das culturas ao redor deste halo.

Foram também analisadas as curvas de crescimento das linhagens em estudo. As linhagens foram cultivadas por 18 horas em meio PYE e parte das culturas foi utilizada como pré-inóculos (DO₆₀₀ nm = 0,05) em PYE, PYE contendo 100 µM de FeSO₄ ou PYE contendo 100 µM de 2,2-dipiridil. A adição dos estresses se deu após 4h da diluição. O crescimento das culturas foi acompanhado pela leitura da absorbância a 600 nm a cada três horas.

3.13.1 Medição da quantidade celular de ferro

As linhagens de *Caulobacter* NA1000, Δbfr , Δdps e $\Delta bfr \Delta dps$ foram cultivadas por 16 horas em meio PYE, diluídas para DO=0,1 e incubadas a 30 °C por 24 horas. Em seguida, as células foram centrifugadas por aproximadamente 20 minutos a 10.000 rpm, lavadas uma vez com 30 mL de dipiridil 1 mM e uma vez em 15 mL de H₂O MilliQ. Os precipitados foram congelados a -20 °C. A seguir, as amostras foram encaminhadas para a Central

Analítica do Instituto de Química da USP para quantificar o conteúdo de ferro por meio da análise elementar ICP-AES (*Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy*).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados estão descritos em três partes, sendo a primeira referente à análise do padrão de expressão dos genes em estudo, a segunda referente à construção e obtenção dos mutantes, e a terceira tratando da análise de seus fenótipos.

4.1 Análises de Expressão Gênica

Fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases a montante dos inícios de tradução dos genes CC2873 (*dps*), CC3262 (*bff*), anotados no banco de dados do GeneBank de *Caulobacter crescentus*, foram amplificados por PCR e clonados no vetor pRK/*lacZ*290. Esta clonagem gerou fusões de transcrição que foram utilizadas para determinar o padrão de expressão em diversas linhagens. Também foi realizada análise semelhante para a quantificação da expressão do possível *sRNA1*.

Primeiramente, foram delineadas as regiões de promotores a serem analisadas, tomando-se como base o início de transcrição já determinado para estes genes no genoma de *Caulobacter* (MCGRATH et al., 2007). Esquemas das sequências de cada região promotora encontram-se a seguir (Figuras 13, 14 e 15).

Figura 13 - Esquema da região promotora do gene *bfr* de *C. crescentus* (5' → 3').

```

CTGCCAGGCCCAATGCGCCAAGTGCGTGTGCGAGATGCGTCAGATG
ATCCAGGAAAGCCGC GAAGCGCTGGCTTACGCCGCCGAATAACCCC
CCGTCGGGCCACGATTTTCGCGACCGAGACGCGTTCTCGCGGAATTC
CGTGAGACCGCGAAACACTTGCACACATTTCAGG TTGAACGCTGTTTC
GGCTT GCCCCACGGTTCGCCGCC AGTACGAATCCTCGACGCCTAAGG
AGGCCGCCATGCAGGGCGATCCCA GCATCATCCGACTGCTCAACGC
GGTGCTCACCAACGAGCTGACGGCGGTCAACCAGTACTTCCTGCAT
  
```

O início de transcrição foi denominado posição +1, e encontra-se marcado em amarelo. As sequências preditas como -35/-10 apresentam-se demarcadas em azul e rosa, respectivamente. Em negrito está ressaltado o códon de iniciação da tradução. As marcações verdes indicam as posições dos oligonucleotídeos 'bfr fw lac' e 'bfr rev lac', utilizados para amplificar fragmentos a serem clonados no vetor pRK/*lacZ*290.

FONTE: Rodrigues (2012).

Figura 14 - Esquema da região promotora do gene *dps* de *C. crescentus* (5' → 3').

```

CGAGCGTGGGGATCATCCCCAGCGCCATCCGGCATAGAGCGTCAC
CAGCATGATGGCGGGGAAAAGGGCTGGGTCGCCCGACGCCGCTG
CTCAGGCCCAGCAGGCCGACGCGCATCAGGATGGCCATGGCCACGC
CGATGATCGACGCGATCGCGCACAGCCACGCTGGCGGTGGAACCGG
AGGGATGAGCCAGGCGCTAATCAGCGCGTGGATACGTCCTTGGTCG
TCAAAGGCGCGGATCGAGTTGTCTTTCTTCTCCATCCCCGCTCCCGG
CAAAGATGTCTTGCCAAGAGGATGGACACGCTTACCTAAGACGCGC
AACACGGGAGATCATGATGGCCGCCGCTTTGAACACCGGGGCTGACT
GCGAAACAGCGCACCGATATCGCCGCTTCGCTCAACAAGGTGCTCG

```

O início de transcrição foi denominado posição +1, e encontra-se marcado em amarelo. As sequências preditas como -35/-10 apresentam-se demarcadas em azul e rosa, respectivamente. Em negrito está ressaltado o códon de iniciação da tradução. As marcações verdes indicam as posições dos oligonucleotídeos 'dps fw lac' e 'dps rev lac', utilizados para amplificar fragmentos a serem clonados no vetor pRK/*lacZ*290.

FONTE: Rodrigues (2012).

Figura 15 - Esquema da região promotora do possível sRNA1 de *C. crescentus* (5' → 3').

O início de transcrição do gene CC0682 foi denominado posição +1, e encontra-se marcado em amarelo. As sequências preditas como -35/-10 apresentam-se demarcadas em azul e rosa, respectivamente. As caixas representam os prováveis sítios de ligação de Fur (Fur box). Em negrito está ressaltado o códon de iniciação da tradução. As marcações verdes indicam as posições dos oligonucleotídeos 'sRNA1 fw lac' e 'sRNA1 rev lac', utilizados para amplificar fragmentos a serem clonados no vetor pRK/lacZ290.

FONTE: Rodrigues (2012).

Os fragmentos em estudo foram retirados do vetor pGEM-T Easy e ligados ao pRK/*lacZ*290 (Figura 16). Confirmadas as clonagens por sequenciamento de DNA, as construções corretas foram inseridas em *E. coli* S17-1 para conjugação com as linhagens *C. crescentus* NA1000 e mutantes.

Figura 16 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR isolados a serem clonados no vetor pRK/*lacZ*290.

M indica o marcador de peso molecular; 1 indica a região promotora de *bfr*, oligonucleotídeos utilizados: *bfr* fw *lac* / *bfr* rev *lac*; 2 indica a região promotora de *dps*, oligonucleotídeos utilizados: *dps* fw *lac* / *dps* rev *lac*; 3 indica a região promotora do possível *sRNA1*, oligonucleotídeos utilizados: *sRNA1* fw *lac* / *sRNA1* rev *lac*. As setas indicam o tamanho de cada banda, em pares de bases.

FONTE: Rodrigues (2012).

4.1.1 Ensaios em diferentes linhagens e concentrações de ferro

No ensaio de atividade de β -galactosidase, o padrão de expressão do gene em estudo é determinado através do padrão de expressão do gene *lacZ*, que reflete a transcrição do gene *lacZ* pelo promotor clonado à sua frente.

Num controle negativo, o vetor pRK/*lacZ*290 vazio (sem região promotora associada) apresenta, geralmente, cerca de 150 a 300 Unidades Miller, conforme verificado na Figura 17. Como é possível observar nas figuras seguintes, as unidades de atividade de β -

galactosidase observadas nos promotores em estudo diferem dos valores em unidades apresentados pelo vetor pRK/*lacZ*290 vazio, tanto na condição sem estresse quanto após a adição de FeSO₄ ou DDP. Este resultado indica que as regiões clonadas no vetor se tratam de regiões promotoras reais, tendo sido as clonagens das regiões promotoras efetuadas com sucesso.

Figura 17 – Ensaio de atividade de β -galactosidase com o vetor pRK/*lacZ*290 vazio.

Culturas de fase exponencial de NA1000 carregando o plasmídeo pRK/*lacZ*290, em meio PYE a 30 °C e utilizadas em ensaio de atividade de β -galactosidase após indução em excesso (Fe) e carência (DDP) de ferro. Foram medidas as unidades 2 horas após a aplicação do estresse. As barras pretas indicam o desvio padrão.

FONTE: Rodrigues (2012).

No decorrer das análises de expressão dos genes das ferritinas, foram utilizadas diversas linhagens sabidamente ou supostamente envolvidas no mecanismo de resposta a estresse oxidativo, tentando-se assim identificar quais seriam os participantes na regulação gênica das proteínas estocadoras de ferro em *Caulobacter crescentus*.

A Figura 18, subdividida por cada linhagem avaliada, mostra os ensaios de atividade de β -galactosidase realizados para o promotor de *bfr* (linhagens continham a fusão *Pbfr/lacZ*) em fase logarítmica. Os ensaios de β -galactosidase foram realizados em

condições sem estresse, ou em excesso de ferro (pela adição de FeSO_4 100 μM), ou em carência de ferro (pela adição de DDP 100 μM).

Figura 18 - Ensaios de expressão do gene *bfr*.

Culturas de fase exponencial das linhagens carregando o plasmídeo pRK/*acZ*290 contendo o promotor do gene *bfr* foram incubadas em meio PYE a 30°C. A expressão foi medida por meio de ensaio de atividade de β -galactosidase após indução em

excesso (Fe) e carência (DDP) de ferro. Foram medidas as unidades 2 horas após a aplicação do estresse. As barras pretas indicam o desvio padrão. Em todas as figuras, o padrão de imagens seguido é: Pbfr – PYE, Pbfr – PYE + Fe, Pbfr – PYE + DDP.

FONTE: Rodrigues (2012).

A fusão do gene *lacZ* com o promotor de *bfr* demonstrou ser consideravelmente induzida na presença de FeSO₄ adicionado ao meio, cerca de 2,5 vezes na linhagem selvagem, em comparação com o meio sem adição de ferro. Esta indução em excesso de ferro é compatível com a expressão de um gene relacionado à estocagem de ferro intracelular, havendo a necessidade de produção de Bfr nessas condições. Não foi observada nenhuma alteração na expressão de *bfr* na presença do agente quelante dipiridil, mostrando que o gene não é induzido em situação de carência de ferro.

Nos ensaios realizados na linhagem Δfur foi observada uma redução de cerca de 50% da expressão do gene em comparação ao controle, e não foi verificada indução em presença de ferro nesta linhagem mutada. Como na maioria das bactérias, Fur é um regulador global que controla a homeostase de ferro, e outros processos celulares em *Caulobacter*, como a defesa a estresse oxidativo (SILVA NETO et al., 2009). Foi demonstrado por este autor que Fur funciona diretamente como um ativador e um repressor, integrando respostas ao metabolismo de ferro e estresse oxidativo em *Caulobacter crescentus*. Entretanto, como não há uma Fur *box* predita para este promotor, seu efeito é provavelmente indireto.

As proteínas BfrA e BfrB de *Neisseria gonorrhoeae* estão envolvidas em estocagem de ferro, além de atuarem também na proteção a estresse oxidativo, reguladas pelo fator OxyR (SEIB et al., 2007). Nesta bactéria, o provável mecanismo regulatório dos genes das bacterioferritinas envolve Fur, pois foi identificada uma sequência de ligação de Fur em

bfrA (CHEN; MORSE, 1999). Em estudo mais recente, Jackson e colaboradores (2009) sugerem que em *N. gonorrhoeae* também possa haver regulação das bacterioferritinas por meio de um pequeno RNA regulatório similar à RyhB, porém, ainda não estão publicados estudos que detalhem e confirmem essa hipótese. Chen et al. (2010) mostraram na bactéria *Pseudomonas*, que possui duas bacterioferritinas, que os níveis de expressão máximos de *bfrA* e *bfrB* também são obtidos em meio rico em ferro. Os promotores dos genes *bfrA* e *bfrB* também são positivamente regulados por Fur.

Em *E. coli* foi demonstrado que diversos genes codificantes para proteínas envolvidas no metabolismo do ferro, dentre eles a ferritina *ftnA*, são positivamente regulados por Fur via o pequeno RNA regulatório RyhB (MASSÉ; GOTTESMAN, 2002). O controle da expressão gênica de *ftnA* e *bfr* em *E. chrysanthemi* é similar à regulação que ocorre em *E. coli*. O ferro é um sinal desencadeante para a transcrição de *ftnA* e esse controle envolve Fur e um pequeno RNA (BOUGHAMMOURA et al., 2008).

Padrão similar também foi observado em *Salmonella* (VELAYUDHAN et al., 2007), tendo sido quantificada no estudo a expressão dos mRNAs das ferritinas por ensaios de RT-PCR em linhagem selvagem e no mutante *fur* (em fase estacionária inicial em excesso e carência de ferro). Neste estudo, verificou-se que os níveis de mRNA de *bfr* na linhagem selvagem são 4 vezes maiores do que no mutante *fur*, em excesso de ferro, e não houve indução gênica em presença de dipiridil, tendo a expressão de *bfr* atingido valores similares nas linhagens selvagem e Δfur . Na situação de restrição de ferro, há regulação negativa da síntese de proteínas que contem ferro, incluindo as ferritinas. Em limitação de ferro (quando consequentemente Fur está inativo), os níveis de expressão de *bfr* são equivalentes nas linhagens selvagem e mutante *fur* (VELAYUDHAN et al., 2007).

Resposta semelhante à indução por ferro nas linhagens NA1000 e Δfur contendo promotores de outros genes, tais como *nuoA* e *sdhCDAB*, foram demonstrados por Silva Neto et al. (2009). Os ensaios realizados pelo autor foram similares aos apresentados aqui, tendo sido obtidos resultados também condizentes com expressão de genes sensíveis a elevação da concentração de ferro e que sofrem desrepressão de sua regulação na linhagem mutada para *fur*. Porém, uma diferença fundamental entre os genes estudados pelo referido autor em comparação com os genes aqui em estudo trata-se da ausência da 'Fur box' nas regiões regulatórias das ferritinas em *C. crescentus*, propondo-se assim a regulação indireta de Fur a esses genes do metabolismo de ferro.

Portanto, por termos visto em *Caulobacter* a redução na expressão de *bfr* na linhagem Δfur , em comparação às linhagens onde *fur* se mantinha expresso, sugere-se que este gene apresente função regulatória sobre o gene da bacterioferritina. Como já mencionado, o controle pós-transcricional da homeostase de ferro pode ser mediado por um pequeno RNA similar a RyhB de *E. coli*. Neste caso, este atuaria promovendo a degradação de RNA mensageiros-alvo, como o da ferritina Bfr. A ausência de Fur poderia levar à ativação de um pequeno RNA, que deve atuar regulando negativamente *bfr* e, por conseguinte, diminuindo a expressão do mesmo. Assim, pelos resultados apresentados na análise da expressão de *bfr*, foi demonstrado que este é positivamente regulado por Fur, provavelmente através de mecanismos pós-transcricional, em suficiência de ferro.

Os estudos realizados com o promotor de um transcrito contendo um suposto pequeno RNA equivalente a RyhB (chamado aqui sRNA 1) em *Caulobacter* visaram gerar resultados que pudessem corroborar essa hipótese. Inicialmente verificou-se se a expressão do operon codificando os dois possíveis sRNAs era alterada na presença ou ausência de ferro. Os resultados mostraram que a expressão é menor na presença de

ferro e aumenta na presença de dipiridil (Figura 19). Porém, nos ensaios na linhagem mutantes Δfur , os resultados obtidos não foram conclusivos, por ter desvio experimental muito grande (Figura 19). Devido a isso, ainda não se pode afirmar com certeza se estes sRNAs putativos são regulados por Fur. Entretanto, resultados obtidos em trabalho paralelo pelo Dr. José F. Silva Neto mostraram que a expressão deste transcrito é menor na linhagem Δfur , sugerindo que este fator seja necessário para a ativação deste operon.

Figura 19 - Ensaios de expressão do transcrito contendo o possível sRNA.

Culturas de fase exponencial de NA1000 e Δfur carregando o plasmídeo pRK/*lacZ*290, contendo o promotor do pequeno RNA, em meio PYE a 30 °C e utilizadas em ensaio de atividade de β -galactosidase após indução em excesso (Fe) e carência (DDP) de ferro. Foram medidas as unidades 2 horas após a aplicação do estresse. As barras pretas indicam o desvio padrão.

FONTE: Rodrigues (2012).

A seguir, verificamos se a expressão de *bfr* era afetada nas linhagens mutantes onde os sRNAs 1 e 2 e o gene CC0682 foram deletados, respectivamente. Na linhagem $\Delta mhip$ verificou-se uma pequena queda de expressão gênica na situação de excesso de ferro, mas os níveis de expressão das demais condições mantiveram-se próximos aos níveis obtidos na linhagem selvagem. Já nas linhagens $\Delta sRNA1$ e $\Delta sRNA2$ verificou-se

pequena queda de expressão gênica em todas as condições avaliadas, o que sugere que a falta dessas regiões afeta de algum modo os níveis máximos de expressão atingidos pela bacterioferritina. Por outro lado, um estudo na bactéria *Pseudomonas*, que tem dois pequenos RNAs com a mesma funcionalidade de RyhB de *E. coli*, mostrou que estes não afetam a expressão de Bfr (CHEN et al., 2010).

Em *E. coli*, *fur* autorregula sua expressão em resposta aos níveis de ferro, mas é também controlado por OxyR. OxyR pertence à família LysR de fatores transcricionais, a mais abundante classe de reguladores transcricionais em bactérias (MONGKOLSUK; HELMANN, 2002). Na análise realizada com o $\Delta oxyR$ os níveis de expressão de *bfr* mantiveram-se próximos aos níveis obtidos na linhagem NA1000, levando-nos a acreditar que este fator não participa da regulação de Bfr, assim como observado por Seib et al. (2007) em *Neisseria*.

Outra forma de atuação de Fur é interferir em algumas cascatas regulatórias, como a subfamília de fatores sigma ECF especializada em escassez de ferro, que está sendo estudada em nosso laboratório por Heloise Balhesteros⁴, aluna de Doutorado. A maior parte dos fatores sigma ECF é requerida para resistência a condições de estresses específicos, que as bactérias podem encontrar no seu habitat natural, promovendo a regulação de um rol limitado de genes (ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2007). De fato, tanto em bactérias Gram positivas como em Gram negativas, existem fatores sigma auxiliares que atuam como importantes reguladores nas respostas a estresse.

O trabalho de Alvarez-Martinez et al. (2007) descreveu e caracterizou dois fatores sigmas, σ^T e σ^U , que não se mostraram essenciais em condições normais de crescimento, mas que em sua ausência houve decréscimo de habilidade de sobrevivência bacteriana

⁴ BALHESTEROS, H – Projeto de Doutorado.

em estresse oxidativo. Sigma T é o fator sigma ECF mais importante na resposta de *Caulobacter crescentus* a estresses gerais (LOURENÇO et al., 2011). No seu regulon estão presentes ao menos 41 genes, incluindo dois outros fatores sigma (*sigU* e *sigR*). Concluiu-se que SigU é positivamente regulado por *sigT* em condições normais de crescimento em PYE. A expressão de *sigU* é totalmente dependente de SigT, sendo que esses fatores sigma formam uma cascata regulatória, onde *sigT* regula vários genes, e *sigU* aparenta ter modesta contribuição na expressão de um rol de genes dependentes de σ^T (ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2007; LOURENÇO et al., 2011).

Nas análises de expressão de *bfr* envolvendo as linhagens mutantes para os fatores sigma ECF, desconsiderando-se o desvio experimental, obteve-se padrão em $\Delta sigT$ semelhante à expressão da linhagem selvagem, o que nos leva a crer que esse fator sigma não deve se relacionar a nenhum passo na regulação gênica da bacterioferritina (Figura 18). Já na linhagem $\Delta sigU$ observou-se um nível de expressão gênica inferior ao de NA1000, essencialmente em situação excesso de ferro, sendo possível que tal fator sigma esteja envolvido em algum passo na regulação de Bfr referente ao controle da homeostase desse metal.

Alvarez-Martinez et al. (2007) demonstraram a regulação de expressão gênica pelos dois fatores *sigT* e *sigU* em diversas condições de estresse. Os dados do trabalho sugerem que estes genes estão envolvidos na regulação de diversas respostas a estresse, controlando a expressão de uma grande quantidade de genes, sugerindo-se que SigT seja um importante regulador geral de resposta a estresses em *Caulobacter*. Lourenço et al. (2011) identificaram, pela técnica de microarranjos de DNA, outros genes que fazem parte do regulon de SigT, dentre eles *dps*, aqui objeto de estudo. Porém, não existem ainda estudos publicados quanto à participação desses fatores sigma na regulação de *bfr*.

Entretanto, os resultados deste trabalho indicam haver efeito positivo de *sigU* em relação à *bfr*, já que na ausência deste regulador a expressão diminui.

Adicionalmente, na linhagem $\Delta sigJ$ foi vista uma queda de expressão nas três condições testadas, que, desconsiderando-se os desvios, torna-se similar aos níveis observados para o mutante $\Delta sigU$. O grupo de estudos da professora Suely Gomes no IQ-USP vem também caracterizando esse fator sigma ECF, e os resultados de um ensaio de análise de microarranjos sugerem que Bfr faça parte do regulon de *sigJ* (Dra. Suely Gomes, comunicação pessoal). Confirmada essa informação, pode-se mais fortemente concluir que este fator sigma tenha participação na regulação de Bfr.

O trabalho de Velayudhan et al. (2007) mostrou que as ferritinas de *Salmonella* são diferencialmente reguladas. Nesta bactéria, *dps* é reprimido por Fur e induzido em condições de limitação de ferro, enquanto já visto que *bfr* é expressa ao máximo quando o ferro é abundante. Em *C. crescentus*, assim como para o promotor de *bfr*, foram realizados ensaios de expressão do gene *dps* nas mesmas linhagens mutantes, a fim de se tentar verificar o seu padrão regulatório.

Na sequência, a Figura 20, subdividida por cada linhagem avaliada, mostra os ensaios de atividade de β -galactosidase realizados para a fusão com o promotor de *dps* em fase logarítmica.

Figura 20 - Ensaios de expressão do gene *dps*.

Culturas de fase exponencial das linhagens carregando o plasmídeo pRK*lacZ*290 contendo o promotor do gene *dps* foram incubadas em meio PYE a 30°C. A expressão foi medida por meio de ensaio de atividade de β-galactosidase após indução em excesso (Fe) e carência (DDP) de ferro. Foram medidas as unidades 2 horas após a aplicação do estresse. As barras pretas indicam o desvio padrão. Em todas as figuras, o padrão de imagens seguido é: ■ Pdps – PYE, ■ Pdps – PYE + Fe, ■ Pdps – PYE + DDP.

FONTE: Rodrigues (2012).

Observa-se no ensaio realizado com a linhagem contendo o plasmídeo pRK/*lacZ290P dps* que houve indução gênica na carência de ferro em todas as linhagens analisadas. Nota-se que para a linhagem selvagem NA1000, apesar de os níveis observados na expressão gênica serem inferiores aos da expressão do gene da bacterioferritina, no ensaio com *dps* pode-se ver um aumento de cerca de 1,6 vezes nas Unidades Miller após acréscimo de DDP.

Estudos realizados por Ishikawa et al. (2003) demonstram que, na bactéria *Campylobacter jejuni*, nenhuma indução para o gene *dps* foi observada em crescimentos em meios ricos em ferro ou carentes do metal. Porém, a indução de *dps* em condições de escassez de ferro foi vista também em *Sulfolobus solfataricus* (WIEDENHEFT et al., 2005), *Synechococcus* sp. (SEN et al., 2000) e *Bacillus subtilis* (CHEN, L. et al., 1993).

Em *E. coli* a regulação da expressão de *dps* é complexa e parcialmente dependente do estado fisiológico da célula (CALHOUN; KWON, 2010), tendo esta proteína uma maior participação relacionada ao estresse oxidativo, do que um papel na estocagem de ferro. Além disso, Dps aparenta ter papel na resistência a diversos tipos estresses, atualmente em investigação. Dps foi identificada como uma ferritina parcialmente por causa da sua atividade de ferroxidase, ou, mais especificamente, sua capacidade de oxidar íons ferrosos ao estado férrico (NAIR; FINKEL, 2004). Apesar de poucos estudos terem sido conduzidos sobre a expressão de Dps em resposta a níveis de ferro, foi demonstrado que a expressão de Dps é dependente da fase de crescimento em que a célula se encontra, e que no crescimento exponencial *dps* é induzida por OxyR (CALHOUN; KWON, 2010; HALSEY et al., 2004).

Na linhagem mutada para o gene *fur* esperava-se haver desrepressão do gene da ferritina Dps, como os resultados observados em *Salmonella*, onde *dps* é negativamente

regulado por Fur em meio rico em ferro (VELAYUDHAN et al., 2007). Mas o que se obteve para essa linhagem foi um padrão similar à linhagem selvagem, concluindo-se que Fur não atua na regulação de *dps*, como o faz sobre a ferritina Bfr em *Caulobacter*.

Como já mencionado, a expressão de *dps* em *E. coli* foi demonstrada ser regulada por OxyR. *P. gingivalis* também possui um gene codificando a proteína Dps cuja expressão é aumentada de maneira dependente de OxyR (CHIANCONE et al., 2004). Aqui, porém, tanto para a linhagem $\Delta oxyR$, como para as linhagens $\Delta sRNA1$ e $\Delta mhip$, apesar dos desvios obtidos, pode-se inferir que não houve diferença significativa na expressão gênica em qualquer das condições testadas, o que nos leva a concluir que nenhum dos genes mutados nessas linhagens participa da regulação de *dps* em *C. crescentus*. Entretanto, a linhagem $\Delta sRNA2$ apresentou queda na expressão gênica, seja em PYE, excesso ou carência de ferro. Tal indício nos leva a crer que haja a participação do suposto pequeno RNA em algum passo da regulação gênica da ferritina, mas acreditamos que haja mais genes atuando nessa via regulatória.

Lourenço e colaboradores (2011) apresentaram um estudo em que, num ensaio de análise de microarranjos de DNA, foi sugerido que Dps faça parte do regulon de SigT. Os autores afirmam ainda que a falta de efeitos significativos da deleção de *sigU* na expressão gênica global pode ser mascarada pela funcionalidade de SigT. Assim, os resultados sugerem que estes fatores sigmas ECF têm papel importante na regulação de Dps. Portanto, nas linhagens mutantes para os fatores sigma ECF, esperar-se-ia uma competição entre os diversos fatores sigma em estudo pela cerne da RNA polimerase de *Caulobacter*. Na transcrição bacteriana, a subunidade sigma da RNA polimerase é importante para iniciar o processo transcricional, e os fatores sigma se ligam a sequências específicas do promotor. A RNA polimerase bacteriana tem cinco unidades fixas e a

unidade variável sigma, sendo que existem vários sigmas que devem competir pelo cerne onde se ligarão. Nessa competição, os fatores determinantes são a quantidade de fatores sigma presentes, e a quantidade de sigmas presentes dependerá das condições fisiológicas em que a célula se encontrar. Esse é um mecanismo importante em resposta a estresses, pois genes diferentes podem ser regulados por fatores sigma diversos (que reconheçam a região promotora específica), assim os genes serão transcritos diferencialmente dependendo da resposta fisiológica que a bactéria precisar ter.

Nos resultados dos experimentos das linhagens mutantes para os fatores sigma, carregando o plasmídeo contendo o promotor do gene *dps* em fusão com *lacZ*, observa-se padrões de expressão similares nas condições controle (PYE) e em excesso de ferro (apesar dos grandes desvios obtidos em alguns casos), mas em carência de ferro nota-se um aumento de expressão gênica de cerca de 1,3 vezes em $\Delta sigT$, comparando-se à expressão da linhagem selvagem. Isso vai contra o esperado, tendo-se como base o estudo já citado de Lourenço et al. (2011). Entretanto, ao analisar a metodologia empregada nos ensaios destes autores, verifica-se que as condições celulares diferem das aplicadas neste estudo das ferritinas. Em suas extrações de RNA, cujas amostras foram posteriormente usadas para o estudo, os pesquisadores utilizaram amostras celulares isoladas em fase de crescimento exponencial, expostas previamente a estresse por sacarose, e os seus resultados referem-se às linhagens expostas a essas condições. Assim, diferenças metodológicas podem interferir nas conclusões quanto à regulação do gene *dps*, não sendo possível, portanto, comparar os resultados deste trabalho com os obtidos no estudo citado.

Diferentemente, na linhagem $\Delta sigJ$, onde os níveis de expressão de *dps* alcançam valores mais baixos que a linhagem selvagem em carência de ferro. Isso mostra que na

falta de participação desse fator sigma há uma menor indução de expressão de *dps*, de maneira oposta a *sigT*. Conforme já mencionado, aguardamos a caracterização deste fator sigma em *Caulobacter*, para podermos concluir apropriadamente o papel de *sigJ* na regulação da ferritina Dps.

4.1.1.1 Ensaio em escala temporal

Fato inegável é que houve grande desvio na realização dos experimentos envolvendo *dps*, o que sugeria que a fase de crescimento poderia estar afetando a sua expressão. Visando verificar se esse era o caso, foi tentada uma estratégia diferente de obter os resultados, aumentando-se o número de ensaios em diferentes tempos no ensaio de atividade de β -galactosidase apenas na situação controle (PYE), para se verificar como a expressão gênica ocorre ao longo do tempo. O resultado está mostrado na Figura 21.

Figura 21 - Ensaios de expressão do gene *dps* em escala temporal.

Culturas de linhagens carregando o plasmídeo pRK/*acZ*290 contendo o promotor do gene *dps* foram incubadas em meio PYE a 30°C. A expressão foi medida por meio de ensaio de atividade de β-galactosidase em meio PYE. Foram medidas as Unidades Miller ao longo do crescimento das culturas.

FONTE: Rodrigues (2012).

A partir da leitura dos gráficos, pode ser observado na linhagem NA1000 um aumento suave na expressão gênica ao longo do crescimento da cultura. Uma curvatura com pontos parecidos ocorre em $\Delta oxyR$ e Δfur que apresentaram seu máximo de expressão no ponto de 9,5 horas, no qual as culturas apresentavam uma DO 1,0, em final de fase logarítmica de crescimento. Curvaturas parecidas também ocorrem em $\Delta sigT$ e $\Delta sigU$, mas com expressão máxima no tempo de 48 h (fase estacionária), possivelmente porque *dps* deve atuar na proteção da cultura contra os estresses oxidativos sendo gerados. Na linhagem $\Delta sigJ$ o perfil de expressão foi o mesmo, com máxima já a partir de 9h, mas os valores obtidos foram maiores.

Analisando-se esses resultados em conjunto com os resultados da figura anterior, pôde-se com o ensaio na escala temporal acompanhar quantitativamente a expressão de *dps* ao longo do tempo. Especialmente em crescimento exponencial, comparando-se as demais linhagens à linhagem NA1000, a expressão de *dps* em todas as linhagens aumenta. Nessa fase de crescimento, os níveis de expressão de *dps* nas linhagens Δfur , $\Delta oxyR$ e $\Delta sigJ$ parecem haver aumentado mais consideravelmente. O metabolismo celular, durante o crescimento aeróbio, vai naturalmente gerando ROS, e Dps pode estar tendo a sua expressão aumentada para ajudar a suprir as repostas a este estresse aumentado nas linhagens mutantes. O mesmo ocorre, mas em menor intensidade, na linhagem mutante para o regulador *oxyR*, este também importante no controle do estresse oxidativo bacteriano (ITALIANI et al., 2011). Assim, fica a hipótese de que o papel de Dps seja mais abrangente do que uma proteína de estocagem de ferro, assumindo, talvez, papel importante como auxiliar na defesa a estresse oxidativo em *Caulobacter crescentus*.

4.1.1.2 Ensaio em diferentes fases de crescimento

A observação dos resultados acima motivou a avaliar o que ocorre com a expressão de ambas as ferritinas ao longo das fases de crescimento da cultura (Figura 22).

Em bactérias, a fase estacionária é um dos melhores exemplos de regulação global de genes, onde vários fatores regulatórios se mobilizam para definir novos padrões de expressão gênica (NYSTRÖM, 2004). Para garantir a sobrevivência sob condições de mudanças, as bactérias desenvolveram cascatas de sinalização para regular a expressão de um grupo diferente de genes, adequando-se a nova situação (CASES; DE LORENZO; OUZOUNIS, 2003.) Em *E. coli*, sabe-se que os reguladores de resposta a estresse oxidativo OxyR e SoxRS trabalham em conjunto com o fator sigma RpoS na expressão de genes específicos de estresses (NYSTRÖM, 2004).

Na fase estacionária, inclusive, sugere-se que a proteína Dps proteja não apenas do estresse oxidativo, mas também de irradiações UV e gama, toxicidade por ferro e cobre, estresse térmico e choques ácido e básico (NAIR; FINKEL, 2004), reconhecendo-se assim a sua importância nesta fase de crescimento. Dps, importante frisar, significa "DNA protecting under stationary phase", cuja tradução livre seria aquela que protege DNA em fase estacionária. Assim, foram efetuados experimentos em fase exponencial e nos pontos de 24 h e 48 h (fase estacionária), sendo os resultados apresentados na Figura 18, subdividida por cada linhagem avaliada.

Para o promotor de *bfr* não é notada resposta de expressão diferencial de acordo com a fase de crescimento bacteriano na linhagem selvagem NA1000. Porém, foi estudado em *Erwinia* que a expressão de *bfr* é induzida no crescimento em fase estacionária, sendo que um fator sigma, SigS, regula este mecanismo (BOUGHAMMOURA et al., 2008). Abdul-

Tehrani et al. (1999) demonstraram estudos de fusão com *lacZ* em que *bfr* é fortemente expresso em fase pós-exponencial em *E. coli*. Nesta bactéria, o principal regulador de fase estacionária é também o fator sigma RpoS, responsável por induzir diversos genes importantes nessa fase de crescimento. Na fase estacionária, as células de *E. coli* se tornam mais resistente a uma série de estresses ambientais, como, por exemplo, choque de calor, estresse oxidativo, condições de pH ácido e variações osmóticas (NYSTRÖM, 2004).

C. crescentus não possui homólogo a *rpoS* no seu genoma, sugerindo que a regulação de genes de fase estacionária seja por um mecanismo diferente. Alternativa para a ausência deste fator sigma são os fatores sigma ECF, sendo que alguns destes já foram caracterizados em resposta a estresses em *Caulobacter*. SigE está envolvido na resposta a cádmio, hidróperóxido orgânico, oxigênio singlete e UV (LOURENÇO, GOMES, 2009). SigF está associado à resposta a estresse oxidativo na fase estacionária (ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2006) e SigT responde a estresses gerais, e especialmente oxidativo e osmótico (ALVAREZ-MARTINEZ et. al., 2007).

Figura 22 - Ensaios de expressão dos genes *bfr* e *dps* em diferentes fases de crescimento.

Culturas das linhagens carregando o plasmídeo pRK/*lacZ*290 contendo o promotor dos genes *bfr* (acima do pontilhado) e *dps* (abaixo do pontilhado) foram incubadas em meio PYE a 30°C. A expressão foi medida por meio de ensaio de atividade de β-galactosidase em fase log, em 24h e 48h de crescimento. As barras pretas indicam o desvio padrão. Em todas as figuras, o padrão de imagens seguido é: ■ linhagem + promotor – log, ■ linhagem + promotor – 24 h, ■ linhagem + promotor – 48 h.

FONTE: Rodrigues (2012).

Para as linhagens mutantes portadoras de plasmídeo carregando o gene *bfr*, notam-se diferenças de expressão gênica entre as fases de crescimento nas linhagens $\Delta oxyR$ e $\Delta sigJ$. Nesta última linhagem, observa-se um aumento considerável nos níveis de expressão gênica ao longo do tempo tendo no ponto de 48 h cerca de 2,5 vezes de aumento na expressão de *bfr* em relação à fase exponencial. Tal padrão também é observado para a expressão do promotor do gene *dps*, mas em menor intensidade. O trabalho sobre o mutante $\Delta sigJ$ deve esclarecer se tal gene possui importância na proteção a estresses da bactéria durante as fases de crescimento. Mas sabe-se que fatores sigmas não atuam como repressores, então, essa repressão deve ocorrer por meio de algum outro repressor, regulado por SigJ. Outra hipótese seria a de SigJ competir com um fator sigma importante para a ativação das ferritinas; portanto, na ausência de SigJ em fase estacionária, este fator sigma putativo seria favorecido na competição pelo sítio da RNA polimerase, aumentando assim a expressão das ferritinas.

Analisando-se a expressão de *dps*, na linhagem selvagem NA1000 observa-se um ligeiro aumento na expressão da fase exponencial para a fase estacionária. Em *E. coli* sabe-se que Dps é a proteína mais abundante em fase estacionária e ela foi reconhecida por proteger a célula de estresse oxidativo durante crescimento em fase exponencial (NAIR; FINKEL, 2004). Ainda em *E. coli*, sabe-se que *dps* é induzido em fase estacionária de maneira dependente de RpoS; embora OxyR seja seu ativador transcricional em fase logarítmica, em células de fase estacionária não apresenta papel regulatório.

Bacillus possui duas proteínas Dps, e os genes de ambas são expressos durante a fase de crescimento exponencial e na transição para a estacionária. Há indução por estresse oxidativo e esta indução é dependente do fator sigma B no crescimento

exponencial (THEIL, 2007). Em *Caulobacter*, por sua vez, *sigF* e *sigJ* devem ter o papel principal nessa regulação das fases de crescimento.

4.1.1.3 Ensaio em presença de H₂O₂

Um estudo no nosso grupo de pesquisa levou a verificação de que *katG* em *C. crescentus* é ativado na presença de peróxido de hidrogênio de maneira dependente de OxyR (ITALIANI et al., 2011). O nosso grupo também observou que a linhagem Δfur mostrou-se sensível a peróxido de hidrogênio, mas o gene *fur* não foi induzido na presença de H₂O₂ (SILVA NETO et al., 2009).

Assim, para a fusão *Pdps/lacZ* outra estratégia adotada foi verificar se ocorre alteração na expressão gênica em presença de peróxido de hidrogênio. Essa iniciativa também foi adotada em decorrência do observado por diversos autores sobre uma maior susceptibilidade da linhagem Δdps de *E. coli* a danos por H₂O₂. Os experimentos foram realizados utilizando-se duas concentrações de H₂O₂ (30 μ M e 1 mM), com determinação das unidades em 20 minutos e 40 minutos (Figura 23).

Figura 23 - Ensaio de expressão do gene *dps* na presença de H₂O₂.

Culturas de NA1000 carregando o plasmídeo pRK/*lacZ*290P*dps* em meio PYE a 30°C foram utilizadas em ensaio de atividade de β-galactosidase após acréscimo de peróxido de hidrogênio em duas concentrações (30 μM e 1 mM). Foram medidas as unidades 20 minutos e 40 minutos após a aplicação do estresse. As barras indicam o desvio padrão.

FONTE: Rodrigues (2012).

Apesar de parecer ter havido ligeira indução na expressão de *dps* com a adição de 1mM de peróxido de hidrogênio, esses resultados não se mostraram conclusivos para mostrar alguma alteração significativa na expressão gênica após a adição de H₂O₂. Entretanto, estão sendo feitas tentativas no laboratório de se aperfeiçoar concentrações e tempos para esse tipo de ensaio em *Caulobacter*.

O trabalho de Chiancone et al. (2004) ressalta a importância das proteínas Dps nas propriedades de destoxificação de peróxido de hidrogênio, pois Dps consideravelmente atenua a ação de radicais hidroxila, ligando-se a ferro e minimizando a formação de OH[•], evitando assim que estes participem das danosas reações de Fenton (VELAYUDHAN et al., 2007).

Calhoun e Kwon (2010) concluíram para *E. coli* que, em resposta à exposição a peróxido de hidrogênio no crescimento exponencial, a transcrição de *dps* é induzida por OxyR, que ativa a transcrição pela σ⁷⁰-RNA polimerase. Ainda em *E. coli* sabe-se que o gene *fur* possui promotor induzido por OxyR em resposta a estresse por H₂O₂ (ANDREWS

et al., 2003). Nessa bactéria o sistema OxyR detecta o peróxido de hidrogênio e tenta corrigir a homeostase férrica da bactéria aumentando a produção da proteína Fur, com intuito de que o sistema de importação de ferro seja reprimido (VARGHESE et al., 2007). De fato, o estudo de Zheng et al. (2001) confirmou que o regulador OxyR ativa a maior parte dos genes induzíveis por peróxido de hidrogênio em *E. coli* (sendo *dps* confirmado como o gene mais fortemente induzido na linhagem selvagem em resposta a peróxido de hidrogênio), e OxyR também foi inicialmente identificado como um regulador chave na resposta adaptativa a estresse causado por peróxido de hidrogênio em *Salmonella enterica* serovar Typhimurium.

Em *E. coli*, há muito se sabe da existência de um pequeno RNA denominado *oxyS* no regulon de OxyR (GONZÁLEZ-FLECHA; DEMPLE, 1999). Este sRNA tem papel na regulação intracelular de peróxido de hidrogênio. *oxyS* regula o metabolismo oxidativo por meio das catalases-peroxidases, responsáveis pela remoção de H_2O_2 gerador de estresse oxidativo. Como já dito, as catalases-peroxidases de *C. crescentus* foram investigadas pelo nosso grupo de pesquisa, tendo Italiani e colaboradores (2011) mostrado que sua regulação é dependente de OxyR, e independente de Fur (que nesta bactéria também apresenta papel de controle de estresse oxidativo). No mesmo estudo foram preditas sequências de ligação de OxyR, e estas não foram encontradas nos promotores das ferritinas em estudo. Assim, talvez exista em *Caulobacter* uma regulação indireta de OxyR, com a participação de um pequeno RNA regulatório similar à *oxyS*, responsável por resposta a estresse gerado por peróxido de hidrogênio.

Além de seu papel na homeostase de ferro, outro papel desempenhado por *dps*, também importante na defesa a estresses, é a capacidade de essa ferritina se ligar a outras proteínas ligantes de DNA. Chodavarapu e colaboradores (2008) caracterizaram em

E. coli uma interação direta entre Dps e DnaA, um fator de iniciação de replicação que promove a separação ou desnaturação do DNA na origem da replicação (*oriC*). Como resultado dessa interação, Dps impede que DnaA se ligue as fitas de DNA, o que impedirá a separação das cadeias (executada por uma DnaB helicase) na região de origem de replicação, e consequentemente bloqueando parcialmente o processo replicativo. Isso pode resultar numa excelente oportunidade para o sistema de reparo de DNA corrigir moléculas de DNA que sofreram danos em condições de estresse, aumentando assim a sobrevivência bacteriana (CHIANCONE; CECI, 2010).

4.2 Construção e obtenção de mutantes nulos

A obtenção de linhagens mutantes cujos genes foram deletados, em *Caulobacter crescentus* assim como em outras bactérias, pode ser realizada através de dupla recombinação. Comumente um vetor utilizado para esta estratégia é o pNPTS138, que confere resistência à canamicina e não é replicativo nesta bactéria, além de possuir um gene *sacB*, útil como ferramenta de contra-seleção.

No processo de obtenção de mutantes nulos, os dois fragmentos flanqueadores ao gene que se quer remover são inseridos no vetor de forma seguida (ou intercalados por uma marca de resistência). O primeiro evento de recombinação acontece entre o cromossomo da bactéria receptora e um dos flanqueadores; o segundo evento envolve o segundo flanqueador. Após a primeira recombinação duas resoluções são possíveis, sendo uma delas a restauração do plasmídeo como foi inserido, independente do cromossomo, e a outra a saída do plasmídeo carregando a cópia selvagem do gene (ou ainda deixando em seu lugar uma marca de resistência, quando for o caso).

4.2.1 *Mutantes simples*

Fragmentos de aproximadamente 800 pb das regiões que flanqueiam os genes das ferritinas, do sRNA1 e do gene CC0682 foram amplificados por PCR (Figura 24). Segui com a obtenção dos mutantes das ferritinas e o estudo do operon do pequeno RNA foi executado pelo Dr. José Freire da Silva Neto. As construções foram clonadas primeiramente no vetor pGEM-T Easy, sendo posteriormente digeridas com suas respectivas enzimas de restrição e ligadas ao vetor pNPTS138. Estas construções foram confirmadas pelas digestões com as enzimas de restrição com sítios nas extremidades dos fragmentos, a fim de confirmar suas incorporações ao vetor de clonagem (Figuras 25 e 26).

Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR a serem clonados no vetor pGEM-T Easy.

M indica o marcador de peso molecular; 1 – bfrdel12; 2 – bfrdel34; 3 – dpsdel12; 4 – dpsdel34; 5 – sRNA1del12; 6 – sRNA1del34; 7 – mhipdel12; 8 – mhipdel34. As indicações referem-se aos tamanhos das bandas do marcador, em pares de bases.

*mhip se refere à região flanqueadora de CC0682.

FONTE: Rodrigues (2012).

Figura 25 - Eletroforese em gel de agarose de confirmação da ligação dos dois fragmentos flanqueadores do gene *bfr* ao vetor pNPTS138.

Foi realizada digestão com o par de enzimas *Apa* I / *Bam* HI. O fragmento 1 possui 673 pb. O fragmento 2 possui 807 pb, mas um sítio interno para *Apa* I o divide em fragmentos de 377 pb e 430 pb. Assim, são visualizadas no gel bandas de aproximadamente 5,3 Kb (pNPTS138); 1,05 Kb e 430 pb. As indicações referem-se aos tamanhos das bandas do marcador, em pares de bases.

FONTE: Rodrigues (2012).

Figura 26 - Eletroforese em gel de agarose de confirmação da ligação dos dois fragmentos flanqueadores do gene *dps* ao vetor pNPTS138.

Foi realizada digestão com o par de enzimas *Eco* RI / *Apa* I. O fragmento 2 possui 692 pb. O fragmento 1 possui 868 pb, mas um sítio de interno para *Apa* I o divide em fragmentos de 300 pb e 568 pb. Assim, são visualizadas no gel bandas de aproximadamente 5,3 Kb (pNPTS138); 1,26 Kb e 300 pb. As indicações referem-se aos tamanhos das bandas do marcador, em pares de bases.

FONTE: Rodrigues (2012).

As construções finais obtidas em *E. coli* S17-1 foram introduzidas na linhagem parental NA1000 por conjugação. O crescimento das linhagens doadoras foi inibido por ácido nalidíxico, e a integração dos plasmídeos no genoma de *C. crescentus* foi selecionada por crescimento em canamicina. Crescimento dos transconjugantes em 0,3 % de sacarose permite seleção das colônias que perderam o vetor em um segundo evento de recombinação. Assim, em todos os casos esperou-se observar na detecção do primeiro evento de recombinação a integração do pNPTS138 no genoma. Nesta reação, os oligonucleotídeos utilizados amplificaram em *C. crescentus* NA1000 uma sequência compreendendo partes de cada flaqueador do gene em estudo e o próprio gene. Com a introdução do plasmídeo recombinante ocorre sua inserção no gene por recombinação homóloga, sendo a deleção do gene oriunda de um segundo evento de recombinação. Desse modo, após a segunda recombinação, a sequência clonada no plasmídeo ficaria integrada no genoma, sendo trocada pelo gene íntegro que fica no plasmídeo suicida.

Portanto, a confirmação dos eventos da primeira e da segunda recombinação homóloga nas construções dos mutantes simples das ferritinas foi feita através de PCR, com os resultados demonstrados a seguir (Figuras 27 e 28).

Figura 27 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCRs para confirmação dos eventos da primeira e da segunda recombinações homólogas nas construções do mutante Δbfr .

Oligonucleotídeos utilizados: *bfr del1* / *bfr del4*. **(a)** Detecção da primeira recombinação: construção pNPTbfr12 em NA1000; amostras 1 e 3-9 com bandas maiores de aproximadamente 2 Kb, em 2 banda menor de aproximadamente 1,5 Kb. **(b)** Detecção da segunda recombinação: Δbfr ; amostras 1-4 e 7-10 banda maior de aproximadamente 2 Kb, amostras 6 e 7 banda de 1,5Kb. M indica o marcador de peso molecular. S se refere à linhagem selvagem NA1000. As indicações referem-se aos tamanhos das bandas do marcador, em pares de bases.

FONTE: Rodrigues (2012).

Figura 28 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCRs para confirmação dos eventos da primeira e segunda recombinações homólogas nas construções do mutante Δdps .

Oligonucleotídeos utilizados: *dps del1* / *dps del4*. **(a)** Detecção de integração da primeira recombinação: construção pNPT*dps12* em NA1000; amostras 1, 3, 6 e 7 com bandas menores de aproximadamente 1,7 Kb, em 2, 4, 5 e 8 bandas maiores de aproximadamente 2,3 Kb. **(b)** Detecção de integração da segunda recombinação: Δdps ; amostras 1 e 3-8 banda maior de aproximadamente 2,3 Kb, em 2 banda de 1,7 Kb. M indica o marcador de peso molecular. S se refere à linhagem selvagem NA1000. As indicações referem-se aos tamanhos das bandas do marcador, em pares de bases.

FONTE: Rodrigues (2012).

As bandas maiores e menores referem-se à orientação em que as construções se integram no cromossomo receptor. A probabilidade teórica de cada integração é de 50 % para cada lado, como ocorreu em *dps*. Já para *bfr*, apenas uma das amostras integrou-se diferentemente das demais, o que poderia ser decorrente de uma maior dificuldade de recombinação no sentido da banda maior, ou simplesmente um fator relacionado ao pequeno número amostral. No caso das segundas recombinações, todas as bandas maiores eram representativas de colônias revertentes para a linhagem selvagem, possuindo, portanto, reversão para o genótipo de *C. crescentus* NA1000.

4.2.2 Mutante duplo

Na sequência, foram realizados os procedimentos para a construção do mutante duplo ($\Delta bfr/dps$). Para tal, optou-se pela inserção do vetor pNPTS138 contendo os dois fragmentos de *bfr* no cromossomo da linhagem Δdps , linhagem que apresentou menor eficiência no evento de segunda recombinação (ver adiante). As confirmações das recombinações homólogas realizadas por reações de PCR estão apresentadas na Figura 29, onde foi possível observar a presença do um clone do mutante duplo (canaleta 12) em meio às amostras que demonstraram ser revertentes para a linhagem parental.

Figura 29 - Eletroforese em gel de agarose de produtos de PCR para confirmação do evento de segunda recombinação homóloga nas construções do mutante $\Delta bfr/dps$.

Oligonucleotídeos utilizados: *bfr* del1 / *bfr* del4. Detecção da segunda recombinação: $\Delta bfr/dps$; amostras 1-11 e 13-23 banda de aproximadamente 2 Kb, em 12 banda de 1,5 Kb. M indica o marcador de peso molecular. S se refere à linhagem parental Δdps . As indicações referem-se aos tamanhos das bandas do marcador, em pares de bases.

FONTE: Rodrigues (2012).

A discrepância no número de colônias analisadas para se obter as linhagens Δbfr , Δdps e $\Delta bfr/dps$ demonstrou uma eficiência diferente nas segundas recombinações de cada mutante. Para *bfr*, em 34 colônias analisadas, foram encontradas 2 com tamanhos de bandas referentes à linhagem mutante, o que mostra aproximadamente 6 % de eficiência no evento de segunda recombinação. Já para *dps*, em 40 colônias analisadas foi encontrada um com o tamanho de banda referente à linhagem mutante, mostrando 2,5 % de eficiência no evento de segunda recombinação. Em relação ao mutante duplo, em 23 análises verificou-se a obtenção de um linhagem de interesse, mostrando aproximadamente 4,4 % de eficiência. A baixa eficiência verificada representa um desvio muito grande da proporção esperada de 1:1, isto é, número de recombinantes com a deleção aproximadamente igual ao número de recombinantes revertentes para o gene selvagem. Isso pode ser um indício da relevância desses genes no metabolismo de *Caulobacter*, ou significa que o $\Delta bfr/dps$ seja na verdade inviável, e apenas alguns sobrevivem por possuírem uma mutação secundária

(compensatória) em algum outro gene. Aqui, partimos do pressuposto da viabilidade do mutante duplo.

4.2.3 Linhagens complementadas

Tendo sido obtidas as linhagens mutantes para ambas as ferritinas (Δbfr e Δdps), bem como o mutante duplo ($\Delta bfr \Delta dps$), passou-se a seguir para a construção das linhagens complementadas. Para isso, as linhagens mutantes para os genes das ferritinas seriam acrescidas de plasmídeos carregando os genes das ferritinas e as suas regiões promotoras, a fim de se restabelecer as características das linhagens selvagens nos ensaios fenotípicos.

Em ambos os casos, as regiões de interesse no genoma foram amplificadas por PCR, clonadas no vetor pGEM-T Easy, cada plasmídeo com o devido inserto separadamente, para num momento posterior estas regiões serem clonadas no plasmídeo pMR20. A ideia na construção destes vetores é que, após sua introdução na linhagem S17-1 de *E. coli*, fossem passadas por conjugação com os respectivos mutantes para a complementação da mutação.

A construção do vetor pMR20**bfr**^C foi obtida com sucesso, e sua confirmação mostrada na Figura 30.

Figura 30 - Eletroforese em gel de agarose de confirmação da obtenção de pMR20bfr^C.

Digestões com enzimas de restrição *Bam* HI / *Hind* III do vetor de clonagem contendo o gene CC3262 contendo sua região promotora revelaram a presença do fragmento (banda superior) correspondendo ao vetor pMR20 (10,7kb) somado aos 770 pb do inserto (indicado no quadrado branco).

FONTE: Rodrigues (2012).

Entretanto, a construção do vetor pMR20 *dps*^C apresentou complicações experimentais, acrescidas de imprevistos externos à execução do trabalho, que atrasaram de forma considerável os procedimentos laboratoriais, inviabilizando a obtenção de ambas as linhagens complementadas em tempo hábil para uso nos experimentos. Tal inconveniente será certamente sanado para fins de publicação do trabalho.

4.3 Análises Fenotípicas

4.3.1 Halo de inibição de crescimento

A fim de se realizar o estudo dos fenótipos dos mutantes frente ao estresse oxidativo foram efetuados ensaios de difusão em disco, utilizando-se H₂O₂ 3 %. Como pode ser notado na Tabela 4, não foi possível observar diferença significativa entre as linhagens *C. crescentus* NA1000 e Δbfr , o que indicaria que este gene não é importante para a resposta a estresse oxidativo gerado por peróxido de hidrogênio. De fato, em *E coli*, *Erwinia* e *Pseudomonas* já havia sido verificada a não sensibilidade a H₂O₂ para mutantes *bfr* (ABDUL-TEHRANI et al., 1999; BOUGHAMMOURA et al., 2008; CHEN et al., 2010). Já para as linhagens Δdps e $\Delta bfr/dps$ houve um aumento do halo de inibição em placa, o que mostraria uma maior susceptibilidade destas ao estresse provocado por tal agente.

Tabela 4 - Ensaio de halo de inibição de crescimento com peróxido de hidrogênio.

Linhagem	Diâmetro da zona de inibição de crescimento (cm)
NA1000	3,45 ± 0,07
Δbfr	3,50 ± 0,14
Δdps	4,10 ± 0,14
$\Delta bfr/dps$	4,00 ± 0,1

O resultado era o esperado, sabendo-se que *dps* é importante para a resistência a estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio em *Salmonella* (HALSEY et al., 2004). O fato de o mutante duplo apresentar halo de valor próximo ao halo de inibição obtido no

mutante da ferritina Dps pode indicar que tal fenótipo é decorrente deste mutante, uma vez que a ferritina Bfr não demonstrou apresentar tal fenótipo em *Caulobacter*. Outras bactérias apresentam comportamento semelhante em Dps para esse tipo de experimento, como *Campylobacter jejuni* e *Listeria innocua* (CHIANCONE et al., 2004; ISHIKAWA et al., 2003).

Também o mutante Δfri em *Listeria monocytogenes*, cujo gene deletado é homólogo ao *dps*, tem resistência menor a peróxido de hidrogênio. Fri contribui com a habilidade de *L. monocytogenes* a sobreviver num ambiente com estresse oxidativo e pouca disponibilidade de ferro (OLSEN et al., 2005).

Dps aparenta usar H_2O_2 em vez de oxigênio molecular comoceptor de elétrons durante a oxidação de ferro (IMLAY, 2008). A magnitude da resposta a H_2O_2 depende não apenas do tipo de estímulo, mas também da fase de crescimento, sendo a máxima resposta na fase logarítmica e quase nenhuma na fase estacionária inicial (CABISCOL et al., 2000). Essa informação parece contraditória, sabendo ser a fase estacionária um período de bastante estresse para as células, cujas taxas de crescimento diminuem como resultado do esgotamento de nutrientes, e acúmulo de produtos tóxicos. Mas rapidamente se compreende que as células se preparam antecipadamente para a possibilidade de ficarem suscetíveis a estresses ambientais, e essa antecipação deve ser realizada ainda em fase exponencial do crescimento. A susceptibilidade aumentada a H_2O_2 é correlacionada a elevados níveis de ferro intracelular (VELAYUDHAN et al., 2007), portanto era esperado que ao menos um dos mutantes das ferritinas exibisse sensibilidade ao estresse oxidativo.

4.3.2 Curvas de crescimento

Outra análise fenotípica dos mutantes consistiu no monitoramento do crescimento das linhagens mutantes em condições de limitação e suficiência de ferro, para verificar a importância destes genes na resposta à presença ou ausência do metal (Figura 31).

Figura 31 - Crescimento dos mutantes Δbfr , Δdps e $\Delta bfr/dps$ ($\Delta duplo$).

FONTE: Rodrigues (2012).

Como pode ser observado, para todas as linhagens as curvas em meio PYE sem adição de estresse se assemelha à curva em cuja linhagem foi adicionado estresse por ferro, o que indica que as linhagens em estudo não têm seu crescimento afetado pela presença do metal nesta concentração, durante o tempo analisado. Já ao se adicionar o quelante dipiridil, que torna o meio escasso em ferro, todas as linhagens apresentaram seu crescimento alterado, a partir de 6 horas após a adição, mas observa-se também que todas as linhagens aparentam se recuperar ao longo do tempo atingindo níveis semelhantes às demais linhagens em 48 h (fase estacionária).

Poderia se pensar na possibilidade de que a concentração de dipiridil utilizada não esteja quelando todo o ferro do meio rico, de modo a permitir visualizar uma diferença mais acentuada. Porém, as condições de realizações do ensaio seguiram os protocolos já otimizados em nosso laboratório. No caso de *Caulobacter*, por esta ser uma bactéria oligotrófica e bem adaptada a baixas concentrações de nutrientes, talvez a menor concentração de ferro não seja suficiente para comprometer o seu crescimento.

No estudo de Boughammoura et al. (2008) na bactéria *Erwinia* as linhagens mutantes para as ferritinas *bfr*, *ftnA* e *bfr/ftnA* tiveram seu crescimento analisado, tendo sido verificado em meio com dipiridil uma redução na capacidade de crescimento do mutante *ftnA*, indicando que a ausência desta ferritina altera a capacidade da bactéria superar a privação de ferro. Já o mutante *bfr* se comportou como a linhagem selvagem, tendo o mutante duplo um padrão intermediário comparando-se ambas as ferritinas.

Em *Pseudomonas* (CHEN et al., 2010) quando em crescimento em meio rico em ferro não houve diferença significativa entre as linhagens mutantes de ferritinas ($\Delta bfr\alpha$, $\Delta bfr\beta$ e $\Delta bfr\alpha\Delta bfr\beta$); no meio desprovido do metal o crescimento das linhagens mutantes simples foi similar à linhagem selvagem, tendo apresentado apenas o mutante duplo uma

redução significativa do seu crescimento. Assim, nesta bactéria a presença de uma das ferritinas compensaria a falta de outra, suportando o seu crescimento normal em meio escasso de ferro.

O mutante de *Listeria monocytogenes* Δfri (homólogo a Δdps) cresce em concentração baixa de ferro, mas este crescimento do mutante *fri* é reduzido se comparado ao selvagem quando se efetua a troca do meio rico para um meio pobre em ferro (OLSEN et al., 2005).

Portanto, *Caulobacter* não tem seu crescimento afetado devido à ausência das ferritinas, mostrando que elas não são essenciais ao crescimento da bactéria, provavelmente nem à sobrevivência da mesma nessas condições estudadas. Isso sugere também que em condição de excesso de ferro a bactéria deve se apropriar de outros mecanismos de defesa, suas inúmeras enzimas antioxidantes e atividades de reparo que suprem a falta das ferritinas, no que tange ao metabolismo do ferro.

4.3.3 Quantificação de ferro

O último ensaio fenotípico realizado foi a quantificação de ferro total em amostras de NA1000, Δbfr , Δdps e $\Delta bfr/dps$. O experimento foi realizado pelo método de análise elementar ICP-AES (*Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectroscopy*). Os resultados são apresentados na Tabela 5 a seguir.

Tabela 5 - Quantificação de Ferro por ICP-AES.

Amostra	Média de Resultados (mg/L)	Desvio (+/-)
NA1000	63,54	1,47
Δbfr	69,18	6,20
Δdps	66,19	4,35
$\Delta bfr \Delta dps$	57,82	3,49

Como se pode observar na Tabela 5, aparentemente os mutantes simples contêm níveis de ferro equivalentes à linhagem selvagem, e o mutante duplo apresenta níveis de ferro mais baixos. Os dados obtidos não permitem atribuir a nenhuma das duas ferritinas o papel de estocadora majoritária de ferro em *Caulobacter*. Podemos pensar que nos mutantes simples pode estar havendo um aumento da expressão de uma ferritina para compensar a falta da outra, e que essa superexpressão não nos permite observar uma redução nos níveis totais de ferro. Outra hipótese é de que uma terceira ferritina tenha o papel de maior estocadora de ferro em *C. crescentus*. Essa é uma ideia preliminar, pensada devido à existência de uma possível candidata a ferritina: a ORF CC0557, anotada no banco de dados PFAM como proteína hipotética, mas que se sabe possuir um domínio de *ferritin-like*, visto no banco de dados KEGG. A similaridade de CC0557 com as ferritinas é estrutural, mas não há similaridade na sequência de aminoácidos. Não existem publicações a respeito dessa ORF, mas já se sabe que este gene é induzido em suficiência de ferro e ativado por Fur (SILVA NETO, comunicação pessoal).

A opção pela metodologia adotada ao se realizar a contagem de ferro total em fase estacionária se deve a estudos prévios que indicaram que defeitos na estocagem de ferro em linhagens mutantes para ferritinas são apenas aparentes nessa fase de crescimento

(VELAYUDHAN et al., 2007). Nos resultados deste autor, Bfr é apontada como a proteína estocadora de ferro em *S. typhimurium* também por análise por ICP-AES. Nesse estudo ainda, o mutante *dps* mostrou 13 % de redução no conteúdo total de ferro. *Bfr* mostrou significantes 50 % de redução em comparação ao selvagem.

Em *Pseudomonas*, Chen et al. (2010) observaram que a perda de uma das duas ferritinas resultou na redução de 17 % de níveis de ferro. A deleção de ambas reduziu 38 % em relação a selvagem. Em fase estacionária, níveis de ferro total nos mutantes simples foram reduzidos em 15 %, enquanto no duplo 38 %. Boughammoura et al. (2008) verificaram que no conteúdo de ferro total por ICP-AES (meio suplementado com 50µM FeCl₃) há uma redução no conteúdo total de ferro no mutante duplo, como também ocorreu aqui.

Apesar dos estudos aqui apresentados, e da ocorrência generalizada das ferritinas, pouco ainda se sabe das suas funções em bactérias, especialmente sobre as bacterioferritinas (CHEN et al., 2010). Para *E. coli*, a maior parte dos estudos se focou no papel de proteção a danos oxidativos, particularmente peróxidos, na fase exponencial.

Uma possível linha para a continuação deste trabalho seria expandir o repertório de estresses potenciais, incluindo na fase estacionária condições de estresse nutricional, presença de agentes oxidativos e metais pesados, estresse térmico, radiações ionizantes e UV, e extremos de pH. Estudos realizados por Nair e Finkel (2004) já mostraram a susceptibilidade de mutantes *dps* a diversos desses estresses. Italiani e Marques (2003) já padronizaram as condições de teste de linhagens de *Caulobacter* quanto à resistência a diversos estresses, como oxidativo, salino, ácido, térmico, exposição à luz UV.

Uma vasta área de estudo se abre com relação principalmente à linhagem Δdps , pois atualmente propõe-se que Dps é uma proteína multifuncional envolvida em muitos

processos celulares e possui funções em diferentes mecanismos de proteção. Afirma-se que Dps afeta expressão gênica tanto positiva como negativamente e que ela pode regular a expressão modulando a estrutura do DNA ou interagindo com a maquinaria transcricional, possibilitando o recrutamento de fatores de transcrição (NAIR; FINKEL, 2004). Calhoun e Kwon (2010) recentemente corroboraram a ideia de que Dps age como proteína regulatória. Dps compartilha algumas características de proteína semelhante a histonas que podem atuar tanto de maneira positiva como efector negativo em diferentes sistemas. Assim, é possível que Dps acumule função como as histonas de eucariotos que levam a modificações covalentes reversíveis fazendo o DNA ativo ou inativo à maquinaria transcricional, regulando assim a expressão gênica.

5 CONCLUSÕES

Foi realizada a amplificação dos fragmentos contendo as regiões regulatórias de *bfr*, *dps* e do possível *sRNA1*, clonados no vetor pRK/*lacZ*290 e introduzidos em *C. crescentus* NA1000 por conjugação. Os ensaios realizados com os promotores dos genes das ferritinas mostraram em NA1000 um aumento significativo na expressão de *bfr* em excesso de ferro, e que este gene é positivamente regulado por Fur. Viu-se que a expressão de *dps* aumenta em carência de ferro em fase logarítmica e também aumenta na fase estacionária. As linhagens mutantes $\Delta oxyR$, $\Delta sRNA1$ e $\Delta sRNA2$ mostraram diferenças nos níveis de expressão de *bfr* e *dps* em comparação aos atingidos na linhagem selvagem. Os fatores sigma de função extracitoplasmática aparentam ter papel na regulação das ferritinas de maneira distinta, sendo *sigJ* importante para *bfr* e *sigT* associado à *dps*. Ainda não se sabe a real importância de SigU nessa regulação.

As regiões do genoma que flanqueiam os genes CC3262 e CC2873, bem como a região intergênica entre CC0681/CC0682 foram clonadas no plasmídeo suicida pNPTS138. Foram obtidos os mutantes Δbfr , Δdps e o mutante duplo para as duas ferritinas ($\Delta bfr/dps$). A linhagem mutante para o gene da bacterioferritina foi complementada com uma cópia completa do gene deletado.

Para a análise do fenótipo das linhagens mutantes foi avaliado o crescimento na presença e ausência de ferro, pela adição do quelante específico 2-2'-dipiridil. Nas condições testadas, houve alteração de crescimento em todas as linhagens em carência de ferro, mas todas atingem patamares similares ao final do tempo experimental.

Ensaio de halo de inibição de crescimento por H₂O₂ foi realizado nas linhagens selvagem e mutantes; Δdps apresentou maior susceptibilidade a este estresse, sendo que

Δbfr apresentou padrão similar à NA1000. O mutante duplo se comportou de maneira similar à Δdps .

A fim de determinar a contribuição das ferritinas aos níveis de ferro total da célula, a linhagem selvagem e as linhagens mutantes para cada ferritina foram analisadas quanto ao conteúdo total de ferro pela técnica de ICP-AES. Tal ensaio sugeriu que não há uma ferritina mais importante na estocagem de ferro intracelular e que ambas tem papel equivalente.

REFERÊNCIAS⁵

- ABDUL-TEHRANI H.; HUDSON A. J.; CHANG Y.; TIMMS A. R.; HAWKINS C.; WILLIAMS J. M.; HARRISON P. M.; GUEST J. R.; ANDREWS S. C. Ferritin Mutants of *Escherichia coli* Are Iron Deficient and Growth Impaired, and *fur* Mutants are Iron Deficient. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 5, p. 1415-1428, 1999.
- ALBA H. Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 10, n. 2, p. 134-139, REVIEW, 2007.
- ALMIRON M.; LINK A. J.; FURLONG D. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. **Genes Dev.**, v. 6, n. 12B, p. 2646-2654, 1992.
- ALVAREZ-MARTINEZ C. E.; BALDINI R. L.; GOMES S. L. A *Caulobacter crescentus* extracytoplasmic function sigma factor mediating the response to oxidative stress in stationary phase. **J. Bacteriol.**, v. 188, n. 5, p. 1835-1846, 2006.
- ALVAREZ-MARTINEZ C. E.; LOURENCO R. F.; BALDINI R. L.; LAUB M. T.; GOMES S. L. The ECF sigma factor σ^T is involved in osmotic and oxidative stress responses in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 66, n. 5, p. 1240-1255, 2007.
- ANDERSEN J.; DELIHAS N.; IKENAKA K.; GREEN P. J.; PINES O.; ILERCIL O.; INOUE M. The isolation and characterization of RNA coded by the *micF* gene in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.**, v. 15, n. 5, p. 2089-101, 1987.
- ANDREWS S. C.; ROBINSON A. K.; RODRÍGUEZ-QUIÑONES F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 27, p. 215-237, REVIEW, 2003.
- AUSMEES N.; JACOBS-WAGNER C. Spatial and temporal control of differentiation and cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 225-247, REVIEW, 2003.

⁵ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

AUSUBEL F.; BRENT R.; KINGSTON R. E.; MOORE D. D.; SEIDMAN J. G.; SMITH J. A.; STRUHL K. (Ed.). **Short protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, 1995. 900 p, 1995.

BERESWILL S.; WAIDNER U.; ODENBREIDT S.; LICHT F.; FASSBINDER F.; BODE G.; KIST M. Structural, functional and mutational analysis of the *pfr* gene encoding a ferritin from *Helicobacter pylori*. **Microbiology**, v. 144, n. 9, p. 2505-2516, 1998.

BOUGHAMMOURA A.; MATZANKE B. F.; BÖTTGER L.; REVERCHON S.; LESUISSE E.; EXPERT D.; FRANZA T. Differential Role of Ferritins in Iron Metabolism and Virulence of the Plant-Pathogenic Bacterium *Erwinia chrysanthemi* 3937. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 5, p. 1518–1530, 2008.

BRIAT J. F.; RAVET K.; ARNAUD N.; DUC C.; BOUCHEREZ J.; TOURAINE B.; CELLIER F.; GAYMARD F. New insights into ferritin synthesis and function highlight a link between iron homeostasis and oxidative stress in plants. **Ann Bot.**, v. 105, n. 5, p. 811-22, REVIEW, 2010.

BRUN N. E.; CROW A.; MURPHY M. E. P.; MAUK A. G.; MOORE G. R. Iron core mineralization in prokaryotic ferritins. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1800, n. 8, p. 732-44, 2010.

CABISCOL E.; TAMARIT J.; ROS J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **Int. Microbiol.**, v. 3, n. 1, p. 3-8, REVIEW, 2000.

CALHOUN L. N.; KWON Y. M. Structure, function and regulation of the DNA-binding protein Dps and its role in acid and oxidative stress resistance in *Escherichia coli*: a review. **J. Appl. Microbiol.**, v. 110, n. 2, p. 375-386, REVIEW, 2010.

CASES I.; LORENZO V.; OUZOUNIS C. A. Transcription regulation and environmental adaptation in bacteria. **Trends Microbiol.**, v. 11, n. 6, p. 248-253, 2003.

CHEN C. Y.; MORSE S. A. Neisseria gonorrhoeae bacterioferritin: structural heterogeneity, involvement in iron storage and protection against oxidative stress. **Microbiology**, v. 145, p. 2967–2975, 1999.

CHEN L.; JAMES L. P.; HELMANN J. D. Metalloregulation in *Bacillus subtilis*: isolation and characterization of two genes differentially repressed by metal ions. **J. Bacteriol.**, v.175, n. 17, p. 5428–5437, 1993.

CHEN W. P.; KUO T. T. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, n. 9, p. 2260, 1993.

CHEN S.; BLEAM W. F.; HICKEY W. J. Molecular Analysis of Two Bacterioferritin Genes, *bfrA* and *bfrB*, in the Model Rhizobacterium *Pseudomonas putida* KT2440. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, n. 16, p. 5335–5343, 2010.

CHIANCONE E.; CECI P. The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: Detoxification of iron and hydrogen peroxide and DNA binding. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1800, n. 8, p. 798-805, 2010.

CHIANCONE E.; CECI P.; ILARI A.; RIBACCHI F.; STEFANINI S. Iron and proteins for iron storage and detoxification. **Biometals**, v. 17, n. 3, p. 197-202, REVIEW, 2004.

CROW A; LAWSON T. L.; LEWIN A.; MOORE G. R.; BRUN N. E. Structural Basis for Iron Mineralization by Bacterioferritin. **J Am Chem Soc.**, v. 131, n. 19, p. 6808-13, 2009.

CURTIS P. D.; BRUN Y. V. Getting in the loop: regulation of development in *Caulobacter crescentus*. **Microbiol. Mol. Biol.**, v. 74, n. 1, p. 13-41, REVIEW, 2010.

ESCOLAR L.; PÉREZ-MARTÍN J.; Lorenzo V. Binding of the fur (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. **J. Mol Biol.**, v. 283, n. 3, p. 537-47, 1998.

ELY B. Genetics of *Caulobacter crescentus*. **Methods Enzymol.**, v. 204, p. 372-384, REVIEW, 1991.

EVINGER M.; AGABIAN N. Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. **J. Bacteriol.**, v. 132, n. 1, p. 294-301, 1977.

FOSTER J. W.; HALL H.K. Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (*fur*) mutations on iron-and pH-regulated protein synthesis. **J. Bacteriol.**, v. 174, n. 13, p. 4317-4323, 1992.

GARG R. P.; VARGO C. J.; CUI X. Y.; KURTZ D. M. A [2Fe-2S] protein encoded by an open reading frame upstream of the *Escherichia coli* bacterioferritin gene. **Biochemistry**, v. 35, p. 6297-6301, 1996.

GOBER J. W.; SHAPIRO L. A developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3' enhancer and IHF binding elements. **Mol. Biol. Cell**, v. 3, n. 8, p. 913-926, 1992.

GONZÁLEZ-FLECHA B.; DEMPLE B. Role for the *oxyS* gene in regulation of intracellular hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. **J Bacteriol.**, v. 181, n. 12, p. 3833-3836, 1999.

GOTTESMAN S. Micros for microbes: non-coding regulatory RNAs in bacteria. **Trends Genet.**, v. 21, n. 7, p. 399-404, REVIEW, 2005.

HAIKARAINEN T.; PAPAGEOURGIOU A. C. Dps-like proteins: structural and functional insights into a versatile protein family. **Cell Mol Life Sci.**, v. 67, n. 3, p. 341-51, REVIEW, 2010.

HALLEZ R.; BELLEFONTAINE A. F.; LETESSON J. J.; DE BOLLE X. Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria. **Trends Microbiol.**, v. 12, n. 8, p. 361-365, 2004.

HALSEY T. A.; VAZQUEZ-TORRES A.; GRAVDAHL D. J.; FANG F. C.; LIBBY S. J. The ferritin-like Dps protein is required for *Salmonella enteric* serovar Typhimurium oxidative stress resistance and virulence. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 2, p. 1155-1158, 2004.

HANAHAN D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **J. Mol. Biol.**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HELMANN J. D. Sigma Factors in Gene Expression. In: eLS. John Wiley & Sons Ltd, Chichester. (Sep 2005) Disponível em <http://www.els.net> [doi: 10.1038/npg.els.0003829] Acesso em 28 mai 2011.

IMLAY J. A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 77, p. 755-76, REVIEW, 2008.

ISHIKAWA T.; MIZUNOE Y.; KAWABATA S.; TAKADE A.; HARADA M.; WAI S. N.; YOSHIDA S. The iron-binding protein Dps confers hydrogen peroxide stress resistance to *Campylobacter jejuni*. **J. Bacteriol.**, v. 185, n. 3, p. 1010–1017, 2003.

ITALIANI V. C.; MARQUES M. V. Isolation and characterization of *Caulobacter* mutants impaired in adaptation to stationary phase. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, n.1, p. 85-90, 2003.

ITALIANI V. C.; SILVA NETO J. F.; BRAZ V. S.; MARQUES M. V. Regulation of catalase-peroxidase KatG is OxyR-dependent and Fur independent in *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 193, n. 7, p. 1734-1744, 2011.

JENAL U. Signal transduction mechanisms in *Caulobacter crescentus* development and cell cycle control. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 24, n. 2, p. 177-191, REVIEW, 2000.

JOHNSTON A. W. B.; TODD J. D.; CURSON A. R.; LEI S.; NIKOLAIDOU-KATSARIDOU N.; GELFAND M. S.; RODIONOV D. A. Living without Fur: the subtlety and complexity of iron-responsive gene regulation in the symbiotic bacterium *Rhizobium* and other α -proteobacteria. **Biometals**, v. 20, n. 3-4, p. 501–511, REVIEW, 2007.

KEILER K. C. Biology of trans-translation. **Annu Rev Microbiol.**, v. 62, p. 133-51, 2008.

LANDT S. G.; ABELIUK E.; MCGRATH P. T.; LESLEY J. A.; MCADAMS H. H.; SHAPIRO L. Small non-coding RNAs in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 68, n. 3, p. 600-614, 2008.

LAUB M. T.; SHAPIRO L.; MCADAMS H. H. Systems Biology of *Caulobacter* **Annu. Rev. Genet.**, v. 41, p. 429–441, REVIEW, 2007.

LEASE R. A.; BELFORT M. Riboregulation by DsrA RNA: trans-actions for global Economy. **Mol. Microbiol.**, v. 38, n. 4, p. 667-672, REVIEW, 2000.

LIVAK K. J.; SCHMITTGEN T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LONETTO M. A.; BROWN K. L.; RUDD K. E.; BUTTNER K. E. Analysis of *Streptomyces coelicor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 91, n. 16, p. 7573-7577, 1994.

LOPRASERT S; SALLABHAN W. W. R.; MONGKOLSUK S. DpsA protects the human pathogen *Burkholderia pseudomallei* against organic hydroperoxide. **Arch Microbiol.**, v, 182, n.1, p. 96-101, 2004.

LOURENÇO R. F.; KOHLER; GOMES S. L. A two-component system, an anti-sigma factor and two paralogous ECF sigma factors are involved in the control of general stress response in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 80, n. 6, p. 1598-1612, 2011.

MAGNUSSON L. U.; FAREWELL A.; NYSTRÖM T. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. **Trends Microbiol.**, v. 13, n. 5, p. 236-242, REVIEW, 2005.

MASSÉ E.; GOTTESMAN S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 99, n. 7, p. 4620-4625, 2002.

MASSÉ E.; MAJDALANI N.; GOTTESMAN S. Regulatory roles for small RNAs in bacteria. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 6, n. 2, p. 120-124, REVIEW, 2003.

MASSÉ E.; SALVAIL H.; DESNOYERS G.; ARGUIN M. Small RNAs controlling iron metabolism. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 10, n. 2, p. 140-145, REVIEW, 2007.

MASSÉ E.; VANDERPOOL C. K.; GOTTESMAN S. Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. **J Bacteriol.**, v. 187, n. 20, p. 6962-71, 2005.

MCGRATH P. T.; LEE H.; ZHANG L.; INIESTA A. A.; HOTTES A. K.; TAN M. H.; HILLSON N. J.; HU P.; SHAPIRO L.; MCADAMS H. H. High-throughput identification of transcription start sites, conserved promoter motifs and predicted regulons. **Nat. Biotechnol.**, v. 25, n. 5, p. 584-592, 2007.

MILLER J. H. **Experiments in molecular genetics**. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972. 466 p.

MISSIAKAS D.; RAINA S. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. **Mol. Microbiol.**, v. 28, n. 6, p. 1059-1066, REVIEW, 1998.

MIZUNO T.; CHOU M.Y.; INOUE M. A unique mechanism regulating gene expression: translational inhibition by a complementary RNA transcript (micRNA). **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 81, p.1966-1970, 1984.

MONGKOLSUK S.; HELMANN J. D. Regulation of inducible peroxide stress responses. **Mol. Microbiol.**, v. 45, n. 1, p. 9-15, REVIEW, 2002.

NAIR S.; FINKEL S. E. Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 13, p. 4192-4198, 2004.

NIERMAN W. C.; FELDBLYUM T. V.; LAUB M. T.; PAULSEN I. T.; NELSON K. E.; EISEN J. A.; HEIDELBERG J. F.; ALLEY M. R.; OHTA N.; MADDOCK J. R.; POTOCKA I.; NELSON W. C.; NEWTON A.; STEPHENS C.; PHADKE N. D.; ELY B.; DEBOY R. T.; DODSON R. J.; DURKIN A. S.; GWINN M. L.; HAFT D. H.; KOLONAY J. F.; SMIT J.; CRAVEN M. B.; KHOURI H.; SHETTY J.; BERRY K.; UTTERBACK T.; TRAN K.; WOLF A.; VAMATHEVAN J.; ERMOLAEVA M.; WHITE O.; SALZBERG S. L.; VENTER J. C.; SHAPIRO L.; FRASER C. M. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 98, n. 7, p. 4136-4141, 2001.

NYSTRÖM T. Stationary-phase physiology. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 58, p. 161-181, 2004.

OLSEN K. N.; LARSEN M. H.; GAHAN C. G. M.; KALLIPOLITIS B.; WOLF X. A.; REA R.; HILL C.; INGMER H. The Dps-like protein Fri of *Listeria monocytogenes* promotes stress tolerance and intracellular multiplication in macrophage-like cells. **Microbiology**, v. 151, n. 3, p. 925-933, 2005.

PRENTKI P.; KRISCH H. M. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. **Gene**, v. 29, n. 3, p. 303-313, 1984.

PRÉVOST K.; DESNOYERS J. F. J.; LAVOIE F.; MASSÉ E. Small RNA-induced mRNA degradation achieved through both translation block and activated cleavage. **Genes Dev.**, v. 25, n. 4, p. 385-96., 2011.

QUAIL M. A.; JORDAN P.; GROGAN J. M.; BUTT J. N.; LUTZ M.; THOMSON A. J.; ANDREWS S.C.; GUEST J. R. Spectroscopic and voltammetric characterisation of the bacterioferritin-associated ferredoxin of *Escherichia coli*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 229, p. 635-642, 1996.

ROBERTS R. C.; TOOCHINDA C.; AVEDISSIAN M.; BALDINI R. L.; GOMES S. L.; SHAPIRO L. Identification of a *Caulobacter crescentus* operon encoding *hrcA*, involved in negatively regulating heat-inducible transcription, and the chaperone gene *grpE*. **J. Bacteriol.**, v. 178, n. 7, p. 1829-1841, 1996.

RODRIGUES, M. M. **Estudo do papel de duas ferritinas no metabolismo de ferro de *Caulobacter crescentus* e sua regulação**. 2012. 129 f. (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

SALVAIL H.; MASSÉ E. Regulating iron storage and metabolism with RNA: an overview of posttranscriptional controls of intracellular iron homeostasis. **Wiley Interdiscip Rev RNA.**, v. 3, n. 1, p. 26-36., REVIEW, 2012.

SAMBROOK J.; FRITCH E. F.; MANIATIS T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 p.

SEIB K. L.; WU H. J.; SRIKHANTA Y. N.; EDWARDS J. L.; FALSETTA M. L.; HAMILTON A. J.; MAGUIRE T. L.; GRIMMOND S. M.; APICELLA M. A.; MCEWAN A. G.; JENNINGS M. P. Characterization of the OxyR regulon of *Neisseria gonorrhoeae*. **Mol. Microbiol.**, v. 63, n. 1, p. 54-68, 2007.

SEN A.; DWIVEDI K.; RICE K. A.; BULLERJAHN G. S. Growth phase and metal-dependent regulation of the *dpsA* gene in *Synechococcus* sp. strain PCC 7942, USA. **Arch. Microbiol.**, v. 173, n. 5-6, p. 352–357, 2000.

SILVA NETO J. F.; BRAZ V. S.; ITALIANI V. C. S.; MARQUES M. V. Fur controls iron homeostasis and oxidative stress defense in the oligotrophic alpha-proteobacterium *Caulobacter crescentus*. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, n. 14, p. 4812–4825, 2009.

SKERKER J. M.; LAUB M. T. Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, n. 4, p. 325-337, REVIEW, 2004.

SIMON R.; PRIEFFER U.; PUHLER A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram-negative bacteria. **Nature Biotechnology**, v. 1, p. 784-790, 1983.

STORZ G.; IMLAY J. A. Oxidative stress. **Curr. Opin. Microbiol**, v. 2, n. 2, p. 188-194, REVIEW, 1999.

STORZ G.; OPDYKE A.; ZHANG A. Controlling mRNA stability and translation with small, noncoding RNAs. **Curr. Opin. Microbiol**, v. 7, n. 2, p. 140-144, REVIEW, 2004.

THEIL E. C. Coordinating responses to iron and oxygen stress with DNA and mRNA promoters: the ferritin story. **Biometals**, v. 20, n. 3-4, p. 513-521, REVIEW, 2007.

THEIL E. C. Iron Homeostasis and Nutritional Iron Deficiency. **J. Nutr.**, v. 141. n.4, p. 724S-728S, 2011.

TSAI J. W.; ALLEY M. R. Proteolysis of the McpA chemoreceptor does not require the *Caulobacter* major chemotaxis operon. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 2, p. 504 -507, 2000.

VARGHESE S.; WU A.; PARK S.; IMLAY J. A. Submicromolar hydrogen peroxide disrupts the ability of Fur protein to control free-iron levels in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 67, n. 3, p. 822-330, 2007.

VECEREK B; MOLL I.; UNDO B. Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. **EMBO J.**, v. 26, n. 4, p. 965-75., 2007.

VELAYUDHAN J.; CASTOR M.; RICHARDSON A.; MAIN-HESTER K. L.; FANG F. C. The role of ferritins in the physiology of *Salmonella enterica* sv. Typhimurium: a unique role for ferritin B in iron-sulphur cluster repair and virulence. **Mol. Microbiol.**, v. 63, n. 5, p. 1495-1507, 2007.

VIOLLIER P. H.; SHAPIRO L. Spatial complexity of mechanisms controlling a bacterial cell cycle. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 7, n. 6, p. 572-578, REVIEW, 2004.

WANDERSMAN C.; DELEPELAIRE P. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 58, p. 611-647, REVIEW, 2004.

WASSARMAN K. M.; REPOILA F.; ROSENOW C.; STORZ G.; GOTTESMAN S. Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. **Genes Dev.**, v. 15, p. 1637–1651, 2001.

WIEDENHEFT B.; MOSOLF J.; WILLITS D.; YEAGER M.; DRYDEN K. A.; YOUNG M.; DOUGLAS T. An archaeal antioxidant: characterization of a Dps-like protein from *Sulfolobus solfataricus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 102, n. 30, p. 10551–10556, 2005.

ZHENG M.; WANG X.; TEMPLETON L. J.; SMULSKI D. R.; LAROSSA R. A.; STORZ G. DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 15, p. 4562-4570, 2001.