Alexandre Magno Vicente

ESTUDO DA RNA HELICASE DA FAMÍLIA DEAD-BOX
CODIFICADA PELO GENE CC0835 EM *Caulobacter crescentus*

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 em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Dra. Marilis do Valle Marques

Versão Corrigida

A versão original encontra-se disponível na biblioteca do ICB e na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2017

RESUMO

VICENTE, A. M. **Estudo da RNA helicase da família DEAD-box codificada pelo gene CC0835 em *Caulobacter crescentus***. 2016. 131 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Com a construção da linhagem RlhE fusionada a um epitopo, fomos capazes de investigar o acúmulo da proteína após choque frio, em fase estacionária, durante o ciclo celular de *Caulobacter crescentus*, sob diferentes condições de estresses e, finalmente, após a adição de cloranfenicol, para o estudo a estabilidade protéica. Foi observado um aumento no acúmulo da proteína após choque frio. Além disso, quando em diferentes condições de estresses, RlhE obteve uma leve indução na presença de NaCl e Sacarose; mas permaneceu constante em fase estacionária e durante o ciclo celular. Finalmente, vimos que a estabilidade de RlhE varia de acordo com a temperatura, tendo um aumento da estabilidade a 10°C. As análises de expressão do gene *rlhE* foram realizadas por ensaios de atividade de beta-galactosidase. Demonstramos que a presença da região 5'UTR é importante para a indução, e que *rlhE* possui, pelo menos em parte, uma regulação pós-transcricional. Uma análise transcriptômica global da linhagem selvagem e mutante para *rlhE*, após o choque frio, foi realizada por RNAseq, o qual nos auxiliou na identificação de genes envolvidos em diversos processos biológicos. Finalmente, a co-imunoprecipitação e identificação dos RNAs por sequenciamento em larga escala revelou que RlhE interage com 51 mRNAs.

Palavras-chave: Microbiologia. Biologia molecular. Regulação gênica. Resposta bacteriana a estresses. RNA helicases da família DEAD-box. *Caulobacter crescentus*.

ABSTRACT

VICENTE, A. M. **Study of the DEAD-box RNA helicase encoded by the gene CC0835 in *Caulobacter crescentus***. 2016. 131 p. Dissertation (Master thesis in Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Here, we constructed a strain in which the RhIE protein was fused to an epitope that allowed the investigation of the protein profile after cold-shock, at stationary phase, during cell cycle of *Caulobacter crescentus*, under different environmental stresses, and, finally, after chloramphenicol addition to study protein stability. The results showed an increase in protein concentration after cold shock stress. When exposed to different stresses RhIE was slightly induced in the presence of NaCl and Sucrose; but its abundance remained constant at stationary phase and during *C. crescentus*' cell cycle. Lastly, the protein stability varies depending on temperature - increasing at low temperature. Gene expression analysis was performed using beta-galactosidase assays. We showed that the presence of the 5'UTR is important for the induction of *rhIE*, and that RhIE is posttranscriptionally regulated. A global transcriptome analysis was performed using RNAseq after cold shock stress of the wild type strain and null mutant for *rhIE*, and several genes involved in a wide range of biological process were identified. Finally, High-throughput sequencing of RNA isolated by cross-linking immunoprecipitation revealed interactions of RhIE with 51 mRNAs.

Keywords: Microbiology. Molecular biology. Gene regulation. Bacterial stress response. DEAD-box RNA helicases. *Caulobacter crescentus*.

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Caulobacter crescentus*

Caulobacter crescentus é uma bactéria Gram-negativa não patogênica e de vida livre, presente em ambientes aquáticos - águas de rios, lagos e mares - mas também encontrada no solo. Por se tratar de uma espécie oligotrófica, está associada a ambientes pobres em nutrientes e de baixo conteúdo de matéria orgânica (POINDEXTER, 1981). Embora seja uma bactéria mesofílica, com temperatura ótima de crescimento de 30 °C, também tem sido encontrada em ambientes que sofrem congelamento, sugerindo que algumas espécies sejam psicrotolerantes (ABYZOV et al., 2001; MANNISTO et al., 1999; MAZZON et al., 2008).

A espécie *C. crescentus* foi a primeira alfa-proteobactéria a ter o genoma completamente sequenciado, tornando-se base de estudos e pesquisas dentro desse grupo de bactérias. Seu genoma possui cerca de 4 Mb apresentando um conteúdo GC de 67% e um cromossomo único e circular, codificando 3.767 genes na linhagem CB15, dentre os quais inúmeros genes possivelmente relacionados à resposta a estresses ambientais (NIERMAN et al., 2001). *C. crescentus* tem sido utilizada como um importante sistema modelo para o estudo de mecanismos moleculares envolvidos no ciclo celular. Suas células possuem a característica de se dividir em duas células-filhas que, por apresentarem diferentes funções e expressarem diferentes conjuntos de genes, são morfo-fisiologicamente distintas. A forma móvel possui um flagelo simples e diversos pili em um dos polos da célula, e por isso apresenta como principais funções locomoção e dispersão. Já a forma sésil apresenta um talo ao invés do flagelo, o qual possui um material adesivo em sua extremidade distal, cuja função é aderir a substratos, superfícies, outros micro-organismos e até mesmo a materiais adesivos provenientes de outras células-talo, podendo formar estruturas em forma de rosetas (MADIGAN et al., 2012; POINDEXTER, 1981).

Em seu ciclo de vida, células-talo alongam o corpo celular tornando-se células pré-divisionais. Um flagelo é então sintetizado no polo oposto ao do talo e ao final da divisão celular a célula pré-divisional dá origem a duas células distintas, uma móvel e uma talo. Mais tarde, as células móveis irão se diferenciar em células-talo e iniciar o ciclo celular novamente (Figura 1). Neste contexto, a formação do talo é um passo obrigatório no desenvolvimento

de toda célula-móvel, e precede a primeira divisão desta célula. Uma vez que a célula-móvel perde o flagelo, desenvolve o talo e completa sua primeira divisão celular, novas células móveis podem ser produzidas (CURTIS; BRUN, 2010).

As células móveis são incapazes de replicar seu DNA, estando em fase pré-sintética (G1), enquanto as células-talo se encontram em fase de síntese (S). De fato, células-talo iniciam a replicação do DNA logo após a divisão celular, enquanto as células móveis devem primeiramente se diferenciar em uma célula-talo para que seu cromossomo possa ser replicado. Além disso, as células-talo representam o estágio final da diferenciação celular, uma vez que a desdiferenciação de célula-talo para uma célula móvel nunca foi observada (CURTIS; BRUN, 2010).

Caulobacter crescentus utiliza um sistema regulador complexo para programar diferentes destinos de desenvolvimento para cada célula-filha na divisão celular. Isto é possível através da sobreposição da expressão gênica, fosforilação e proteólise, de modo a formar uma regulação que integra a replicação e a segregação do cromossomo, diferenciação polar e, por fim, a citocinese (KIRKPATRICK; VIOLLIER, 2011). O ciclo celular de *Caulobacter* possui um sistema central de regulação que depende de reguladores globais como CtrA, GcrA, e DnaA (Figura 1). Cada um destes reguladores é ativo em uma fase específica, e controla genes necessários em um estágio particular do ciclo celular. O sistema de regulação do ciclo celular inclui mecanismos epigenéticos, sensores e de transdução de sinal que proporcionam uma sincronização do processo do ciclo celular como um todo (LAUB et al., 2007; MADIGAN et al., 2012).

Figura 1 - Ciclo celular e sua regulação em *Caulobacter crescentus* – Três reguladores globais, CtrA, DnaA e GcrA oscilam em níveis através do ciclo celular de *C. crescentus*. G1 e G2 compreendem as duas fases de crescimento e S a fase de síntese do DNA. Nas células móveis em G1, CtrA reprime o início da replicação do DNA e expressão de GcrA. Na fase de transição entre G1/S, CtrA é degradado e níveis de DnaA aumentam. DnaA liga-se à origem de replicação e o processo de replicação do DNA é iniciado. Os níveis de GcrA também aumentam, ativando, assim, genes responsáveis pela divisão e síntese de DNA. Na fase de transição entre S/G2, níveis de CtrA começam a aumentar novamente e a expressão de GcrA é reprimida. Assim, os níveis de GcrA diminuem lentamente em células-talo e é rapidamente degradada em células-móveis. CtrA é degradado em células-talo. As cores rosa, verde e azul evidenciam, respectivamente, a presença dos regulares CtrA, DnaA e GcrA no decorrer do ciclo celular de *C. crescentus*. Fonte: (MADIGAN, 2012).

O principal regulador transcricional no desenvolvimento de *Caulobacter*, CtrA, é uma proteína de ligação ao DNA regulada em vários níveis: transcrição, fosforilação, proteólise e localização. Em células móveis, CtrA fosforilado (CtrA~P) liga-se a sítios próximos a origem de replicação do cromossomo impedindo o início prematuro da sua replicação, além de reprimir a transcrição de *gcrA* (HOLTZENDORFF, 2006). No entanto, no momento da diferenciação celular da célula móvel para a célula-talo, CtrA é degradado por proteólise deixando de reprimir o início da replicação nestas células. Neste momento, DnaA recém-sintetizada liga-se à origem de replicação e desencadeia o início do processo de replicação do DNA como ocorre em todas as *Bacteria*, ao mesmo tempo em que ativa a transcrição de *gcrA* (COLLIER; MURRAY; SHAPIRO, 2006). À medida que a concentração

de DnaA diminui devido à proteólise, há, então, o aumento da concentração de GcrA, que promove a ativação de genes para a divisão celular. Por fim, as concentrações de GcrA caem, havendo novamente o aparecimento de CtrA, em células móveis. Como *Caulobacter* replica seu cromossomo somente uma vez por ciclo celular, é de extrema importância um controle preciso na regulação gênica para prevenir a iniciação de uma segunda rodada de replicação antes mesmo do ciclo se completar e a célula se dividir (COLLIER, MCADAMS; SHAPIRO, 2007).

A regulação do ciclo celular de *C. crescentus* vem sendo amplamente estudada nos últimos anos; no entanto, pouco se sabe ainda sobre como as condições e os sinais ambientais incidem sobre o seu ciclo celular. Boutte et al. (2012) demonstraram que o dimorfismo de *C. crescentus* pode ser uma adaptação às condições de oligotrofia em que se encontra. Em condições de baixa disponibilidade de nutrientes, onde o segundo mensageiro (p)ppGpp é altamente expresso, a diferenciação da célula-móvel para a célula-talo em *C. crescentus* é bloqueada, permitindo que a mobilidade ajude a célula na exploração de ambientes mais favoráveis ao seu crescimento. Isso ocorre porque, nestas condições, este alarmônio impede a proteólise de CtrA e ativa a proteólise de DnaA. Este ciclo de vida complexo de *Caulobacter crescentus*, aliado à forma de controle gênico desenvolvida pela espécie para adaptar-se às condições ambientais a que está exposta, tornam este microrganismo um modelo excelente para estudos de genes relacionados a mecanismos de respostas a estresses ambientais.

1.2 Resposta bacteriana a estresses

O que vem a ser um estresse? É difícil definir estresse de uma maneira universal, uma vez que sua percepção é altamente dependente da célula individual. Estresse pode ser definido como qualquer desvio das condições normais de crescimento que pode resultar em reduzida taxa de crescimento bacteriano. Contudo, algumas respostas adaptativas funcionam tão bem que o crescimento não é afetado. Estresse também pode ser definido como uma exposição a qualquer situação ambiental resultante em comprometimento celular - na ausência de uma resposta fisiológica (STORZ, 2000).

Os organismos de vida livre estão sujeitos às condições físicas e químicas características do ambiente onde vivem, de forma que devem ser capazes de lidar com as constantes oscilações ambientais - relacionadas a disponibilidade de nutrientes e recursos ou variações de osmolaridade e temperatura -, as quais podem afetar consideravelmente seu crescimento. Ao longo da evolução, muitos desses organismos desenvolveram e aprimoraram mecanismos capazes de responder às condições adversas aos quais são expostos; uma das formas de resposta desenvolvida é baseada na existência de um controle preciso da expressão de genes específicos, os quais os tornam capazes de sobreviver a diferentes condições (KINKLERT; NARBERHAUS, 2009).

1.3 Respostas adaptativas a baixas temperaturas

A temperatura é um dos parâmetros mais importantes para o crescimento bacteriano, de forma que exige uma rápida adaptação celular às suas alterações. A temperatura elevada provoca danos graves às células, principalmente por causar desnaturação de proteínas, enquanto que estresses relacionados a baixas temperaturas provocam a diminuição da fluidez de membrana, redução na atividade enzimática e a estabilização de estruturas secundárias em ácidos nucleicos, particularmente no mRNA, podendo comprometer a eficiência da transcrição dos RNAs, a tradução e a degradação dos mesmos (BARRIA, 2013; ERMOLENKO; MAKHATADZE, 2002). Assim, com uma finalidade adaptativa, a célula gera uma resposta ao choque-frio contra possíveis danos celulares, levando, principalmente, a uma produção de um conjunto de proteínas induzidas pela resposta ao choque-frio (Tabela 1).

Tabela 1 - Exemplos e funções de proteínas induzidas pelo choque-frio em bactérias

Gene	Descrição/ função em choque frio
<i>aceE</i>	piruvato desidrogenase, descarboxilase. Gualerzi et al. (2003)
<i>aceF</i>	piruvato desidrogenase, acetyltransferase. Gualerzi et al. (2003)
<i>cspA</i>	RNA <i>chaperone</i> induzida no frio, anti-terminador e potencializador da transcrição. Gualerzi et al. (2003)
<i>cspB</i>	Proteína de choque-frio. Gualerzi et al. (2003)
<i>cspE</i>	RNA <i>chaperone</i> ; anti-terminador da transcrição. Gualerzi et al. (2003)
<i>cspG</i>	Proteína homóloga de choque-frio; função desconhecida. Gualerzi et al. (2003)
<i>cspI</i>	Proteína de choque-frio; função desconhecida. Gualerzi et al. (2003)
<i>deaD</i>	RNA helicase dependente de ATP; facilita a tradução de mRNAs contendo estruturas secundárias. Jones et al. (1996), Moll et al. (2002)
<i>infA</i>	Fator de iniciação IF1; papel no início da tradução. Gualerzi et al. (2003)
<i>lpxP</i>	Síntese de Lipídio A na condição de choque-frio. Carty et al. (1999), Vorachek-Warren et al. (2002)
<i>pnp</i>	3'-5' exoribonuclease; componente do degradossomo de RNA. Yamanaka e Inouye (2001)
<i>rnr</i>	3'-5' exonucleases. Cairrão et al. (2003)
<i>rbfA</i>	Fator de ligação ao ribossomo; necessário para eficiente processamento do rRNA 16S. Gualerzi et al. (2003)
<i>tig</i>	<i>Chaperone</i> ; proteína de múltiplos estresses e de ligação ao ribossomo. Kandror et al. (2002), Kandror e Goldberg (1997)
<i>ves</i>	Proteína induzida em condição de diferentes estresses e em choque-frio; função desconhecida. Yamada et al. (2002)
<i>yfiA</i>	Proteína Y, associada à subunidade ribossomal 30S; inibição da tradução. Di Pietro et al. (2013)

Fonte: (BARRIA, 2013)

Em condições de laboratório, a resposta ao choque-frio é desencadeada por uma mudança abrupta de uma cultura em crescimento exponencial e em temperatura ótima de crescimento, para uma temperatura mais baixa (em *E. coli*, de 37 °C para 15 °C). Em consequência da redução de temperatura, existe uma parada temporária do crescimento das células durante 3 a 6 horas - período denominado de fase de aclimação. Na fase de aclimação a produção da maior parte das proteínas da célula é interrompida, exceto as proteínas induzidas por choque-frio, que ainda são traduzidas (POLISSI et al., 2003). Após a fase de aclimação, as células tornam-se adaptadas à baixa condição de temperatura e o crescimento celular retorna em um ritmo mais lento (PHADTARE, 2004); a expressão das proteínas induzidas por choque-frio por fim diminui, e a síntese de proteínas não relacionadas à resposta bacteriana ao estresse é reiniciada (Figura 2).

Figura 2 – Processo de adaptação ao choque-frio – Após o choque-frio, o crescimento de células (linha tracejada) é interrompido durante várias horas (fase de aclimação). Durante esta fase de aclimação, a síntese de proteínas não relacionadas com a resposta ao choque-frio também cessa (linha cinza), enquanto que a pequena fração de proteínas induzidas pelo choque-frio aumenta (linha preta). Após a fase de aclimação, o crescimento e a produção de proteínas não relacionadas com o estresse é reiniciado, embora em ritmo mais lento; e a maioria das proteínas de choque-frio é inibida. CIPs: Proteínas induzidas em choque-frio (Cold Inducible Proteins); Non-CIPs: Proteínas não induzidas pelo choque-frio (Non-Cold Inducible Proteins). Fonte: Adaptado de (HORN et al., 2007).

1.3.1 Adaptação da membrana celular a baixas temperaturas

A rápida redução da temperatura tem como resultado a diminuição da fluidez de membrana e, conseqüentemente, um aumento de sua permeabilidade (CAO-HOANG et al., 2010). A membrana externa de bactérias Gram-negativas é composta por lipopolissacarídeos, que contém uma porção polissacarídica (polissacarídio O) e uma porção lipídica (lípidio A). Em *Escherichia coli*, o lípidio A não corresponde a um típico lípidio de glicerol, apresentando ácidos graxos - como o ácido caproico, láurico, mirístico, palmítico ou esterárico - unidos por meio de grupos amino de um dissacarídeo composto por glicosamina fosfato. A 37 °C, o ácido láurico é geralmente detectado em suas membranas celulares. Por outro lado, em baixas temperaturas, ocorre uma diminuição na formação de ácido láurico e o aparecimento de ácido palmítico (CARTY et al., 1999). Em contraste com ácido láurico, o ácido palmítico é um ácido graxo insaturado. Assim, a presença deste aumenta a fluidez da membrana e diminui o efeito causado pela baixa temperatura (VORACHEK-WARREN et al., 2002).

Em *Bacillus subtilis*, a adaptação da fluidez de membrana envolve rápida insaturação de ácidos graxos em fosfolípidos já existentes. Isso acontece por indução de Des, uma dessaturase de ácidos graxos, que é regulada por uma histidina quinase - DesK - e um regulador de resposta - DesR (AGUILAR et al., 2001). O domínio trans-membrana de DesK foi descrito como um sensor da fluidez de membrana (ALBANESI et al., 2004). A temperatura baixa provoca uma diminuição da fluidez de membrana, favorecendo o estado ativo de DesK; em seguida, DesK fosforila o regulador de resposta DesR que se liga ao promotor do gene *des*, ativando a síntese de D5-desaturase. Esta enzima catalisa a introdução de uma ligação dupla nas caudas de ácidos graxos pré-existentes no interior da membrana celular (AGUILAR et al, 2001;. ALBANESI et al., 2004).

Em *C. crescentus*, mostrou-se que as células já são bastante resistentes a baixas temperaturas e ao congelamento, e que este fato se deve provavelmente à composição de lipídios de sua membrana citoplasmática. A presença de ácidos graxos de cadeia ramificada na membrana, com uma predominância de glicolipídios e ausência de fosfolipídios como

fosfatidiletanolamina e cardiolipina, foi proposta como uma das explicações para esta resistência (MAZZON et al., 2008).

1.3.2 Adaptação do metabolismo de RNA ao choque-frio

A maioria das proteínas induzidas pelo choque-frio está envolvida no metabolismo de RNA; as proteínas mais fortemente induzidas nesta condição são as chaperonas de ácidos nucleicos de uma família específica de proteínas de choque-frio, denominada CSPs (Cold Shock Proteins), bem como helicases de RNA e exonucleases (BARRIA, 2013). Estas proteínas são responsáveis pelo ajuste no metabolismo de RNA de diversas maneiras, sendo crucial para a adaptação ao choque-frio.

Como já citado, a condição de baixa temperatura provoca a estabilização das estruturas secundárias em ácidos nucleicos podendo prejudicar a transcrição, a tradução e a degradação de RNAs. A principal função das proteínas induzidas pelo choque-frio é impedir a formação destas estruturas ou facilitar a degradação de RNAs estruturados. As proteínas da família CSPs são um exemplo de proteínas que impedem a formação de estruturas secundárias no RNA. Em *E. coli*, a RNA helicase DeaD também apresenta a mesma função, além de facilitar a degradação dos RNAs pelas exoribonucleases PNPase e RNase R (MATOS et al, 2009;. PHADTARE, 2011).

1.3.2.1 Transcrição

A maioria das CSPs são capazes de se ligar ao DNA (PHADTARE; INOUE, 1999; YAMANAKA et al., 1998). CSPs têm sido funcionalmente ligadas à manutenção da estrutura de cromossomos (CHAIKAM; KARLSON, 2010). CspA e CspE, por exemplo, estão envolvidos no processo de transcrição em condições de baixas temperaturas, agindo como antiterminadores da transcrição - prevenindo a formação de alças que podem levar à terminação prematura da transcrição (BAE et al., 2000).

1.3.2.2 Degradação/Estabilização

Várias proteínas de choque-frio estão relacionadas com a estabilização e/ou degradação de RNAs. CspA, a principal proteína de choque frio em *E. coli*, rompe estruturas secundárias nos RNAs e funciona como uma chaperona mantendo o RNA em seu estado de fita simples, favorecendo, por fim, a sua degradação (Fig. 3a). CspE, em contrapartida, age de maneira oposta, impedindo a degradação de RNAs (Fig 3b). CspE se liga à cauda poli-A (sinal de degradação em procariotos) de certos RNAs, interferindo na sua digestão pela PNPase, ou podendo ainda inibir a clivagem interna por RNase E (FENG et al., 2001).

Figura 3 – Papel das CSPs na adaptação bacteriana ao choque-frio – (a) Estruturas secundárias no RNA se tornam mais estáveis em baixas temperaturas; CSPs (esferas vermelhas) podem romper RNAs de fita dupla e estabilizar sua conformação em fita simples, o que pode levar ou não à degradação do RNA (b) A ligação de CSPs no RNA também pode dificultar a ação de nucleases, impedindo a degradação do mesmo. Fonte: (BARRIA, 2013).

Em *E. coli*, RhlB - uma RNA helicase da família DEAD-box - é incorporada em um complexo protéico responsável pela degradação de RNAs, o degradossomo. A sua atividade de helicase contribui para degradar RNAs que apresentam estruturas secundárias. *In vitro*, RhlB se associa diretamente com RNase E - a proteína principal do complexo de degradossomo. DeaD - outra RNA helicase de *E. coli* - é também detectada no degradossomo em condições de choque-frio, sugerindo que ambas as RNAs helicases podem se associar com RNase E (PRUD'HOMME-GENEREUX et al., 2004).

1.3.2.3 Tradução

Um bloqueio geral da tradução na célula é encontrado logo após a redução drástica de temperatura, com a exceção da tradução das proteínas de choque-frio. PY é uma proteína envolvida neste bloqueio em *E. coli*. PY reduz a tradução de alguns mRNAs devido a sua capacidade de se ligar a subunidade ribossomal 30S. Como consequência, o número de subunidades ribossomais capazes de formar o complexo de início da tradução diminui. A proteína PY é detectada em frações ribossomais na primeira hora após a indução de frio, continua na fase de aclimação e, em seguida, não é mais encontrada quando o crescimento celular é retomado (DI PIETRO et al., 2013).

RNAs estruturados podem retardar a progressão dos ribossomos na fita de mRNA. Além disso, estas estruturas secundárias podem ocultar sequências importantes de sinalização para ribossomos, como a sequência Shine-Dalgarno (também conhecida como RBS – Ribosome Binding Site), inibindo o início da tradução. Logo, com uma finalidade de adaptação ao estresse, as proteínas CSPs em conjunto com as RNAs helicases são expressas para tentar impedir a formação destas estruturas, consequentemente viabilizando a tradução.

Os ribossomos também podem se adaptar às condições de choque-frio. Experimentos *in vitro* mostraram que, no frio, o aparato de tradução de *E. coli* preferencialmente age sobre mRNAs de genes induzidos no frio (GIULIODORI et al., 2004). Ambos, elementos-*cis* (estruturas específicas nos mRNAs de genes induzidos no frio) e elementos-*trans* estão envolvidos nesta indução específica. Os elementos-*trans* mais bem conhecidos incluem as proteínas de choque-frio e os fatores de início da tradução (IF1 e IF3, por exemplo). Os níveis de IF1 e IF3 aumentam durante a redução de temperatura e parecem ser especialmente importantes para a tradução de genes de choque-frio (GUALERZI et al., 2003).

1.3.3 Proteínas de choque-frio – CSPs

A queda brusca de temperatura vivenciada na resposta ao choque-frio causa parada transitória no crescimento celular de muitas espécies. Weber e Marahiel (2003) demonstraram que células de *E. coli*, quando transferidas de 37 °C para 15°C, sofrem parada

no crescimento e repressão da síntese de diversas proteínas. No entanto, cerca de duas horas após o choque frio, estas mesmas células retomaram a tradução sendo que 15 proteínas apresentaram um aumento em suas sínteses. Tais proteínas foram mais tarde denominadas Proteínas de Choque Frio, codificadas por genes de choque frio. *Cold Shock Proteins* (CSPs) é uma família de proteínas altamente distribuída em *Bacteria* e que são sintetizadas com este propósito. Estas pequenas proteínas de baixo peso molecular (7 kDa) possuem um domínio altamente conservado denominado *Cold Shock Domain* (CSD), envolvido na interação com ácidos nucleicos (HORN et al., 2007). Assim, tais proteínas atuam como cicerones (*chaperones*) de RNA evitando a formação de estruturas secundárias formadas por RNAs (JIANG et al., 1997).

As CSPs mais bem estudadas são pertencentes à bactéria *Escherichia coli* que possui nove genes codificando parálogos desta família, CspA a CspI. Dentre eles, CspC é expresso constitutivamente, CspD é induzida em carência nutricional e em fase estacionária, enquanto CspA, CspB, CspE, CspG e CspI são induzidas pelo choque frio (NAKASHIMA et al., 1996; WANG; YAMANAKA; INOUE, 1999). CSPs são também encontradas em *Caulobacter crescentus* - possui quatro destas proteínas - sendo CspA e CspB induzidas pelo frio, enquanto que CspB, CspC e CspD são induzidas em fase estacionária (LANG; MARQUES, 2004). Embora estas proteínas tenham alta similaridade de sequência de aminoácidos, suas funções não são sobrepostas, já que a falta de CspA e CspB torna as células mais sensíveis ao frio (MAZZON et al., 2012), enquanto que a falta de CspC torna as células inviáveis em fase estacionária (BALHESTEROS et al., 2010).

1.4 RNAs helicases: uma visão geral

As moléculas de RNA, por serem moléculas de fita simples, podem adquirir estruturas secundárias estáveis. Em baixas temperaturas, é energeticamente favorável que estruturas resultantes de pareamentos de poucas bases tornem-se longos grampos de estrutura secundária. Desta maneira, estruturas pouco estáveis a temperatura ambiente tornam-se extremamente estáveis em baixa temperatura, dificultando a tradução, a degradação dos RNA mensageiros e alterando suas meias-vidas. A fim de não comprometer as funções

desempenhadas pelos RNAs, rearranjos nas estruturas secundárias em condições de baixa temperatura são realizados por proteínas especializadas como helicases e chaperones de RNA (KONKEL; TYLLY, 2000; SCHUMANN, 2009).

RNAs helicases são enzimas dependentes de ATP que interagem com ácidos ribonucléicos e têm como uma de suas principais funções o rompimento de ligações de hidrogênio que se formam em tais macromoléculas. Genes codificando RNA helicases são encontrados nos três domínios da vida (Bacteria, Archaea e Eukarya), assim como em vários genomas virais (ROCAK; LINDER, 2004). Estas enzimas estão associadas a diversos processos vitais envolvendo RNAs - desde a transcrição até a degradação destas moléculas, iniciação do processo de tradução, biogênese ribossomal e mRNA *splicing*. Além disso, RNAs helicases atuam em processos especializados que envolvem o metabolismo de pequenos RNAs (sRNA) e respostas a estresses abióticos (LINDER; OWTTRIM, 2009; OWTTRIM, 2006).

As helicases são classificadas em 6 superfamílias (SF1 a SF6) com base em suas sequências conservadas e elementos estruturais, sendo 5 destas superfamílias compostas por RNA helicases (SF1 a SF5). RNAs helicases pertencentes às superfamílias SF3, SF4 e SF5 são proteínas hexaméricas e apresentam somente um domínio *RecA-like*; são tipicamente codificados principalmente em genomas virais (SINGLETON et al., 2007). Superfamílias SF1 e SF2, por sua vez, apresentam proteínas não oligoméricas que contêm um núcleo bi-lobular composto por 2 domínios *RecA-like* como estrutura central; são amplamente codificados em todos os organismos vivos (Figura 4).

Figura 4 - Superfamílias de RNAs helicases, representação da estrutura protéica de cada grupo (Protein Data Bank)
 - Superfamílias 3, 4 e 5 são helicases hexaméricas de origem viral. Superfamílias 1 e 2 são compostas por proteína monoméricas e encontradas em todos os organismos. RNAs helicases pertencentes à superfamília 2 são extremamente diversas e podem ser sub-divididas em 5 diferentes famílias. Fonte: (LEITÃO et al., 2015).

A superfamília SF2, a maior e mais diversificada entre as helicases, é dividida em 5 importantes famílias de RNAs helicases: DEAD-box, DEAH-box, RIG-I like, SKI2 like e NS3/NPH II. Além destas a SF2 possui ainda outras subdivisões formadas por DNA helicases - RecQ-like, RecG-like, Rad3/XPD, Swi/Snf e enzimas de restrição do tipo I (FAIRMAN et al., 2004; MYONG et al., 2009; SEIDEL et al., 2008; ZHANG et al., 2006; ZOFALL et al., 2006;). Embora todas estas 10 famílias sejam classificadas como helicases, cada uma possui distintas atividades: algumas enzimas são capazes de separar fitas de DNA ou RNA, enquanto translocam sobre estes substratos, outras o fazem sem realizar a translocação (Tabela 2).

Tabela 2 - Membros da superfamílias SF2 e suas atividades enzimáticas

Família	Atividades
DEAD-box	Rompimento de estruturas secundárias em RNAs de fita simples e fita dupla
DEAH/RHA	Translocase em RNAs de fita simples / Rompimento de estruturas secundárias em RNAs de fita dupla
RecQ-like	Rompimento de estruturas secundárias em RNAs de fita dupla / Translocase em DNAs de fita simples
Rad3/XPD	Rompimento de estruturas secundárias em DNAs de fita dupla / Translocase em DNAs de fita simples
Swi/Snf	Translocase em DNAs de fita dupla
RIG-I-like	Translocase em RNAs de fita dupla
Enzima de restrição do Tipo I	Translocase em DNAs de fita dupla
Ski2-like	Translocase em RNAs de fita simples / Rompimento de estruturas secundárias em RNAs de fita dupla
RecG-like	Translocase em DNAs de fita dupla / Rompimento de estruturas secundárias em DNAs
NS3/NPH-II	Translocase em RNAs de fita simples / Rompimento de estruturas secundárias em RNAs de fita dupla

Fonte: Adaptado de (BYRD, 2013)

Embora todos os membros da superfamília SF2 possuam atividade de ATPse (JANKOWSKY, 2007), a hidrólise do ATP não é determinante para a abertura das fitas dos ácidos nucleicos ou rompimento de estruturas secundárias. Membros da superfamília SF2 estão envolvidos em vários processos celulares, entre eles: a transcrição, o reparo de DNA,

o rearranjo da cromatina (ALEXANDRA, 2003; BENNETT, 2004; FULLER-PACE, 2008) e todos os aspectos do metabolismo de RNAs (JANKOWSKY, 2007). Uma vez que estas enzimas possuem um importante papel em diversos processos celulares, envolvendo o metabolismo de RNA ou DNA, qualquer defeito se torna grave e muitas vezes associado com uma variedade de doenças, incluindo a predisposição ao câncer (ELLIS, 1997; VAN BRABANT, 2000).

Coletivamente, todos os membros da família SF2 são referenciados como DexH/D helicases, embora as estruturas, os mecanismos e funções biológicas dos membros de cada família possam variar expressivamente. Dentre todas elas, a família DEAD-box merece destaque por apresentar-se como a maior e mais bem estudada família de RNAs helicases (BYRD, 2013).

1.5 RNAs helicases da família DEAD-box

Como mencionado, a família DEAD-box é a maior da superfamília SF2; é conservada desde bactérias a seres humanos (JANKOWSKY, 2007). Estas proteínas são importantes em todos os aspectos do metabolismo de RNA, incluindo os processos de transcrição, o *splicing* e seu transporte, a biogênese do ribossomo, a tradução e a sua degradação (CORDIN, 2006; HILBERT, 2009; JANKOWSKY, 2007). Estas enzimas são nomeadas pela sequência conservada de aminoácidos em seu *Walker B motif*, ou motivo II (Aspartato-Glutamato-Alanina-Aspartato), que juntos formam “D-E-A-D”.

Estas enzimas agem exclusivamente em RNAs - podendo ser RNAs de fitas simples, fita dupla ou RNAs estruturados - em uma forma dependente de ATP; e não realizam o processo de translocação sobre o substrato. Ao invés disso, elas manipulam RNAs estruturados rompendo, localizadamente, as suas estruturas secundárias e terciárias (HILBERT, 2009). O interessante é que a ligação do ATP, mas não sua hidrólise, se faz necessário para o rompimento de estruturas secundárias no substrato (CHEN, 2008; LIU, 2008). Os autores sugerem que a hidrólise de ATP se torna necessária para a reciclagem da proteína, não para a separação das fitas de RNAs. Quando ligada à molécula de ATP, a proteína possui uma elevada afinidade a molécula de RNA; mas o ADP e as enzimas livres

por si só não possuem tal afinidade (CORDIN, 2004; LORSCH, 1998). O que resulta na liberação do RNA logo após a hidrólise de ATP. A figura 5 ilustra este mecanismo.

Figura 5 – Proposta do mecanismo de ação das RNAs helicases da família DEAD-box – RNAs helicases se ligam diretamente na região duplex de RNA, auxiliado por regiões de RNA fita simples. O exato mecanismo no qual a proteína se liga ao RNA ainda não está claro; embora possa ocorrer nas extremidades ou no interior da molécula de RNA. Uma vez ligada, a proteína pode ou não servir como um centro de nucleação para proteínas adicionais, criando um complexo ribonucleoprotéico. A ligação da proteína abre a dupla fita de RNA em um local específico; este passo requer ATP, mas não necessariamente sua hidrólise. Esta abertura localizada reduz o número de bases pareadas na fita dupla de RNA, e o restante se dissocia sem qualquer ação da enzima. A hidrólise efetiva do ATP possui pouco efeito no rompimento das ligação de hidrogênio entre as bases do RNA; a separação das fitas ocorre enquanto o ATP estiver ligado ao sítio ativo da enzima, independente se ele foi hidrolizado ou não. A hidrólise se faz importante na geração de ADP, pois ajuda desencadear reações futuras. A geração do ADP promove a liberação da proteína do RNA. Fonte: (LINDER, 2011).

1.5.1 Estrutura protéica

Um grande número de estudos estruturais demonstrou que proteínas pertencentes à família DEAD-box possuem um núcleo altamente conservado, possuindo sítios de ligação tanto a RNA quanto a ATP (CARUTHERS, 2002; FAIRMAN-WILLIAMS, 2010; SINGLETON, 2007). Como já mencionado, este núcleo é compreendido por dois domínios conservados muito semelhantes à proteína recombinase A (RecA). O núcleo é também composto por 12 motivos altamente conservados, sendo os motivos Q, I, Ia, Ib, Ic, II (DEAD) e III localizados no domínio 1, e os motivos IV, IVa, V, Va e VI localizados no domínio 2 do núcleo da RNA helicase (Figura 6). Alguns destes motivos são conservados em toda a superfamília SF2, enquanto outros são encontrados apenas na família DEAD-box. Uma série de trabalhos estruturais e bioquímicos das proteínas da família DEAD-box definiram os resíduos e motivos envolvidos com a ligação de ATP e RNA. Todos estes estudos mostraram que a proteína deve estar em uma conformação fechada a fim de se ligar ao ATP e aos RNAs alvos.

Figura 6 – Estrutura do núcleo das proteínas da família DEAD-box e suas interações com substratos – a) Seu núcleo é composto por 2 domínios semelhantes a recombinase A (domínio 1 e 2). Os 12 motivos encontrados no núcleo destas proteínas são mostrados com um código de cores correspondente à função primária do domínio (vermelho: motivos conservados de ligação e hidrólise do ATP; azul: motivos de ligação a molécula de RNA; amarelo: motivos responsáveis pela comunicação entre ATP e RNA). b) Estrutura cristalográfica de uma RNA helicase de *Drosophila melanogaster* em interação com RNA fita simples e ATP. c) Sequências conservadas em cada um dos 12 motivos encontrados em proteínas DEAD-box. Fonte: (LINDER, 2011).

1.5.2 Principais funções e processos envolvidos

RNAs helicases da família DEAD-box estão envolvidas em diferentes processos celulares em Eucariotos. No núcleo, elas podem participar na biogênese ribossomal, no processo de transcrição e no processo de *splicing* do pre-RNA mensageiro. No citoplasma, por sua vez, estas proteínas podem estar envolvidas no processamento de microRNAs e no processo de tradução. Já na interface entre o núcleo e o citoplasma, estas enzimas são

importantes principalmente no transporte de RNAs mensageiros, diretamente do núcleo para o citoplasma.

Uma das funções mais exploradas e muito encontrada na literatura é a participação destas proteínas no início do processo de tradução em eucariotos. A molécula eIF4A, um fator de início da tradução em eucariotos, é também considerada uma proteína DEAD-box. Juntamente com vários outros fatores de iniciação, eIF4A ajuda no recrutamento da subunidade menor do ribossomo ao CAP 5', permitindo o reconhecimento do códon de início da tradução de determinados genes. De um modo geral, este eIF4A é responsável pelo rompimento de estruturas secundárias na região 5' UTR de mRNAs, permitindo a ligação de todo o complexo de início da tradução ao mRNA (SVITKIN, 2001).

As proteínas DEAD-box mais bem estudadas em bactérias correspondem às RNA helicases de *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. *E. coli* possui cinco proteínas DEAD-box (DeaD/CsdA; RhlE; SrmB; DbpA e RhlB) que participam de importantes processos celulares que envolvem RNAs, como a montagem ribossômica, a degradação de mRNAs e a tradução (CHAROLLAIS et al., 2003; KARGINOV et al., 2004; MOLL et al., 2002; PY et al., 1996; RAMÍREZ et al., 2011). *B. subtilis*, por sua vez, possui quatro proteínas desta família (DeaD/YxiN; CshA; CshB e YfmL) envolvidas principalmente na biogênese do ribossomo (Tabela 3).

Tabela 3 - Proteínas DEAD-box em *E. coli* e *B. subtilis*

Proteína	Tamanho*	Função
<i>E.coli</i>		
DeaD (CsdA)	629	Montagem ribossômica/degradação de mRNA; sensibilidade ao frio. Moll et al. (2002)
DbpA (RhlC)	457	Montagem ribossômica. Fuller-Pace (1993)
RhlB	421	Degradação de mRNA. Py et al. (1996)
SrmB (RhlA)	444	Montagem ribossômica. Charollais (2003)
RhlE	454	Montagem ribossômica. Jain (2008)

<u><i>B.subtilis</i></u>		
CshA (YdbR)	511	Montagem ribossômica. Ando (2006)
Dead (YxiN)	479	Montagem ribossômica. Kossen (1999)
YfmL	376	Desconhecida
CshB (YqfR)	438	Montagem ribossômica. Hunger et al. (2006)

* Tamanho em aminoácidos. Fonte: Adaptado de (RAMÍREZ et al., 2011).

1.5.2.1 Degradação de RNAs

Em Archaea e Eukarya, a degradação de moléculas de RNAs é realizada pelo exossomo, um complexo protéico que possui similaridade estrutural e de sequência a polinucleotídeo fosforilase bacteriana (PNPase). Já em bactérias a degradação e processamento de RNAs são realizados pelo degradossomo de RNA (NEWMAN et al., 2011). Em *E. coli* e várias outras bactérias, a principal enzima deste complexo é formado pela endorribonuclease RNase E, enzima capaz de ancorar outras proteínas no complexo de degradossomo. A composição protéica do degradossomo difere entre espécies bacterianas, sendo que em alguns casos este complexo inclui enzimas como exoribonucleases e enzimas metabólicas, mas na maioria dos casos apresentam uma RNA helicase da família DEAD-box que se associa diretamente a uma endorribonuclease (HARDWICK; LUISI, 2013).

Diferente das demais proteínas DEAD-box, RhlB não apresenta atividades de ATPase e RNA helicase por si própria, mas tais atividades podem ser estimuladas pela interação com a extremidade carboxi-terminal da RNase E. *In vivo*, esta interação ocorre na formação do degradossomo. Em *E. coli*, este complexo é composto por uma RNase E, uma PNPase, uma RNA helicase da família DEAD-box (normalmente RhlB) e uma enzima glicolítica, a enolase (CARPOUSIS, 2007; MICZAK et al., 1996). A enzima RNase E possui um domínio catalítico no amino-terminal, e uma longa extensão carboxi-terminal capaz de recrutar outras enzimas (Figura 7). Os locais de reconhecimento para estas proteínas são pequenos

segmentos de 20 a 40 aminoácidos que se encontram dentro do domínio C-terminal da RNase E.

Figura 7 – Degradossomo de *E. coli* - RNase E com seus sítios de ligação para Rna helicase, enolase e PNPase. Fonte: (HARDWICK; LUISI, 2013).

A interação entre RhlB e RNase E estimula a atividade helicase de RhlB (CHANDRAN, 2007; VANZO, 1998), no entanto, não existem atualmente dados estruturais que ajudam a explicar como isso ocorre. A sua identificação no degradossomo de RNA levou a proposta do seu papel em ajudar no processamento de RNAs. Como RNase E e PNPase clivam especificamente substratos de cadeia simples, é pertinente a idéia de que as atividades de rompimento de estruturas secundárias de RhlB sejam necessários para melhorar a eficiência no processo de degradação dos mRNAs. De fato, a atividade de ATPase de RhlB demonstrou ser necessária para a degradação de RNAs com um elemento repetitivo capaz de formar estruturas em forma de haste-alças (CHANDRAN, 2007; COBURN, 1999).

Estudos com diferentes fragmentos de RNase E em *E. coli* revelam que a estimulação da atividade de helicase requer a presença de uma região rica em arginina presente na molécula de RNase E (resíduos 789-820), o que contribui para a ligação do degradossomo ao RNA, facilitando, assim, a interação entre o substrato (RNA) com o núcleo das helicases (HARDWICK; LUISI, 2013).

O modelo propõe que estruturas secundárias presentes nos RNAs são ligadas ao degradossomo cooperativamente pelos domínios de ligação ao RNA (RBD e AR2) e por RhlB. O ATP é necessário para a interação entre RhlB e o RNA, mas sua hidrólise é dispensável para o papel da enzima no rompimento de estruturas secundárias no RNA. A liberação de ADP favorece a liberação do RNA, agora em fita simples, por RhlB; este por sua vez pode ser degradado eficientemente por ambos, RNase E e PNPase (HARDWICK; LUISI, 2013).

Para *Caulobacter crescentus* foi descrito um degradossomo similar ao encontrado em *E. coli*. Foram identificados uma RNase E em interação com uma RNA helicase da família DEAD-box (RhlB, codificada pelo gene CC1847), uma PNPase e, diferentemente do descrito para *E. coli*, uma enzima do ciclo de Krebs, aconitase (HARDWICK; LUISI, 2013). Esta associação de uma enzima do Ciclo de Krebs com o degradossomo destaca as associações físicas entre as enzimas de degradação de RNA e o metabolismo central.

Em um trabalho recente, Voss e Hardwick (2014) demonstraram a existência de um componente adicional ao degradossomo de *C. crescentus*, uma exoribonuclease Rnase D; além de identificar seu sítio de ligação à extremidade carboxi-terminal de Rnase E. RNase D é classificada como membro da família DEDD de exoribonucleases, juntamente com RNase T (ZUO et al., 2001). RNase D de *E. coli* desempenha um papel importante no processamento de diferentes tipos de RNAs, incluindo tRNAs, RNAs ribossomais e pequenos RNAs (CUDNY, 1980; KELLY, 1992). Estudos a fim de elucidar o seu papel no degradossomo de *C. crescentus* são necessários, mas sabe-se que RNase D possui um homólogo em eucariotos (Rrp6), componente do exossomo citoplasmático, que auxilia no processamento e degradação de RNAs (WASMUTH, 2014).

Neste mesmo trabalho, os pesquisadores também descobriram que a RNA helicase RhlB, presente no degradossomo de *C. crescentus*, interage diretamente com o domínio catalítico de RNase E (extremidade N-terminal), diferentemente do que foi demonstrado para *E. coli* (Figura 8). Tal interação entre o domínio catalítico de RNase E e uma RNA helicase nunca foi demonstrada anteriormente para qualquer organismo; e pode-se dizer que seja uma adaptação evolutiva no intuito de aproximar o domínio catalítico de Rnase E ao substrato recém modificado pela RNA helicase.

Figura 8 – Esquema representativo do complexo de degradação de RNAs em *Caulobacter crescentus* – O domínio N-terminal de Rnase E é mostrado no formato de um retângulo azul, contendo o sítio de ligação para RhlB e o local de inserção do domínio S1. A extremidade C-terminal é mostrada como uma linha azul, contendo sítios de interação para aconitase, RNase D and PNPase. Fonte: (VOSS; HARDWICK, 2014).

1.5.2.2 Biogênese Ribossomal

A síntese de proteínas é realizada pelo ribossomo, um complexo ribonucleoprotéico contendo duas subunidades ribossomais 30S e 50S, em bactérias; juntas estas subunidades formam o ribossomo maduro procariótico - 70S. Cada subunidade ribossomal é composta por RNAs e proteínas ribossomais específicas. Em *E. coli*, a subunidade 30S contém o rRNA 16S e 21 proteínas ribossomais, enquanto que a subunidade 50S contém os rRNAs 5S e 23S, além de 31 proteínas. O ribossomo é uma estrutura dinâmica, cujas subunidades associam-se e dissociam-se alternadamente e também interagem com várias outras proteínas (MADIGAN et al., 2012).

A estrutura correta e funcional do ribossomo é alcançada por um processo complexo e ordenado que começa com a ligação das primeiras proteínas ribossomais (ligantes iniciais) nas extremidades 5' de rRNAs recém sintetizados, levando a conformações que criam estruturas secundárias e terciárias que funcionam como sítios de ligação para proteínas ribossomais subsequentes. No entanto, este processo em bactérias não possui uma linearidade podendo utilizar-se de rotas alternativas de montagem ribossomal (MULDER et al., 2010;

SHAJANI; SYKES; WILLIAMSON, 2011; SIUZDAK; TALKINGTON; WILLIAMSON, 2005).

Durante o processo de montagem dos ribossomos as proteínas ribossomais estão sujeitas a alterações e os pré-rRNAs passam por uma série de processos de maturação e modificação que podem ocorrer até o estágio final deste processo (SRIVASTAVA; SCHLESSINGER, 1988). Experimentos mostraram que a montagem do ribossomo bacteriano pode ser reconstituída *in vitro*, a partir de rRNAs e proteínas ribossomais purificados. No entanto, é um processo bastante lento nesta condição, indicando que cofatores são necessários para uma montagem rápida e eficaz *in vivo* (NIERHAUS, 1991). De fato, diferentes tipos de cofatores já foram identificados, como *chaperones*, GTPase, factores de maturação e RNAs helicases da família DEAD-box (BIZEBARD; DREYFUS; IOST, 2013; BRITTON, 2009; NIERHAUS; WILSON, 2007; SHAJANI, SYKES; WILLIAMSON, 2011).

As funções de RNAs helicases na biogênese ribossomal bacteriana foram principalmente estudadas em *E. coli*. Como já mencionado, entre as cinco proteínas DEAD-box codificadas no genoma de *E. coli*, quatro delas estão ligadas a biogênese do ribossomo (Figura 9). E no caso de *B. subtilis*, estudos indicam que todas as quatro proteínas DEAD-box estão envolvidos neste processo (LEHNIK-HABRINK et al., 2013). Em *Listeria monocytogenes*, a proteína Lmo1722, um ortólogo de YfmL em *B. subtilis*, foi demonstrada estar associada as partículas 50S e 70S; e a deleção do seu gene afeta consideravelmente a biogênese ribossomal (NETTERLING et al., 2012). Finalmente, para *C. crescentus* ainda não foi descrito nenhum trabalho relatando o envolvimento de RNAs helicases da família DEAD-box na biogênese ribossomal.

Figura 9 – Estrutura da subunidade ribossomal 50S de *E. coli* - Quatro proteínas DEAD-box estão envolvidas no processo de montagem ribossomal. A figura ilustra os alvos para RNA helicases no ribossomo maduro. SrmB se encontra ligado à extremidade 5' do rRNA 23S e forma um complexo com as proteínas ribossomais L4 e L24, destacadas em amarelo e laranja, respectivamente. A proteína ribossomal L13 que se acumula no mutante para o gene *srmB* é indicada em azul. A hélice 92 presente no rRNA 23S que estimula a atividade de DbpA também é indicada (em verde). Para CsdA e RhlE, os alvos não foram identificados. Fonte: (REDDER; LINDER, 2015).

A função exata das proteínas DEAD-box envolvidas na biogênese ribossomal ainda é pouco compreendida. A dificuldade consiste na complexidade intrínseca do processo, juntamente com o fato de que estas proteínas poderiam realizar diversas atividades durante a montagem ribossômica, tais como atividades de helicase, *chaperone* ou atividade de remodelação (entre RNAs e proteínas).

1.5.2.3 Iniciação da Tradução

Assim como vimos para Eucariotos, a eficiência do início da tradução em bactérias é também influenciada pela acessibilidade da sequência Shine Dalgarno (SD). Uma evidência indireta do papel de proteínas DEAD-box no processo de tradução em bactérias veio através de experimentos de tradução *in vitro* utilizando-se mRNAs proveniente do bacteriófago MS2, na presença ou na ausência de CsdA de *E. coli* (LU; AOKI; GANOZA, 1999). Enquanto RNAs artificiais desprovidos de estruturas secundárias foram traduzidos de forma eficiente

na ausência de CsdA, mRNAs contendo tais estruturas exigiram CsdA para uma eficiente tradução. Butland et al. (2007) foram capazes de mostrar que a 25°C os mRNAs contendo estruturas secundárias foram traduzidos de forma mais eficiente quando CsdA era superexpresso. Além disso, a 37 °C, a exigência por CsdA diminui drasticamente, demonstrando a importância do papel de CsdA em baixas condições de temperatura.

Em *E. coli*, foi demonstrado que a tradução de RpoS em baixas temperaturas requer um pequeno RNA (DsrA), uma *chaperone* de RNA (Hfq) e uma RNA helicase (CsdA) (RESCH et al., 2010). A regulação ocorre em nível traducional por liberar a sequência SD que está oclusa por estruturas secundárias. DsrA é induzido em baixas temperaturas, sendo este capaz de hibridizar com o mRNA de RpoS - auxiliado por Hfq - para liberar a sequência Shine Dalgarno do gene *rpoS*. Já era sabido que Hfq em conjunto com DsrA é essencial para a desrepressão de RpoS, no entanto, um recente trabalho revelou que o papel de DsrA depende não somente de Hfq, mas também da ação de CsdA; CsdA permite a clivagem de RNAs duplas fitas pela RNase III, liberando a sequência Shine Dalgarno para o processo de tradução. Os autores ainda sugerem que CsdA seja importante na abertura de estruturas secundárias, o que permite a eficiente ligação do pequeno RNA regulatório, DsrA (RESCH et al., 2010).

Em outro trabalho conduzido por VAKULSKAS, foi demonstrado que a tradução de UvrY é regulada por uma grande estrutura secundária presente na região 5'UTR do gene. Na ausência de CsdA, a tradução de UvrY é diminuída, mas a ausência da RNA helicase pode ser superado por mutações que afetam esta estrutura secundária (VAKULSKAS et al., 2014).

1.5.2.4 Resposta bacteriana ao choque-frio

A expressão de RNAs helicases é frequentemente alterada durante uma resposta celular a diferentes estresses. No frio, especificamente, o aumento da expressão de RNAs helicases tem sido observada em uma variedade de bactérias, incluindo espécies psicrotolerantes e Archaeas (Tabela 4). Esta adaptação ao frio está intimamente relacionada a produção de degradossomos e ribossomos adaptados ao choque frio (OWTTRIM, 2013).

Tabela 4 - Principais funções desempenhadas por RNA helicases de procariotos em resposta ao choque frio

RNA helicase	Organismo (Bactéria)	Função celular em baixas temperaturas
DeaD (CsdA)	Vários	Formação de ribossomos adaptados ao frio; substitui RhlB no degradossomo. Charollais et al. (2004); Jagessar et al. (2010)
DeaD	<i>Psychrobacter arcticus</i>	DeaD substitui RhlB no degradossomo durante choque frio. Bergholz et al. (2009)
RhlE	Vários	Composição do Degradossomo. Jagessar et al., 2010; Jain et al. (2008)
DeaD	<i>Shewanella piezotolerans</i>	<i>Expressão de deaD</i> aumenta 23 vezes a 0°C. Li et al (2008)
SrmB	<i>E. coli</i>	Montagem ribossomal. Charollais et al. (2003)
SCD_00930	<i>Sulfuricella denitrificans skB26</i>	Homólogo de RhlE; sua expressão aumenta a 4°C. Watanabe et al. (2012)
DeaD	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Sua inativação reduz crescimento em baixas temperaturas. Palonen et al. (2012)

Fonte: Adaptado de (OWTTRIM, 2013)

A célula bacteriana é capaz de produzir um degradossomo adaptado ao choque frio, promovendo a degradação de RNAs específicos cujas estruturas secundárias são termodinamicamente estabilizadas nesta condição (PRUD'HOMME-GÉNÉREUX et al., 2004). Em *E.coli*, RhlB exibe uma baixa atividade de rompimento de estruturas secundárias nos RNAs, podendo ser funcionalmente substituída por RhlE (*in vitro*) ou DeaD (*in vitro* e *in vivo*) em condições de baixas temperaturas (KHEMICI et al., 2008; PRUD'HOMME-GÉNÉREUX et al., 2004). Além disso, análises proteômicas confirmaram a presença de DeaD e a ausência de RhlB em degradossomos purificados de células de *E. coli* a 10 °C, confirmando que a composição do degradossomo pode variar em resposta a baixas temperaturas (REGONESI et al., 2006).

Da mesma forma, a célula pode produzir ribossomos adaptados. Em *E. coli*, todos os genes que codificam para RNAs helicases, e que estão envolvidos na biogênese do ribossomo, não são essenciais em condições normais de crescimento, mas possuem um papel

essencial em baixas temperaturas. Nesta condição, defeitos na montagem do ribossomo são criados por um evento termo-induzido envolvendo a estabilização de estruturas secundárias nos RNAs, as quais podem ser resolvidas pela ação de RNAs helicases específicas. A 37 °C, RhlE é responsável por iniciar o processo de montagem ribossomal e é seguido pela ação de SrmB; já a uma temperatura de 15°C, RhlE trabalha de uma maneira dependente de DeaD (JAIN et al., 2008). Assim, a célula é capaz de produzir ribossomos ativos e adaptados ao choque-frio.

A associação de uma maior expressão de RNAs helicases em resposta a baixas temperaturas não é baseada na temperatura absoluta, mas relacionada a temperatura ótima de crescimento do organismo. A expressão de uma RNA helicase homóloga a DeaD em *Methanococcoides burtonii* aumenta quando sua temperatura de crescimento diminui de 23°C para 4°C (LIM, 2000). Já para o hipertermófilo *Methanococcus jannaschii*, esta expressão aumenta quando a temperatura de crescimento cai de 85°C para 60°C (BOONYARATANAKORNKIT, 2005; SHIMADA, 2009).

1.5.2.5 Outras funções recém-descobertas

Staphylococcus aureus vem sendo considerada uma bactéria preocupante em ambientes hospitalares, principalmente pela sua capacidade em formar biofilmes em catéteres e próteses; biofilmes conferem uma grande resistência à bactéria, tanto ao sistema imunológico quanto ao tratamento com antibióticos. Este estado persistente baseia-se na expressão de proteínas da superfície celular que permitem sua aderência nos mais variados ambientes, e que contrasta com seu estado de dispersão no qual depende da secreção de proteases e hemolisinas. A decisão celular de formar biofilme ou não, é mediada principalmente pelo sistema sensorial de densidade celular em *S. aureus*, codificado por *agr*. O fato interessante é que a inativação de CshA, uma proteína DEAD-box presente em *S. aureus*, desregula a formação do biofilme bacteriano através da estabilidade do mRNA de *agr* (OUN; LINDER, 2013). Na linhagem selvagem, o mRNA *agrBDCA* é produzido; na presença de CshA a hipótese é de que o degradossomo é capaz de clivar grande parte deste mRNA. Desta forma, o sistema *quorum sensing* está apto a funcionar corretamente e apenas pequenas quantidades de RNAIII é produzido; resultando em baixa estimulação de hemólise

e na formação normal de biofilme. Por outro lado, na ausência de CshA, os pesquisadores propõem que o degradossomo é incapaz de degradar o mRNA *agrBDCA* corretamente, levando a um nível muito mais elevado de expressão das proteínas Agr – o que resulta em níveis mais elevados de RNAIII. Este, por sua vez, estimula fortemente a produção de hemolisinas e proteases extracelulares, além de inibir a produção do biofilme e seus componentes.

Em *Xanthomonas citri* as proteínas DEAD-box também foram estudadas. Granato et al. (2016) estudaram o papel da RNA helicase codificada pelo gene *hrpB* na formação de biofilme, na motilidade celular, na virulência de *X. citri* e no crescimento bacteriano *in planta*. Mutações no gene *hrpB* resultou em uma redução de biofilmes em superfícies abióticas e em folhas do hospedeiro. Além disso, $\Delta hrpB$ apresentou um aumento na motilidade celular em meios sólidos de cultura. Os pesquisadores relataram ainda um atraso no aparecimento dos sintomas da doença do cancro cítrico quando a linhagem de *X. citri*, mutante para o gene *hrpB*, foi inoculada sobre as folhas do hospedeiro; demonstrando que *hrpB* também possui um papel importante na virulência do patógeno. Ademais, análise por RT-PCR indicou que na ausência deste gene houve uma redução na expressão de 3 genes que codificam para pili do tipo IV.

Outra recente publicação demonstrou que DeaD, uma proteína DEAD-box encontrada em *Pseudomonas aeruginosa*, está envolvida na expressão do Sistema de Secreção do tipo III (T3SS), importante fator de virulência neste patógeno. ExsA é o principal regulador de transcrição do T3SS e sua expressão, síntese e atividade é altamente regulada por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos. Na tentativa de identificar fatores extrínsecos que poderiam regular ExsA, os pesquisadores descobriram que em mutantes para o gene PA2840, responsável por codificar DeaD, ocorre uma diminuição drástica na expressão de T3SS, o que reduz, consequentemente, a citotoxicidade de *P. aeruginosa* (INTILE, 2015).

1.5.3 Proteínas DEAD-box em *Caulobacter crescentus*

C. crescentus possui quatro representantes de RNA helicases da família DEAD-box, codificados pelos genes CC2040, CC1478, CC1847 e CC0835 (NIERMAN et al., 2001). O gene CC2040 possui em sua região regulatória um sítio de ligação do repressor LexA, indicando que pode ter papel no reparo de lesões no DNA Rocha et al. (2008); a proteína RhlB codificada por CC1847 está associada ao degradossomo de RNA a 30 °C Hardwick et al. (2010) e o gene CC1478 é anotado como uma DEAD-box helicase *like protein*. Por sua vez, o papel da RNA helicase codificada pelo gene CC0835 ainda é totalmente desconhecido.

Em trabalho anterior de nosso grupo, Mazzon et al. (2008) demonstraram que a DEAD-box RNA helicase codificada pelo gene *rhlE* é extremamente importante para a sobrevivência microbiana ao congelamento; os pesquisadores construíram uma biblioteca de mutantes por transposição permitindo identificar clones sensíveis ao congelamento a -80°C, dos quais um deles mostrou interrupção neste gene. Adicionalmente, outro trabalho mostrou que o fenótipo mostrado pelo mutante do gene *rhlE* indica que este gene tem papel importante para o *fitness* celular mesmo à temperatura ótima de crescimento (CHRISTEN et al., 2011). Como o papel desta enzima no metabolismo de *C. crescentus* ainda não é conhecido, a compreensão dos sinais regulatórios que determinam sua expressão e dos RNAs específicos que interagem com ela pode ser muito elucidativo para seu papel celular. Assim, este trabalho propõe determinar as bases da regulação do gene *rhlE*, tanto em resposta a estresses como durante o ciclo celular de *C. crescentus*, e identificar RNA ligantes específicos desta proteína.

5 CONCLUSÕES

Utilizando-se a linhagem FLAG-RhlE construída neste trabalho foi possível analisar o perfil da proteína frente ao choque frio, em fase estacionária de crescimento, durante o ciclo celular de *C. crescentus* e, sob diferentes condições de estresse. Com os resultados de Western blotting obtidos, podemos concluir que há uma indução da proteína RhlE em baixa temperatura, provavelmente porque nesta condição há uma maior tendência em formar estruturas secundárias nas moléculas de RNA. Vimos também que a proteína não varia em fase estacionária de crescimento, por até 48 horas de análise, e durante as diferentes fases do ciclo celular de *C. crescentus*. Além disso, RhlE se mostrou levemente induzida na presença de diferentes agentes, como NaCl (85 mM) e Sacarose (150 mM), agentes muitas vezes capazes de gerar osmólitos que, em muitos casos, estabilizam estruturas secundárias e terciárias nas moléculas de RNA; situação em que as RNAs helicases podem exercer suas funções.

A mesma linhagem FLAG-RhlE foi também utilizada para o estudo da estabilidade da proteína e seu possível envolvimento com a biogênese do ribossomo. Vimos que em baixas condições de temperatura, existe uma estabilização de RhlE, o que não ocorre em uma condição normal de temperatura a 30 °C, na qual percebemos a degradação mais rápida da mesma. Também vimos que RhlE foi detectada em algumas frações ribossomais, o que deve ser confirmado por repetições experimentais.

Analizando-se o padrão de expressão de *rhIE*, podemos tirar diferentes conclusões acerca dos vários resultados. Um resultado interessante é obtido nos ensaios de comparação entre as fusões de transcrição construídas na presença ou na ausência da região 5'-UTR. A deleção da região 5'-UTR causa perda da expressão do gene *rhIE* na condição de choque frio em fase logarítmica ou estacionária de crescimento, indicando que esta seja uma região importante para a indução RNA helicase RhlE em baixa temperatura. Através de fusões de tradução ao gene *lacZ* mostramos que o gene *rhIE* sofre uma regulação pós-transcricional dependente de sua região 5'-UTR, apresentando uma indução em baixa temperatura.

Pela análise transcriptômica global de ambas as linhagens NA1000 e CC0835::Tn5 após choque-frio podemos perceber que há um grande número de genes diferencialmente

expressos que participam de importantes processos celulares, como o transporte transmembrana, resposta a estímulos e regulação da transcrição.

Finalmente, utilizando-se a técnica de HITS-CLIP fomos capazes de identificar possíveis mRNAs ligantes de RhIE, dado muito importante para desvendarmos o papel celular desta proteína na estabilização de mRNAs celulares.

REFERÊNCIAS*

- ABYZOV, S. S.; MITSKEVICH, I. N.; POGLAZOVA, M. N.; BARKOV, N. I.; LIPENKOV, V. Y.; BOBIN, N. E.; KOUDRYASHOV, B. B.; PASHKEVICH, V. M.; IVANOV, M. V. Microflora in the basal strata at Antarctic ice core above the Vostok lake. **Adv. Space Res.**, v. 28, n. 4, p. 701-706, 2001.
- AGUILAR, P. S., HERNANDEZ-ARRIAGA, A. M.; CYBULSKI, L. E.; ERAZO, A. C.; DE MENDOZA, D. Molecular basis of thermosensing: a twocomponent signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. **EMBO J.**, v. 20, p. 1681–1691, 2001.
- ALBANESI, D.; MANSILLA, M. C.; DE MENDOZA, D. The membrane fluidity sensor DesK of *Bacillus subtilis* controls the signal decay of its cognate response regulator. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 2655–2663, 2004.
- ALEXANDRA, L.; KADONAGA, J. T. Chromatin remodeling by ATP-dependent molecular machines. **Bioessays**, v. 25, p. 1192–1200, 2003.
- ALLEY, M. R.; GOMES, S. L.; ALEXANDER, W.; SHAPIRO, L. Genetic analysis of a temporally transcribed chemotaxis gene cluster in *Caulobacter crescentus*. **Genetics**, v. 129, n.2, p. 333-341, 1991.
- ANDO, Y.; NAKAMURA, K. *Bacillus subtilis* DEAD protein YdbR possesses ATPase, RNA binding, and RNA unwinding activities. Biosci. Biotechnol. **Biochem.**, v. 70, p. 1606-1615, 2006.
- ATLUNG, T.; HANSEN, F. G. Low-temperature-induced DnaA protein synthesis does not change initiation mass in *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 5557–5562, 1999.
- BAE, W.; XIA, B.; INOUE, M.; SEVERINOV, K. *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. **Proc. Nat.l Acad. Sci. U S A.**, v. 97, p. 7784–7789, 2000.
- BALHESTEROS, H.; MAZZON, R. R.; DA SILVA, C. A.; LANG, E. A.; MARQUES, M. V. CspC and CspD are essential for *Caulobacter crescentus* stationary phase survival. **Arch. Micobiol.**, v. 192, n. 9, p. 747-758, 2010.
- BARRIA, C.; MALECKI, M.; ARRAIANO, C. M.; Bacterial adaption to cold. **Microbiol. Rev.**, v. 159, p. 2437-2443, 2013.

*De acordo com:

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

BENNETT, R. J.; KECK, J. L. Structure and Function of RecQ DNA Helicases. **Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.**, v. 39, p. 79–97, 2004.

BERGHOLZ P. W, BAKERMANS. C; TIEDJE, J. M. *Psychrobacter arcticus* 273-4 uses resource efficiency and molecular motion adaptations for subzero temperature growth. **J. Bacteriol.**, v. 191, p. 2340-52, 2009.

BOONYARATANAKORNKIT, B. B, SIMPSON, A. J, WHITEHEAD, T. A, FRASER, C. M, EL-SAYED, N. M, CLARK, D. S. Transcriptional profiling of the hyperthermophilic methanarchaeon *Methanococcus jannaschii* in response to lethal heat and non-lethal cold shock. **Environ. Microbiol.**, v. 7, p. 789-97, 2005.

BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), National Center for Biotechnology Information. Software disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 10 Jun. 2014.

BOUTTE, C. C.; HENRY, J. T.; CROSSON, S.; ppGpp and polyphosphate modulate cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. **J. of Bacteriol.**, v. 194, n. 1, p. 28-35, 2012.

BOUTTE, C. C.; CROSSON, S. The complex logic of stringent response regulation in *Caulobacter crescentus*: starvation signaling in an oligotrophic environment. **Mol. Microbiol.**, v. 80, n. 3, p. 695-714, 2011.

BRESOLIN, G.; NEUHAUS, K.; SCHERER, S.; FUCHS, T. M. Transcriptional analysis of long-term adaptation of *Yersinia enterocolitica* to low-temperature growth. **J. Bacteriol.**, v. 188, p. 2945–2958, 2006.

BRITTON, R. A. Role of GTPases in bacterial ribosome assembly. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.63, p. 155–76, 2009.

BUTLAND, G.; KROGAN, N. J.; XU, J. Investigating the in vivo activity of the DeaD protein using protein–protein interactions and the translational activity of structured chloramphenicol acetyltransferase mRNAs. **J. Cell Biochem.**, v.100, p. 642–652, 2007.

BYRD, A. K.; RANEY, K. D. Superfamily 2 helicases. *Front. Biosci.*, v. 17, p. 2070-2088, 2013.

BYRNE, G. A., RUSSELL, D. A., CHEN, X.; MEIJER, W. G. Transcriptional regulation of the virR operon of the intracellular pathogen *Rhodococcus equi*. **J. Bacteriol.**, 189, 5082–5089, 2007.

CAIRRÃO, F., CRUZ, A., MORI, H.; ARRAIANO, C. M. Cold shock induction of RNase R and its role in the maturation of the quality control mediator SsrA/tmRNA. **Mol Microbiol.**, v. 50, p. 1349–1360, 2003.

CAO, H., KRISHNAN, G., GOUMNEROV, B., TSONGALIS, J., TOMPKINS, R; RAHME, L. G. A quorum sensing-associated virulence gene of *Pseudomonas aeruginosa*

encodes a LysR-like transcription regulator with a unique self-regulatory mechanism. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 98, p. 14613–14618, 2001.

CAO-HOANG, L.; DUMONT, F.; MARECHAL, P. A.; GERVAIS, P. Inactivation of *Escherichia coli* and *Lactobacillus plantarum* in relation to membrane permeabilization due to rapid chilling followed by cold storage. **Arch. Microbiol.**, v. 192, p. 299–305, 2010.

CARPOUSIS, A. J. The RNA degradosome of *Escherichia coli*: an mRNA-degrading machine assembled on RNase E. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 61, p. 71–87, 2007.

CARTY, S. M.; SREEKUMAR, K. R.; RAETZ, C. R. Effect of cold shock on lipid A biosynthesis in *Escherichia coli*: Induction at 12 uC of an acyltransferase specific for palmitoleoyl-acyl carrier protein. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 9677–9685, 1999.

CARUTHERS, J. M.; McKay, D. B. Helicase structure and mechanism. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 12, p. 123–133, 2002.

CHAIKAM, V.; KARLSON, D. T. Comparison of structure, function and regulation of plant cold shock domain proteins to bacterial and animal cold shock domain proteins. **BMB Rep.**, v. 43, p. 1–8, 2010.

CHAMOT, D.; MAGEE, W. C.; YU, E.; OWTTRIM, G. W. A Cold Shock-Induced Cyanobacterial RNA Helicase. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 6, p. 1728–1732, 1999.

CHAMOT, D.; OWTTRIM, G. W. Regulation of Cold Shock-Induced RNA Helicase Gene Expression in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 5, p. 1251–1256, 2000.

CHANDRAN, V.; POLJAK, L.; VANZO, N. F.; LEROY, A.; MIGUEL, R. N.; FERNANDEZ-RECIO, J.; PARKINSON, J.; BURNS, C.; CARPOUSIS, A. J.; LUISI, B. F. Recognition and cooperation between the ATP-dependent RNA helicase RhlB and ribonuclease RNase E. **J. Mol. Biol.**, v. 367, p. 113–132, 2007.

CHAROLLAIS J, DREYFUS M, IOST I. CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherichia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, p. 2751–9, 2004.

CHAROLLAIS, J.; PFLIEGER, D.; VINH, J.; DREYFUS, M.; IOST, I. The DEAD-box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 48, p. 1253–1265, 2003.

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, Y.; POTRATZ, J. P.; TIJERINA, P.; DEL CAMPO, M.; LAMBOWITZ, A. M.; RUSSELL, R. DEAD-box proteins can completely separate an RNA duplex using a single ATP. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 105, p. 20203–20208, 2008.

CHRISTEN, B.; ABELIUK, E.; COLLIER, J. M.; KALOGERAKE, V. S., PASSARELLI, B.; COLLIER, J. A.; FERRO, M. J.; MCADAMS, H. H.; SHAPIRO, L. The essential genome of a bacterium. **Mol. Syst. Biology.**, v. 528, p. 1-7, 2011.

CHROMAS LITE, Versão 2.1. Technelysium Pty Ltd. Software disponível em: <<http://chromas-lite.software.informer.com/2.1/>>. Acesso em: 20 Jan. 2015.

COBURN, G. A, MIAO, X.; BRIANT, D. J, MACKIE, G. A. Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a 3' exonuclease and a DEAD-box RNA helicase. **Genes Dev.**, v. 13, p. 2594–2603, 1999.

COLLIER, J.; MCADAMS, H. H.; SHAPIRO, L. A DNA methylation ratchet governs progression through a bacterial cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 104, n. 43, p. 1711-1716, 2007.

COLLIER, J.; MURRAY, S. R.; SHAPIRO, L. DnaA couples DNA replication and the expression of two cell cycle master regulators. **EMBO J.**, v. 25, n. 2, p. 346-356, 2006.

CORDIN, O.; BANROQUES, J.; KYLE T, N.; LINDER, P. The DEAD-box protein family of RNA helicases. **Gene.**, v. 367, p. 17–37, 2006.

CORDIN, O.; TANNER, N. K.; DOERE, M.; LINDER, P.; BANROQUES, J. The newly discovered Q motif of DEAD-box RNA helicases regulates RNA-binding and helicase activity. **EMBO J.**, v. 23, p. 2478–2487, 2004.

CUDNY, H.; DEUTSCHER, M. P. Apparent involvement of ribonuclease D in the 3' processing of tRNA precursors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 77, p. 837–841, 1980.

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

DEGHMANE, A. E.; GIORGINI, D.; LARRIBE, M.; ALONSO, J. M.; TAHA, M. K. Down-regulation of pili and capsule of *Neisseria meningitidis* upon contact with epithelial cells is mediated by CrgA regulatory protein. **Mol. Microbiol.**, v. 43, p. 1555–1564, 2002.

DEGHMANE, A. E.; PETIT, S.; TOPILKO, A.; PEREIRA, Y.; GIORGINI, D.; LARRIBE, M.; TAHA, M. K. Intimate adhesion of *Neisseria meningitidis* to human epithelial cells is under the control of the *crgA* gene, a novel LysR-type transcriptional regulator. **EMBO J.**, v. 19, p. 1068–1078, 2000.

DI PIETRO, F.; BRANDI, A.; DZELADINI, N.; FABBRETTI, A.; CARZANIGA, T.; PIERSIMONI, L.; PON, C. L.; Giuliodori, A. M. Role of the ribosome-associated protein PY in the cold-shock response of *Escherichia coli*. **Microbiologyopen.**, v. 2, p. 293–307, 2013.

DVIR, S.; VELTEN, L.; SHARON, E.; ZEEVI, D.; CAREY, L. B.; WIENBERGER, A.; SEGAL, E. Deciphering the rules by which 5'-UTR sequences affect protein expression in yeast. **PNAS.**, v. 110, n. 30, p. E2792-E2801, 2013.

ELLIS, N. A. DNA helicases in inherited human disorders. **Curr. Opin. Gen. Dev.**, v.7, p. 354–363, 1997.

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

ERMOLENKO, D. N.; MAKHATADZE, G. I.; Bacterial cold shock proteins. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 59, n. 11, p. 1902–1913, 2002.

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

FAIRMAN, M. E.; MARANEY, P. A.; WANG, W.; BOWERS, H. A.; GOLLINICK, P.; NILSEN, T. Q.; JANKOWSKY, E. Protein displacement by DExH/D “RNA helicases” without duplex unwinding. **Science**, v. 10, p. 304–730, 2004.

FAIRMAN-WILLIAMS, M. E.; GUENTHER, U. P.; JANKOWSKY, E. SF1 and SF2 helicases: family matters. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 20, p. 313–324, 2010.

FENG, Y.; HUANG, H.; LIAO, J.; COHEN, S. N. *Escherichia coli* poly(A)-binding proteins that interact with components of degradosomes or impede RNA decay mediated by polynucleotide phosphorylase and RNase E. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 31651–31656, 2001.

FULLER-PACE, F. V. DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, p. 4206–4215, 2008.

FULLER-PACE, F. V.; NICOL, S. M.; REID, A. D.; LANE, D. P. DbpA: a DEAD box protein specifically activated by 23S rRNA. **EMBO. J.**, 12, 3619–3626, 1993.

GALHARDO, R. S., MENCK, C. F. M., MARQUES, M. V., PAQUOLA, A. C. M., ROCHA, R. P. Characterization of the SOS Regulon of *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 4, p. 1209–1218, 2008.

GIULIODORI, A. M.; BRANDI, A.; GUALERZI, C. O.; PON, C. L. Preferential translation of cold-shock mRNAs during cold adaptation. **RNA**, v. 10, p. 265–276, 2004.

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.

GRANATO, L. M.; PICHI, S. C.; ANDRADE, M. O.; TAKITA, M. A.; SOUZA, A. A.; WANG, N.; MACHADO, M. A. The ATP-dependent RNA helicase HrpB plays an important role in motility and biofilm formation in *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. **BMC Microbiol.**, p. 16–55, 2016.

GRAPHPAD PRISM. Version 5.0. Software disponível em <<http://graphpad-prism.software.informer.com/5.0/>> Acesso em: 10 Agos. 2016.

GUALERZI, C. O.; GIULIODORI, A. M.; PON, C. L. Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. **J. Mol. Biol.**, v. 331, p. 527–539, 2003.

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

HARDWICK, S. W.; CHAN, V. S.; BROADHURST, R. W.; LUISI, B. F. An RNA degradosome assembly in *Caulobacter crescentus*. **Nucleic Acids Res.**, v. 39, n. 4, p. 1-11, 2010.

HARDWICK, S. W.; LUISI, B. F. RNA helicases and their busy contributions to RNA degradation, regulation and quality control. **RNA Biology**, v. 10, p. 56-70, 2013.

HILBERT, M.; KAROW, A. R.; KLOSTERMEIER, D. The mechanism of ATP-dependent RNA unwinding by DEAD box proteins. **Biol. Chem.**, v. 390, p. 1237–1250, 2009.

HOLTZENDORFF, J.; REINHARDT, J.; VIOLLIER, P. H. Cell cycle control by oscillating regulatory proteins in *Caulobacter crescentus*. **Bioessays**, v. 28, n. 4, p. 355-361, 2006.

HORN, G.; HOFWEBER, R.; KREMER, W.; KALBITZER, H. R. Structure and function of bacterial cold-shock proteins. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 64, n. 12, p. 1457-1470, 2007.

HUNGER, K.; BECKERING, C. L.; WIEGESHOFF, F.; GRAUMANN, P. L.; MARAHIEL, M. A. Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 188, p. 240-248, 2006.

INTILE, P. J.; BALZER, G. J.; WOLFGANG, M. C.; YAHR, T. L. The RNA Helicase DeaD Stimulates ExsA Translation To Promote Expression of the *Pseudomonas aeruginosa* Type III Secretion System. **J. Bacteriol.**, v. 197, n. 16, p. 2664-2674, 2015.

IMAGE J, Versão 1.46r. National Institute of Health. Software disponível em: <<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>>. Acesso em 30 Nov. 2015.

IOST, I.; BIZEBARD, T.; DREYFUS, M. Functions of DEAD-box proteins in bacteria: current knowledge and pending questions. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1829, p. 866–877, 2013.

IOST, I.; DREYFUS, M. Survey and summary DEAD-box RNA helicases in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, n. 15, p. 4189-4197, 2006.

ISHIHAMA, A. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. **Ann. Rev. of Microbiol.**, v. 54, p. 499–518, 2000.

JAGESSAR KL, JAIN C. Functional and molecular analysis of *Escherichia coli* strains lacking multiple DEAD-box helicases. **RNA**, v. 16, p. 1386-92, 2010.

JAIN C. The *E. coli* RhlE RNA helicase regulates the function of related RNA helicases during ribosome assembly. **RNA**, v. 14, p. 381-389, 2008.

JANKOWSKY, E.; FAIRMAN, M. E. RNA helicases - one fold for many functions. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 17, p. 316-324, 2007.

JIANG, W.; HOU, Y.; INOUE, M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 196-202, 1997.

JONES, P. G., MITTA, M., KIM, Y., JIANG, W.; INOUE, M. Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 93, p. 76-80, 1996.

KAMP, H. D., HIGGINS, D. E. A protein thermometer controls temperature-dependent transcription of flagellar motility genes in *Listeria monocytogenes*. **PLoS Pathog.**, v. 7, 2011.

KANDROR, O., DELEON, A.; GOLDBERG, A. L. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 99, p. 9727-9732, 2002.

KANDROR, O.; GOLDBERG, A. L. Trigger factor is induced upon cold shock and enhances viability of *Escherichia coli* at low temperatures. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 94, p. 4978-4981, 1997.

KARGINOV, F. V.; UHLENBECK, O. C. Interaction of *Escherichia coli* DbpA with 23S rRNA in different functional states of the enzyme. **Nucleic Acids Res.**, v. 32, p. 3028-3032, 2004.

KELLY, K. O.; DEUTSCHER, M. P. The presence of only one of five exoribonucleases is sufficient to support the growth of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 6682-6684, 1992.

KHEMICI, V.; POLJAK, L.; LUISI, B. F.; CARPOSUIS, A. J. The RNase E of *Escherichia coli* is a membrane-binding protein. **Mol. Microbiol.**, v. 70, p. 799-813, 2008.

KIM, J.; KIM, J. G.; KANG, Y.; JANG, J. Y.; JOG, G. J.; LIM, J. Y.; KIM, S.; SUGA, H.; NAGAMATSU, T.; HWANG, I. Quorum sensing and the LysR-type transcriptional activator ToxR regulate toxoflavin biosynthesis and transport in *Burkholderia glumae*. **Mol. Microbiol.**, v. 54, p. 921-934, 2004.

KIRKPATRICK, C. L.; VIOLLIER, P. H.; Decoding *Caulobacter* development. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 36, p. 193-205, 2012.

KLINKERT, B.; NARBERHAUS, F. 2009. Microbial thermosensors. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 66, p. 2661-2676, 2009.

KONKEL, M. E.; TILLY, K. Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. **Microbes Infect.**, v. 2, n. 2, p. 157-166, 2000.

KOSSEN, K.; UHLENBECK, O. C. Cloning and biochemical characterization of *Bacillus subtilis* YxiN, a DEAD protein specifically activated by 23S rRNA: delineation of a novel sub-family of bacterial DEAD proteins. **Nucleic Acid Res.**, v. 27, p. 3811-3820, 1999.

KOVACIKOVA, G.; SKORUPSKI, K. A. *Vibrio cholerae* LysR homolog, AphB, cooperates with AphA at the tcpPH promoter to activate expression of the ToxR virulence cascade. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 4250–4256, 1999.

LAMBERT, D.; DRAPER, D. E. Effects of osmolytes on RNA secondary and tertiary structure stabilities and RNA-Mg²⁺ ion interactions. **J. Mol. Biol.**, v. 370, n. 5, p. 993-1005, 2007.

LANG, E. A. S.; MARQUES, M. V. Identification and transcriptional control of *Caulobacter crescentus* genes encoding a cold shock domain. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 17, p. 5603-5613, 2004.

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

LEE, J. W.; HELMANN, J. D. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. **Biometals**, v. 20, p. 485–499, 2007.

LEHNIK-HABRINK, M.; REMPETERS, L.; KOVÁCS, A. T.; WREDE, C.; BAIERLEIN, C. KREBBER, H.; KUIPERS, O. P.; STULKE, J. DEAD-Box RNA Helicases in *Bacillus subtilis* Have Multiple Functions and Act Independently from Each Other. **J. Bacteriol**, v. 195, n. 3, p. 534–544, 2013.

LEITÃO, A. L.; COSTA, M. C.; ENGUITA, F. J. Unzippers, Resolvers and Sensors: A Structural and Functional Biochemistry Tale of RNA Helicases. *Int. J. Mol. Sci.*, v. 16, p. 2269-2293, 2015.

LESLEY, J. A.; SHAPIRO, L. SpoT Regulates DnaA Stability and Initiation of DNA Replication in Carbon-Starved *Caulobacter crescentus*. **J. of Bacteriol.**, v. 190, n.20, p. 6867-6880, 2008.

LI S, XIAO X, SUN P, WANG F. Screening of genes regulated by cold shock in *Shewanella piezotolerans* WP3 and time course expression of cold-regulated genes. **Arch. Microbiol.**, v. 189, p. 549-56, 2008.

LIM J, THOMAS T, CAVICCHIOLI R. Low temperature regulated DEAD-box RNA helicase from the Antarctic archaeon, *Methanococcoides burtonii*. **J. Mol. Biol.**, p. 297:553-67, 2000.

LINDER, P., OWTTRIM, G. W. Plant RNA helicases: linking aberrant and silencing RNA. **Trends Plant Sci.**, v. 14, p. 344-52, 2009.

LINDER, P.; JANKOWSKY, E. From unwinding to clamping — the DEAD box RNA helicase family. **Nature Rev.**, v. 12, p. 505-516, 2011.

LIU, BO.; ZHANG, Y.; ZHANG, WEI. RNA-Seq-Based Analysis of Cold Shock Response in *Thermoanaerobacter tengcongensis*, a Bacterium Harboring a Single Cold Shock Protein Encoding Gene. **PLoS One**, v. 9, i. 3, e93289, 2014.

LIU, F.; PUTNAM, A.; JANKOWSKY, E. ATP hydrolysis is required for DEAD-box protein recycling but not for duplex unwinding. **PNSA**, v. 51, n. 105, p. 20209–20214, 2008.

LOPEZ-GARCIA, P.; FORTERRE, P. DNA topology and the thermal stress response, a tale from mesophiles and hyperthermophiles. **Bioessays**, v. 22, p. 738–746, 2000.

LÓPEZ-RAMÍREZ V, ALCARAZ LD, MORENO-HAGELSIEB G, OLMEDO-ÁLVAREZ G. Phylogenetic distribution and evolutionary history of bacterial DEAD-Box proteins. **J. Mol. Evol.**, v. 72, p. 413-31, 2011.

LORSCH, J. R, HERSCHLAG, D. The DEAD box protein eIF4A. 1. A minimal kinetic and thermodynamic framework reveals coupled binding of RNA and nucleotide. **Biochem.**, v. 37, p. 2180–2193, 1998.

LORSCH, J. R, HERSCHLAG, D. The DEAD box protein eIF4A. 2. A cycle of nucleotide and RNA-dependent conformational changes. **Biochem.**, v. 37, p. 2194–2206, 1998.

LU, J.; AOKI, H.; GANOZA, M. C. Molecular characterization of a prokaryotic translation factor homologous to the eukaryotic initiation factor eIF4A. **Int. J. Biochem. Cell B.**, v. 31, p. 215–29, 1999.

MADDOCKS, S. E., OYSTON, P. C. F. Structure and function of the LysR-type transcriptional regulator (LTTR) family proteins. **Microbiol.**, v. 154, p. 3609–3623, 2008.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; DUNLAP, P. V.; CLARCK, D. P. **Microbiologia de Brock**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 1160 p.

MÄNNISTÖ, M. K.; PUHAKKA, J. A. Temperature and growth phase regulated changes in lipid fatty acid structures of psychrotolerant groundwater Proteobacteria. **Arch. Microbiol.**, v. 177, n. 1, p. 41-46, 2001.

MANNISTO, M. K.; TIROLA, M. A.; SALKINOJA-SALONEN, M. S.; KULOMAA, M. S.; PUHAKKA, J. A. Diversity of chlorophenol-degrading bacteria isolated from contaminated boreal groundwater. **Arch. Microbiol.**, v. 171, n. 3, p. 189-197, 1999.

MARKKULA, A.; LINDSTROM, M.; JOHANSSON, P.; BJORKROTH, J.; KORKEALA, H. Roles of Four Putative DEAD-Box RNA Helicase Genes in Growth of *Listeria monocytogenes* EGD-e under Heat, pH, Osmotic, Ethanol, and Oxidative Stress Conditions. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 78, n. 19, p. 6875-6882, 2012.

MATOS, R. G.; BARBAS, A.; ARRAIANO, C. M. RNase R mutants elucidate the catalysis of structured RNA: RNA-binding domains select the RNAs targeted for degradation. **Biochem J.**, v. 423, p. 291–301, 2009.

MAZZON, R. R.; LANG, E. A.; BRAZ, V. C.; MARQUES, M. V. Characterization of *Caulobacter crescentus* response to low temperature and identification of genes involved in freezing resistance. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 288, n. 2, p. 178-185, 2008.

MAZZON, R. R.; LANG, E. A.; SILVA, C.A.P.T.; MARQUES, M. V. Cold shock genes *cspA* and *cspB* from *Caulobacter crescentus* are posttranscriptionally regulated and important for cold adaptation. **J. Bacteriol.**, v. 194, n. 23, p. 6507-6517, 2012.

MICZAK, A.; KABERDIN, V. R.; WEI, C. L.; LIN-CHAO, S. Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 93, n. 9, p. 3865-3869, 1996.

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

MITTA, M.; FANG, L.; INOUE, M. Deletion analysis of *cspA* of *Escherichia coli*: requirement of the AT-rich UP element for *cspA* transcription and the downstream box in the coding region for its cold shock induction. **Mol. Microbiol.**, v. 26, p. 321-335, 1997.

MOLL, I.; GRILL, S.; GRUNDLING, A.; BLASI, U. Effects of ribosomal proteins S1, S2 and the DeaD/CsdA DEAD-box helicase on translation of leaderless and canonical mRNAs in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 44, p. 1387-1396, 2002.

MULDER, A. M.; YOSHIOKA, C.; BECK, A. H. Visualizing ribosome biogenesis: parallel assembly pathways for the 30S subunit. **Science**, v. 330, p. 673–677, 2010.

MULLIS, K. F.; FALOONA, F.; SCHARF, R.; SAIKI, G. ERLICH, H. Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction. **Cold Spring Harbor Symposium in Quantitative Biology**, v. 51, p. 263–273, 1986.

MYONG, S.; CUI, S.; CORNISH, P. V.; KIRCHOFER, A.; GRACK, M. U.; JUNG, J. U.; HOPFNER, K-P.; HA, T. Cytosolic viral sensor RIG-I is a 5'triphosphate-dependent translocase on double-stranded RNA. **Science**, v. 10, n. 323, p. 1070-1074, 2009.

NAKASHIMA, K.; KANAMARU, K.; MIZUNO, T.; HORIKOSHI, K. A novel member of the *cspA* family of genes that is induced by cold shock in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 178, n. 10, p. 2994-2997, 1996.

NETTERLING, S.; VAITKEVICIUS, K.; NORD, S. A *Listeria monocytogenes* RNA helicase essential for growth and ribosomal maturation at low temperatures uses its C-terminus for appropriate interaction with the ribosome. **J. Bacteriol.**, v. 194, p. 4377–4385, 2012.

NEWMAN, J. A.; HEWITT, L.; RODRÍGUES, C.; SOLOVYOVA, A. S.; HARWOOD, C. R.; LEWIS, R. J. Dissection of the network of interactions that links RNA processing with glycolysis in the *Bacillus subtilis* degradosome. **J. Mol. Biol.**, v. 416, p. 121-136, 2011.

NIERHAUS, K. H. The assembly of prokaryotic ribosomes. **Biochimie**, v.73, p. 739–755, 1991.

NIERMAN, W. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 98, n. 7, p. 4136-4141, 2001.

OUN, S.; REDDER, P.; DIDIER, J. P.; FRANÇOIS, P.; CORVAGLIA, A-R.; BUTTAZZONI, E.; GIRAUD, C.; GIRARD, M.; SCHERENZEL, J.; LINDER, P. The CshA DEAD-box RNA helicase is important for quorum sensing control in *Staphylococcus aureus*. **RNA.**, v. 10, n. 1, p. 157-165, 2013.

OWTTRIM, G. W. RNA helicases – diverse roles in prokaryotic response to abiotic stress. **RNA biol.**, v. 10, n. 1, p. 96-110, 2013.

OWTTRIM, G. W. RNA helicases and abiotic stress. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, p. 3220-30, 2006.

PALONEN E, LINDSTROM M, SOMERVUO P, JOHANSSON P, BJORKROTH J, KORKEALA H. Requirement for RNA helicase CsdA for growth of *Yersinia pseudotuberculosis* IP32953 at low temperatures. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, p. 1298-301, 2012.

PHADTARE, S. Unwinding activity of cold shock proteins and RNA metabolism. **RNA Biol.**, v. 8, p. 394–397, 2011.

PHADTARE, S.; INOUE, M. Genome-wide transcriptional analysis of the cold shock response in wild-type and cold-sensitive, quadruple-csp-deletion strains of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 20, p. 7007-7014, 2004.

PHADTARE, S.; INOUE, M. Sequence-selective interactions with RNA by CspB, CspC and CspE, members of the CspA family of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 33, 1004–1014, 1999.

POINDEXTER, J. S. The caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 45, n. 1, p. 123-179, 1981.

POLISSI, A.; DE LAURENTIS, W.; ZANGROSSI, S.; BRIANI, F.; LONGHI, V.; PESOLE, G.; DEHO, G. Changes in *Escherichia coli* transcriptome during acclimatization at low temperature. **Res. Microbiol.**, v. 154, p. 573–580, 2003.

PRUD'HOMME-GENEREUX, A.; BERAN, R. K.; IOST, I.; RAMEY, C. S.; MACKIE, G. A.; SIMONS, R. W. Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: evidence for a 'cold shock degradosome'. **Mol. Microbiol.**, v. 54, p. 1409–1421, 2004.

PY, B.; HIGGINS, C. F.; KRISCH, H. M.; CARPOUSIS, A. J. A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. **Nature**, v. 381, p. 169-172, 1996.

QIN, D.; FREDRICK, K. Control of translation initiation involves a factor-induced rearrangement of helix 44 of 16S ribosomal RNA. **Mol. Microbiol.**, v. 71, n. 5, p. 1239-1249, 2009.

RAMÍREZ, V. L.; ALCARAZ, L. D.; HAGELSIEB, G. M.; ÁLVAREZ, G. O. Phylogenetic distribution and evolutionary history of bacterial DEAD-box proteins. **J. Mol. Evol.**, v. 72, p. 413-431, 2011.

REDDER, P.; HAUSMANN, S.; KHEMICI, V.; YASREBI, H.; LINDER, P. Bacterial versatility requires DEAD-box RNA helicases. **FEMS Microbiol.**, 2015.

REGONESI, M. E.; DEL FAVERO, M.; BASILICO, F.; BRIANI, F.; BENAZZI, L.; TORTORA, P. Analysis of the *Escherichia coli* RNA degradosome composition by a proteomic approach. **Biochimie**, v. 2, n. 151-61, 2006.

RESCH, A.; VECEREK, B.; PALAVRA, K. Requirement of the CsdA DEAD-box helicase for low temperature riboregulation of rpoS mRNA. **RNA Biol.**, v. 7, p. 796-802, 2010.

ROCAK, S.; LINDER, P. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 5, p. 232-41, 2004.

ROCHA, R. P.; PAQUOLA, A. C. M.; MARQUES, M. V.; MENCK, C. F. M.; GALHARDO, R. S. Characterization of the SOS Regulon of *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 4, p. 1209-1218, 2008.

ROSANA, A. R. R.; CHAMOT, D.; OWTTRIM, G. W. Autoregulation of RNA Helicase Expression in Response to Temperature Stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Plos one**, v. 7, i. 10, e48683, 2012.

RUSSELL, D. A.; BYRNE, G. A.; O'CONNELL, E. P.; BOLAND, C. A.; MEIJER, W. G. The LysR-type transcriptional regulator VirR is required for expression of the virulence gene vapA of *Rhodococcus equi* ATCC 33701. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 5576-5584, 2004.

SCHERRER, K.; DARNELL, J. E. Sedimentation characteristics of rapidly labelled RNA from HeLa cells. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 7, p. 486-490, 1962.

SCHUMANN, M. Temperature sensors of eubacteria. **Adv. Appl. Microbiol.**, v. 67, p. 213-256, 2009.

SEIDEL, R.; BLOOM, J. G.; DEKKER, C.; SXZELKUN, M, D. Motor step size and ATP coupling efficiency of the dsDNA translocase EcoR124I. **EMBO J.**, v. 69, n. 27, p. 1388-1398, 2008.

SHAJANI, Z.; SYKES, M. T.; WILLIAMSON, J. R. Assembly of bacterial ribosomes. **Annu. Rev Biochem.**, v. 80, p. 501-526, 2011.

SHI, W.; LI, C.; LOUISE, C. J.; ADLER, J. Mechanism of adverse conditions causing lack of flagella in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 2236–2240, 1993.

SHIMADA Y, FUKUDA W, AKADA Y, ISHIDA M, NAKAYAMA J, IMANAKA T. Property of cold inducible DEADbox RNA helicase in hyperthermophilic archaea. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 389, p. 622–7, 2009.

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.

SILVA NETO, J. F.; LOURENÇO, R. F.; MARQUES, M. V. Global transcriptional response of *Caulobacter crescentus* to iron availability. **BMC Genomics.**, v. 14, p. 549, 2013.

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

SINGLETON, M. R.; DILLINGHAM, M. S.; WIGLEY, D. B. Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 76, p. 23–50, 2007.

SPANIOL, V.; WYDER S, AEBI, C. RNA-Seq-Based analysis of the physiologic cold shock-induced changes in *Moraxella catarrhalis* gene expression. **PLoS One**, 8: e68298, 2013.

SPERANDIO, B.; GAUTIER, C.; MCGOVERN, S.; EHRLICH, D. S.; RENAULT, P.; MARTIN-VERSTRAETE, I.; GUE´ DON, E. Control of methionine synthesis and uptake by MetR and homocysteine in *Streptococcus mutans*. **J. Bacteriol.**, v. 189, p. 7032–7044, 2007.

SRIVASTAVA, A. K.; SCHLESSINGER, D. Coregulation of processing and translation: mature 5' termini of *Escherichia coli* 23S ribosomal RNA form in polysomes. **P. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 85, p. 7144–7148, 1988.

STEP ONE, Version 2.2.1. Thermo Fisher Scientific. Software disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/technicalresources/softwaredownloads/StepOne-and-StepOnePlus-Real-Time-PCR-System.html>>. Acesso em: 17 Jan. 2015.

STORZ, G.; HENGGE-ARONIS, R. **Bacterial stress response**. 2. ed. [s.l.] ASM Press, 2000. 580 p.

SVITKIN, Y. V.; PAUSE, A.; HAGHIGHAT, A.; PYRONNET, S.; WITHRELL, G.; BELSHAM, G. J.; SONENBERG, N. The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. **RNA.**, v. 7, p. 382–394, 2001.

TALKINGTON, M. W.; SIUZDAK, G.; WILLIAMSON, J. R. An assembly landscape for the 30S ribosomal subunit. **Nature**, v. 438, p. 628–632, 2005.

TARASSOVA, O. S.; CHAMOT, D.; OWTTRIM, G. W. Conditional, Temperature-Induced Proteolytic Regulation of Cyanobacterial RNA Helicase Expression. **J. Bacteriol.**, v. 196, n. 8, p. 1560–1568, 2014.

TOONE, W. M.; RUDD, K. E.; FRIESEN, J. D. *deaD*, a *Escherichia coli* gene encoding a presumed ATP-dependent RNA helicase, can suppress a mutation in *rpsB*, the gene encoding ribosomal protein S2. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 3291-3302, 1991.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

VAKULSKAS, C. A.; PANNURI, A.; CORTÉS-SELVA, D.; ZERE, T. R.; AHMER, B. M.; BABITZKE, P.; ROMEO, T. Global effects of the DEAD-box RNA helicase DeaD (CsdA) on gene expression over a broad range of temperatures. **Mol. Microbiol.**, v. 92, n. 5, p. 945-958, 2014.

VAN BRABANT, A. J.; STAN, R.; Ellis, N. A. Dna helicases, Genomic Instability, and human genetic disease. **Annu. Rev. Genom. Human Genet.**, v.1, p. 409–459, 2000.

VANBOGELEN, R. A; NEIDHARDT, F. C. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 87, p. 5589–5593, 1990.

VANZO, N. F.; LI, Y. S.; PY, B.; BLUM, E.; HIGGINS, C. F.; RAYNAL, L. C. Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. **Genes Dev.**, v. 12, p. 2770–2781, 1998.

VORACHECK-WARREN, M. K., CARTY, S. M., LIN, S., COTTER, R. J.; RAETZ, C. R. An *Escherichia coli* mutant lacking the cold shockinduced palmitoleoyltransferase of lipid A biosynthesis: absence of unsaturated acyl chains and antibiotic hypersensitivity at 12 uC. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 14186–14193, 2002.

VOSS, J. E.; LUISI, B. F.; HARDWICK, S. W. Molecular recognition of RhlB and RNase D in the *Caulobacter crescentus* RNA degradosome. **Nucleic Acids Res.**, v. 42, n. 21, p. 13294–13305, 2014.

WANG, N.; YAMANAKA, K.; INOUE, M. CspI, the ninth member of the CspA family of *Escherichia coli*, is induced upon cold shock. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 5, p. 1603-1609, 1999.

WASMUTH, E. V.; JANUSZYK, K.; LIMA, C. D. Structure of an Rrp6-RNA exosome complex bound to poly(A) RNA. **Nature.**, v. 511, p. 435–439, 2014.

WATANABE T, KOJIMA H, FUKUI M. Draft genome sequence of a psychrotolerant sulfur-oxidizing bacterium, *Sulfuricella denitrificans* skB26, and proteomic insights into cold adaptation. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 78, p. 6545-9, 2012.

WEBER, M. H.; FRICKE, I.; DOLL N.; MARAHIEL, M. A. Bacterial cold shock responses. **Sci. Prog.**, v. 86, pt. 1-2, p. 9-75, 2003.

WILSON, D. N.; NIERHAUS, K. H. The weird and wonderful world of bacterial ribosome regulation. **Crit. Rev. Biochem. Mol.**, v. 42, p. 187– 219, 2007.

YAMADA, M., NAGAMITSU, H., IZU, H., NAKAMURA, K.; AZAM, A. Characterization of the ves gene, which is expressed at a low temperature in *Escherichia coli*. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 4, p. 163–169, 2002.

YAMANAKA, K.; FANG.; L. INOUE, M. The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. **Mol. Microbiol.**, v. 27, p. 247–255, 1998.

YAMANAKA, K.; MITTA, M.; INOUE, M. Mutation analisys of the 5' Untranslated Region of the Cold Shock cspA mRNA of *Escherichia coli*. **J. of Bacteriol.**, v. 181, n. 20, p. 6284-6291, 1999.

ZHANG, Y.; SMITH, C.; SAHA, A.; GRILL, S. W.; MIHARDJA, S.; SMITH, S. B.; CAIRNS, B. R.; PETERSON, C. L.; BUSTAMANTE, C. DNA translocation and loop formation mechanism of chromatin remodeling by SWI/SNF and RSC. **Mol. Cell.**, v. 10, n. 24, p. 559-568, 2006.

ZOFALL, M.; PERSINGER, J.; KASSABOV, S. R.; BARTHOLOMEW, B. Chromatin remodeling ISW2 and SWI/SNF requires DNA translocation inside the nucleosome. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 10, n. 13, p. 339-346, 2006.

ZUO, Y.; DEUTSCHER, M. P. Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. **Nucleic Acids Res.**, v. 29, p. 1017–1026, 2001.