

Juliana da Silva Santos

CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE
AÇÃO DA PROTEÍNA CspC NA MANUTENÇÃO
DA VIABILIDADE E NA RESPOSTA DE
Caulobacter crescentus A ESTRESSES

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

São Paulo
2016

Juliana da Silva Santos

CARACTERIZAÇÃO DOS MECANISMOS DE
AÇÃO DA PROTEÍNA CspC NA MANUTENÇÃO
DA VIABILIDADE E NA RESPOSTA DE
Caulobacter crescentus A ESTRESSES

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

Area de concentração: Microbiologia

Orientadora: Dra. Marilis do Valle Marques

Versão original

São Paulo
2016

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

reprodução não autorizada pelo autor

Santos, Juliana da Silva.

Caracterização dos mecanismos de ação da proteína CspC na manutenção da viabilidade e na resposta de *Caulobacter crescentus* a estresses / Juliana da Silva Santos. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Profa. Dra. Marilis do Valle Marques.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Resposta a estresses em bactérias.

Versão do título para o inglês: Characterization of the mechanisms of CspC action in *Caulobacter crescentus* cell viability and stress response.

1. Microbiologia 2. Biologia molecular 3. Regulação gênica 4. Resposta estresse em bactérias 5. Proteínas de choque frio 6. *Caulobacter crescentus* I. Marques, Profa. Dra. Marilis do Valle II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB024/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Juliana da Silva Santos.

Título da Tese: Caracterização dos mecanismos de ação da proteína CspC
na manutenção da viabilidade e na resposta de *Caulobacter
crescentus* a estresses.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 514/12 referente ao projeto intitulado: "*Caracterização dos mecanismos de ação da proteína CspC na manutenção da viabilidade e na resposta de *Caulobacter crescentus* a estresses*" sob a responsabilidade de **Juliana da Silva Santos**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 28 de março de 2012.

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

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

Aos meus pais, Vitório e Maria Helena, que
me ensinaram valores de honestidade,
persistência e respeito.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu marido Vinicius pelas palavras de amor e incentivo.

Aos meus amigos que conquistei durante o doutorado, em especial a Marina, Alexandre, Larissa e Naara, pelo apoio, amizade, companheirismo nos momentos alegres e tristes, paciência e ajuda.

A professora Dra. Marilis, por sua orientação, confiança e apoio no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Dr. Rodrigo Galhardo e Dr. Gregório Cabrera Gomes por disponibilizarem seus laboratórios, sugestões e todo apoio e imensa prontidão em ajudar.

A professora Dra. Suely Lopes Gomes e ao professor Dr. Michael Laub pelas cepas cedidas.

Aos colegas de laboratório de ontem (Carolina, Heloise, Ricardo, Maristela, Ivan, Gabriela, Vânia e Jose) e de hoje (Nadine, Rodolfo, Angel, Julia, Laura), meus agradecimentos pelas valiosas conversas e discussões que tornaram esse trabalho mais leve e fácil de ser conduzido.

A técnica do laboratório Iris por toda ajuda, disponibilidade e boa vontade que teve comigo durante todo o tempo que estive no laboratório.

A minha amiga de hoje e sempre, Karen, minha irmã do coração, obrigada por toda ajuda e por tornar a minha vida mais leve e divertida.

A todos do laboratório do Professor Dr. Rodrigo Galhardo que de forma direta ou indireta colaboraram na realização deste trabalho, em especial a Ingrid e a Carina e ao Marco.

A todos do laboratório do Professor Dr. Gregório Cabrera Gomes que contribuíram de forma direta ou indireta colaboraram, em especial ao técnico Aelson e Amanda que me auxiliaram nas análises de HPLC.

Aos colegas de departamento pelas conversas descontraídas de corredor.

A FAPESP pelo apoio financeiro.

RESUMO

SANTOS, J. S. **Caracterização dos mecanismos de ação da proteína CspC na manutenção da viabilidade e na resposta de *Caulobacter crescentus* a estresses.** 2016. 114 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Caulobacter crescentus, uma α -proteobacteria não patogênica, possui em seu genoma quatro genes codificando Proteínas de Choque Frio (CSPs): *cspA*, *cspB*, *cspC* e *cspD*. CspC e CspD são expressas apenas em fase estacionária, e ambas apresentam dois domínios CSD. Para determinar se ocorre sobreposição funcional das CSPs, o mutante *cspC* foi complementado com genes codificando: variantes dos domínios de CspC; mutações pontuais nos domínios de CspC; e CspD. As mutações pontuais nos dois domínios proporcionam fenótipos mais severos que a falta de *cspC*. Nenhuma CSP de *C. crescentus* é capaz de complementar o fenótipo de sensibilidade ao frio de *E. coli* BX04. Entretanto, os domínios de choque frio de CspC de *C. crescentus* individualmente são capazes de complementar este fenótipo. Uma análise transcricional global mostrou que a ausência de *cspC* afeta a transcrição de 11 genes na fase exponencial e 60 genes na fase estacionária. A meia vida dos genes *sciP*, *aceA* e CC0682 se mostrou menor no mutante *cspC*, sugerindo que é possível que CspC desempenhe uma regulação pós-transcricional.

Palavras-chave: Microbiologia. Biologia molecular. Regulação gênica. Resposta estresse em bactérias. Proteínas de choque frio. *Caulobacter crescentus*.

ABSTRACT

SANTOS, J. S. **Characterization of the mechanisms of CspC action in *Caulobacter crescentus* cell viability and stress response.** 2016. 114 p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.8

C. crescentus, a non-pathogenic α -proteobacteria, has in its genome four genes encoding cold shock proteins (CSPs): *cspA*, *cspB*, *cspC* e *cspD*. CspC and CspD have two CSDs and are induced during stationary phase. In order to determine whether there is a functional overlap among the CSPs, the *cspC* mutant strain was complemented with genes encoding: different domain composition of CspC; point mutations within the CspC cold shock domain; and CspD. Point mutations in the CspC CSDs caused a more severe phenotype than that of the null strain. None of the *C. crescentus* CSPs complemented the cold sensitivity of *E. coli* BX04 mutant. However, the individual CSDs of *C. crescentus* CspC complemented this phenotype. A microarray global transcriptional profiling showed the absence of *cspC* affected the transcription of 11 genes at exponential phase and 60 genes at stationary phase. mRNA decay experiments showed that the *sciP*, *aceA* e CC0682 mRNAs were less stable in the *cspC* mutant, indicating that its effect could be at least partially due to posttranscriptional regulation.

Keywords: Microbiology. Molecular biology. Gene regulation. Bacterial stress response. Cold shock proteins. *Caulobacter crescentus*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5'-UTR - região 5' não traduzida
CSD - domínio de choque frio (*cold shock domain*)
CSP - proteína de choque frio (*cold shock protein*)
DNA - ácido desoxirribonucléico
dNTP - desoxirribonucleotídeos fosfatados
DO₆₀₀ - densidade óptica a 600 nanômetros
ECF - função extracitoplasmática
EMSA - ensaio de alteração de mobilidade eletroforética em gel
HRV - rinovirus humano
IDH - isocitrato desidrogenase
IRES - entrada ribossomal
IPTG - isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo
kDa - quilodáton(s)
LB - Luria-Bertani
M – molar
M2A - meio mínimo sem glicose e contendo 0,2% de acetato
mdh - malato desidrogenase
mRNA - RNA mensageiro
NBT - nitro-blue tetrazolium chloride
pb - pares de bases
PCR - reação em cadeia da polimerase
PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonil
ppGpp - guanosina tetrafosfato
RNA - ácido ribonucléico
RNase – ribonuclease
ROS - espécies reativas de oxigênio
rpm - rotações por minuto
rRNA - RNA ribossômico
sRNA – pequeno RNA
SDS - dodecil sulfato de sódio
UFC - unidade formadora de colônia
x g - vezes a aceleração da gravidade

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia de células de <i>Caulobacter crescentus</i> nas fases exponencial e estacionária	20
Figura 2 - Possível região ativadora de <i>cspC</i>	26
Figura 3 - Modelo cristalográfico feito por Raio-X de CspA de <i>E. coli</i>	28
Figura 4 - Esquema das construções de complementação dos domínios de CspC	39
Figura 5 - Sequência do gene <i>cspC</i>	41
Figura 6 - Ensaio de expressão de <i>cspC</i> em presença de paraquat e <i>tert</i> -butil.....	52
Figura 7 - Alinhamento entre as proteínas de choque frio de <i>C. crescentus</i>	54
Figura 8 - Esquema das construções dos domínios de CspC contendo modificações ..	55
Figura 9 - Esquema das construções de complementação dos domínios de CspC	56
Figura 10 -Western <i>blotting</i> com soro anti-CspC	57
Figura 11 - Sobrevivência relativa das linhagens NA1000 e mutante <i>cspC</i> com variantes em H ₂ O ₂ em fase exponencial.....	59
Figura 12 - Ensaio de sobrevivência a H ₂ O ₂ em meio sólido na fase estacionária tardia (48 horas).....	61
Figura 13 - Microscopia óptica na fase estacionária	62
Figura 14 - Efeito das CSPs de <i>Caulobacter crescentus</i> no crescimento de <i>E. coli</i> (BX04) a 15 °C	66
Figura 15 - Mapa da região do genoma de <i>Caulobacter crescentus</i> NA1000 que contém o gene <i>regA</i>	70
Figura 16 - Sobrevivência relativa das linhagens NA1000 e nas linhagens mutantes <i>regA</i> e <i>regB</i> em meio PYE contendo H ₂ O ₂	71
Figura 17 - Indução e purificação da proteína RegA em <i>E. coli</i> DH5a.....	72
Figura 18 - Ensaio de alteração de mobilidade eletroforética.....	72
Figura 19 - Efeito de <i>regA</i> sobre <i>cspC</i> na fase exponencial e na fase estacionária.....	74
Figura 20 - Western <i>blotting</i> com soro anti-CspC nas linhagens NA1000 e mutante <i>regA</i>	74
Figura 21 - Efeito de <i>cspC</i> sobre a expressão dos genes selecionados a partir da análise de transcriptoma na fase estacionária	82
Figura 22 - Esquema representativo do ciclo do glioxilato	84
Figura 23 - Efeito de <i>cspC</i> sobre a expressão de <i>sodB</i>	85

Figura 24 - Expressão de <i>sigT</i> e <i>sigU</i> no mutante <i>cspC</i>	89
Figura 25 - Representação esquemática das vias de assimilação e redução de sulfato e de biossíntese de metionina	90
Figura 26 - Ensaio de determinação da meia-vida do mRNA da ORF CC0682.....	93
Figura 27 - Ensaio de determinação da meia-vida do mRNA de <i>sciP</i>	95
Figura 28 - Ensaio de determinação da meia-vida do mRNA de <i>aceA</i>	96
Figura 29 - Ensaio de determinação da meia-vida do mRNA de <i>aceB</i>	97
Figura 30 - Crescimento e consumo de acetato nas linhagens NA1000 e mutante <i>cspC</i>.....	98
Figura 31 - Possíveis regiões de ligação de CspC	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho	33
Tabela 2 - Plasmídeos utilizados neste trabalho	35
Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho	36
Tabela 4 - Sensibilidade a Paraquat	51
Tabela 5 - Comparação de identidade dos domínios de choque frio de CpsC com os das proteínas de <i>E. coli</i>	53
Tabela 6 - Resumo da média dos resultados das construções de complementação	64
Tabela 7 - Genes menos expressos no mutante <i>cspC</i> na fase exponencial.....	77
Tabela 8 - Genes mais expressos no mutante <i>cspC</i> na fase exponencial.....	77
Tabela 9 - Genes menos expressos no mutante <i>cspC</i> na fase estacionária.....	78
Tabela 10 - Genes mais expressos no mutante <i>cspC</i> na fase estacionária	80

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	15
1.1 <i>Caulobacter crescentus</i>	15
1.2 Fase estacionária	17
1.3 Estresse oxidativo	21
1.4 Cadeia respiratória	23
1.5 Proteínas de choque frio	26
2 OBJETIVOS	32
3 METODOLOGIA	33
3.1 Condições de crescimento e meios de cultivo utilizados	33
3.2 Construções para os ensaios de complementação fenotípica	38
<i>3.2.1 PCR para construção dos insertos de complementação dos domínios de <i>CspC</i></i>	39
<i>3.2.2 Sequenciamento de DNA dos insertos</i>	41
3.3 Ensaio de atividade de β-galactosidase	42
3.4 Ensaio de expressão de <i>cspC</i> em presença de <i>tert</i>-butil ou paraquat	42
3.5 Ensaio para determinar a meia vida de mRNA	42
<i>3.5.1 Preparação das amostras</i>	42
<i>3.5.2 Extração de RNA com Trizol</i>	43
<i>3.5.3 Conversão de RNA em cDNA</i>	43
3.6 RT-PCR quantitativo	44
3.7 Ensaios de microarranjos de DNA	44
3.8 Expressão heteróloga de RegA em <i>E. coli</i>	45
<i>3.8.1 Clonagem do gene <i>regA</i> e indução da expressão</i>	45
<i>3.8.2 Purificação da proteína RegA</i>	46
<i>3.8.3 Ensaio de alteração de mobilidade eletroforética em gel (EMSA)</i>	46
3.9 Ensaio de Western blotting	47
3.10 Curva de crescimento em diferentes fontes de carbono	47

3.11 Ensaio de viabilidade sob choque frio.....	48
3.12 Ensaio de sobrevivência em estresse oxidativo.....	48
<i>3.12.1 Ensaio em meio líquido.....</i>	<i>48</i>
<i>3.12.2 Ensaio em meio sólido.....</i>	<i>49</i>
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
Parte 1 - Análise dos dois domínios CSD para a função de CspC.....	50
4.1 Fenótipo da linhagem MM26 e expressão de <i>cspC</i> em resposta a agentes oxidantes	50
4.2 A duplicação dos domínios de choque frio de CspC e o fenótipo de sensibilidade a estresse oxidativo.....	53
4.3 Complementação do fenótipo de choque frio da linhagem <i>E. coli</i> BX04 com proteínas de choque frio de <i>Caulobacter crescentus</i>.....	64
Parte 2 - Estudo da regulação de <i>cspC</i>	68
Parte 3- Estudo da expressão gênica global na ausência de <i>cspC</i>.....	75
4.4 Identificação de genes com a expressão afetada no mutante <i>cspC</i> através de ensaios de microarranjos de DNA.....	75
4.5 Validação dos ensaios de microarranjos de DNA de <i>cspC</i>.....	82
4.6 Análise dos resultados.....	83
<i>4.6.1 Genes menos expressos no mutante <i>cspC</i> na fase estacionária.....</i>	<i>83</i>
<i>4.6.2 Genes mais expressos no mutante <i>cspC</i> na fase estacionária</i>	<i>89</i>
<i>4.6.3 O efeito de <i>cspC</i> na estabilidade de mRNAs</i>	<i>92</i>
5 CONCLUSÕES.....	101
REFERÊNCIAS.....	102

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Caulobacter crescentus*

As alfa-proteobactérias representam uma das subdivisões mais diversificadas de bactérias, são encontradas em uma ampla variedade de habitats que vão desde o fundo do oceano a ambientes vulcânicos (ETTEMA; ANDERSSON, 2009). Nesta subdivisão há espécies que são objetos de interesse médico e ambiental, incluindo patógenos de animais e plantas, *Brucella* e *Agrobacterium* respectivamente, e simbioses de plantas, como *Sinorhizobium*. Entre as alfa-proteobactérias, *Caulobacter crescentus* é uma das bactérias mais bem estudadas, é encontrada em diversos tipos de solos e ambientes aquáticos e apresenta uma capacidade de viver em condições de baixos nutrientes. Apresenta um ciclo de divisão assimétrico, dando origem a duas células-filhas: uma célula-talo e uma célula móvel, que apesar de serem morfologicamente distintas são geneticamente idênticas (AUSMESS; JACOBS-WAGNER, 2003). A célula móvel é capaz de procurar por ambientes mais favoráveis e quando o encontra, diferencia-se na forma sésil, podendo assim, iniciar a replicação do DNA. A célula móvel apresenta um único flagelo, alguns pili e é quimiotaticamente ativa. A célula-talo é sésil e possui um polissacarídeo adesivo localizado na extremidade do talo que é uma extensão do envelope celular, conseguindo assim, aderir a superfícies. Diferente da célula móvel, a célula-talo é capaz de reiniciar imediatamente a divisão celular e a replicação do cromossomo.

Com o seu ciclo de vida peculiar, *Caulobacter crescentus* tornou-se um dos principais sistemas-modelo de investigação das vias regulatórias e genéticas que controlam o ciclo celular entre as bactérias (LAUB; SHAPIRO; MCADAMS, 2007). No banco de dados IMG (img.jgi.doe.gov) consta que 37 genomas de isolados de *Caulobacters*, sendo que as linhagens CB15 e NA1000 de *Caulobacter crescentus* apresentam o sequenciamento de seus genomas completos. Outros genomas de *Caulobacters* vêm sendo sequenciados como, *Caulobacter* K31 isolada de águas subterrâneas, capaz de tolerar clorofenóis e de crescer a 4 °C, da *Caulobacter segnis*, que devido às suas características fenotípicas foi inicialmente classificada como *Mycoplana segnis* e após análise do 16S rDNA foi reclassificada como *Caulobacter* (PATEL et al., 2015) e também foi proposto um “rascunho” do genoma de *Caulobacter* sp. linhagem OR37 isolada de uma área contaminada com metais pesados, resistente a níquel, urânio, cobalto e cádmio (UTTURKAR et al., 2013).

Caulobacter crescentus possui um genoma com cerca de 4 Mb em um único cromossomo circular, com um conteúdo de GC de 67%, codificando 3.767 genes (NIERMAN et al., 2001). Com a divulgação da sequência completa do genoma de *C. crescentus*, inicialmente muitos estudos com abordagem genômica possibilitaram a análise do padrão global de expressão de mRNAs, por técnicas como microarranjos de DNA e estudos proteômicos (AMICK; BRUN, 2001; LAUB et al., 2000; LAUB et al., 2002; SKERKER; LAUB, 2004). Atualmente, muitos dados sobre a regulação gênica nesta bactéria têm sido gerados, incluindo cerca de 130 experimentos de microarranjos de DNA, 13 experimentos de RNAseq, 8 perfis ribossomais e 7 experimentos de ChIP-seq revelando centenas de sítios de ligação de fatores de transcrição (LASKER et al., 2016).

Devido ao seu ciclo de vida complexo, que requer uma diferenciação celular e ao mesmo tempo se adaptar ao meio ambiente, associados à facilidade de sincronização do ciclo celular, muito tem sido estudado sobre o ciclo celular desta bactéria de vida livre. Entretanto, muitos outros aspectos interessantes de sua biologia ainda foram pouco estudados. O genoma de *C. crescentus* revela uma variedade de possibilidades de adaptação, sendo extremamente rico em sistemas de transporte de membrana incluindo um número extremamente elevado de receptores dependentes de TonB (65), número bem maior comparado a outras bactérias, como por exemplo, *Pseudomonas aeruginosa* que apresenta apenas 34 receptores dependentes de TonB, além de muitos componentes de sistema de transporte do tipo ABC (61) (NIERMAN et al., 2001).

Através de análises de mutagênese geradas por inserção de um transposon Tn5 associadas a um sequenciamento em larga escala do genoma de *Caulobacter crescentus*, foram identificadas todas as regiões essenciais do genoma desta bactéria, sendo que apenas 12% do material genético se mostrou essencial para esta bactéria. 90% do genoma essencial de *Caulobacter* é composto por sequências que codificam proteínas e 10% são sequências de RNA não codificante, elementos regulatórios de genes e elementos envolvidos na replicação do DNA. Interessantemente, das 480 ORFs essenciais de *C. crescentus*, 38% não estão presentes na maioria das espécies não pertencentes ao grupo das α -proteobactérias e 10% são exclusivas desta bactéria (CHRISTEN et al., 2011).

Recentemente, o estudo de importantes reguladores do ciclo celular durante a fase estacionária e carência nutricional vem sendo aprofundado. As proteínas DnaA e CtrA apresentam funções opostas na regulação da replicação do DNA em *C. crescentus*: enquanto DnaA inicia a replicação, CtrA bloqueia o início da replicação (COLLIER, 2012). Sanselicio e Viollier, 2015, propuseram que ppGpp ativa indiretamente o acúmulo de CtrA durante a

fase estacionária, a fim de interromper o processo de replicação durante esta fase. Já a síntese da proteína DnaA diminui durante a fase estacionária gerada por carência nutricional, por meio de uma regulação pós-transcricional na região 5' não-traduzida de DnaA. Este mecanismo ocorre independentemente de ppGpp, indicando que outro sinal controla a síntese de DnaA neste período (LESLIE et al., 2015). Foi proposto que uma via regulatória dependente do sigma ECF, SigT, degrada CtrA durante a carência de carbono em *C. crescentus* (BRITOS et al., 2010).

1.2 Fase estacionária

Muitos ambientes na biosfera são oligotróficos, com disponibilidade de nutrientes que pode ser flutuante ou próximo de carência nutricional. Temos, por exemplo, os oceanos, onde a média de carbono orgânico pode variar de 1 mg L⁻¹ na superfície da água para 0.5 mg L⁻¹ no fundo do oceano. Esses valores são extremamente baixos comparados à disponibilidade dos meios ricos produzidos em laboratório (10 g L⁻¹). Quando as concentrações de nutrientes são insuficientes para manter um crescimento estável, as bactérias, que possuem uma ampla capacidade de suportar condições extremas como ausência de nutrientes, entram na fase estacionária (LLORENS et al., 2010). Para que ocorra a retomada de crescimento e resistência a estresses é necessário um reajustamento no padrão da expressão gênica global (ROMEIO; VAKULSKAS; BABITZKE, 2013).

Em bactérias, a entrada na fase estacionária provoca a diminuição da taxa de crescimento acompanhada de uma inevitável diminuição na síntese de proteínas comparando com a fase exponencial (KOLTER; SIEGELE; TORMO, 1993). Shaikh et al. (2010) observou que na fase estacionária de células de *E. coli* cultivadas em meio mínimo, a síntese de proteínas ainda continua ocorrendo por meio de reuso de aminoácidos oriundos da degradação de proteínas que foram sintetizadas na fase exponencial.

Em casos extremos de carência nutricional algumas bactérias, incluindo *Bacillus subtilis* e *Myxococcus* podem se diferenciar em estruturas resistentes denominadas esporos. Chubukov e Sauer (2014) avaliaram o metabolismo de *E. coli* e *B. subtilis* em resposta a uma variedade de carências nutricionais e observaram que em *E. coli* ocorre uma diferente atividade metabólica dependendo do nutriente limitante, tendo uma baixa taxa metabólica na carência de nitrogênio e uma alta taxa na carência de magnésio. Já em *B. subtilis*, carências nutricionais em geral levam quase que exclusivamente à decisão pela formação de esporos.

Entretanto, quando o processo de esporulação foi inibido, foi observado um metabolismo mais ativo em *B. subtilis* comparando com *E. coli* nas mesmas condições.

Em *E. coli*, a fase estacionária ocasionada pela falta de nutrientes pode levar a um ganho de resistência que é dependente do fator sigma S codificado pelo gene *rpoS*. Essa resistência engloba uma proteção contra uma série de estresses ambientais, como por exemplo: choque de calor, estresse oxidativo, condições de pH ácido e variações osmóticas (BATTESTI; MAJDALANI; GOTTESMAN, 2011; NYSTRÖM, 2004). RpoS é responsável por regular a expressão de mais de 10% dos genes de *E. coli*, sendo o principal regulador desta fase e respondendo a vários tipos de estresses (WEBER et al., 2005). Devido a sua enorme importância, RpoS é altamente regulado em níveis transcricionais, traducionais e pós-traducionais. Em *E. coli*, Hfq, um dos principais reguladores de *rpoS*, interage com CspC para estabilizar o mRNA de *rpoS* (COHEN-OR et al., 2010; NOGUEIRA; SPRINGER, 2000). Além do gene *rpoS*, pequenos RNAs também são importantes reguladores da fase estacionária, sendo responsáveis por modular a tradução e estabilidade de mRNA alvos. Estes sRNAs normalmente apresentam tamanho de 80 a 100 nucleotídeos e apresentam mais de sessenta tipos em *E. coli*. Alguns estão envolvidos na resposta a estresse e frequentemente necessitam da ligação da chaperona de RNA, Hfq (LLORENS et al., 2010). O sRNA CsrA é um importante regulador do metabolismo de carbono em bactérias e atua através de regulação pós-transcricional, ligando diretamente nos mRNAs de seus alvos (LIU; YANG; ROMEO, 1995; ROMEO 1998). Em *E. coli*, é um ativador da glicólise e um repressor da gliconeogênese e da síntese de glicogênio (ROMEO et al., 1993). Diferente de RpoS, já foi observado que CsrA é responsável por inibir a expressão de genes de fase estacionária e ativar genes necessários para o crescimento na fase exponencial. Em *E. coli*, o duplo mutante *rpoS/csrA* apresenta um crescimento reduzido quando se adiciona pequenas quantidades de acetato no meio de crescimento (WEI et al., 2000). Os autores observaram que CsrA regula positivamente os genes do ciclo do glioxilato (*aceA* e *acs*) e que no duplo mutante *rpoS/csrA* ocorre uma diminuição na captação de aminoácidos. *rpoS* também já foi descrito como envolvido na indução da expressão de *acs* (SIN et al., 1997) e por regular positivamente a expressão de *csrA* em meio mínimo (DONG; SCHELLHON, 2009).

Para a célula poder utilizar o acetato ou outras fontes de carbono como ácidos graxos, em bactérias é necessária a ativação do ciclo do glioxilato. Neste ciclo, compostos de dois a três carbonos podem ser utilizados para a síntese de glicose (KORNBERG, 1957). Duas enzimas essenciais, isocitrato liase e malato sintase, ausentes no ciclo do ácido cítrico, compõem o ciclo do glioxilato, onde a enzima isocitrato liase cliva o isocitrato em succinato e

glioxalato e a enzima malato sintase converte acetil-CoA e glioxilato em malato (KORNBERG, 1957).

Em *E. coli* a enzima isocitrato liase compete com a isocitrato desidrogenase (IDH) por isocitrato. A regulação desta enzima é dependente de AceK, que fosforila e defosforila IDH em resposta a disponibilidade de nutrientes (DUNN et al., 2009; ZHENG et al., 2012). Em altas concentrações de acetato, a isocitrato desidrogenase é reprimida através de fosforilação e na presença de uma fonte de carbono preferencial, como glicose, é ativada por desfosforilação, controlando assim a mudança de ciclo de ácido cítrico para o ciclo de glioxilato (ZHENG et al., 2012). Outra forma desta bactéria regular o ciclo do glioxilato é através do repressor *iciR*, a qual reprime o operon *aceABK* na presença da fonte de carbono preferencial, glicose (SUNNARBORG et al., 1990).

Na fase estacionária, as células de *C. crescentus* sofrem mudanças drásticas na morfologia, assumindo uma morfologia helicoidal alongada (aproximadamente 30 μm) e assim como em *E. coli* apresentam um aumento de resistência a estresses (WORTINGER; QUARDOKUS; BRUN, 1998). A entrada na fase estacionária provoca uma diminuição na viabilidade celular e na maioria das células o ciclo celular é interrompido no estágio pré-divisional. Um período prolongado nesta fase provoca um aumento no comprimento das células, chegando a atingir um tamanho de 15 a 20 vezes maior que células mantidas na fase exponencial. Caso as células sejam ressuspendidas em meio fresco, as células helicoidais alongadas dividem-se e retornam ao tamanho e morfologia normais nas primeiras 12 horas (WORTINGER; QUARDOKUS; BRUN, 1998).

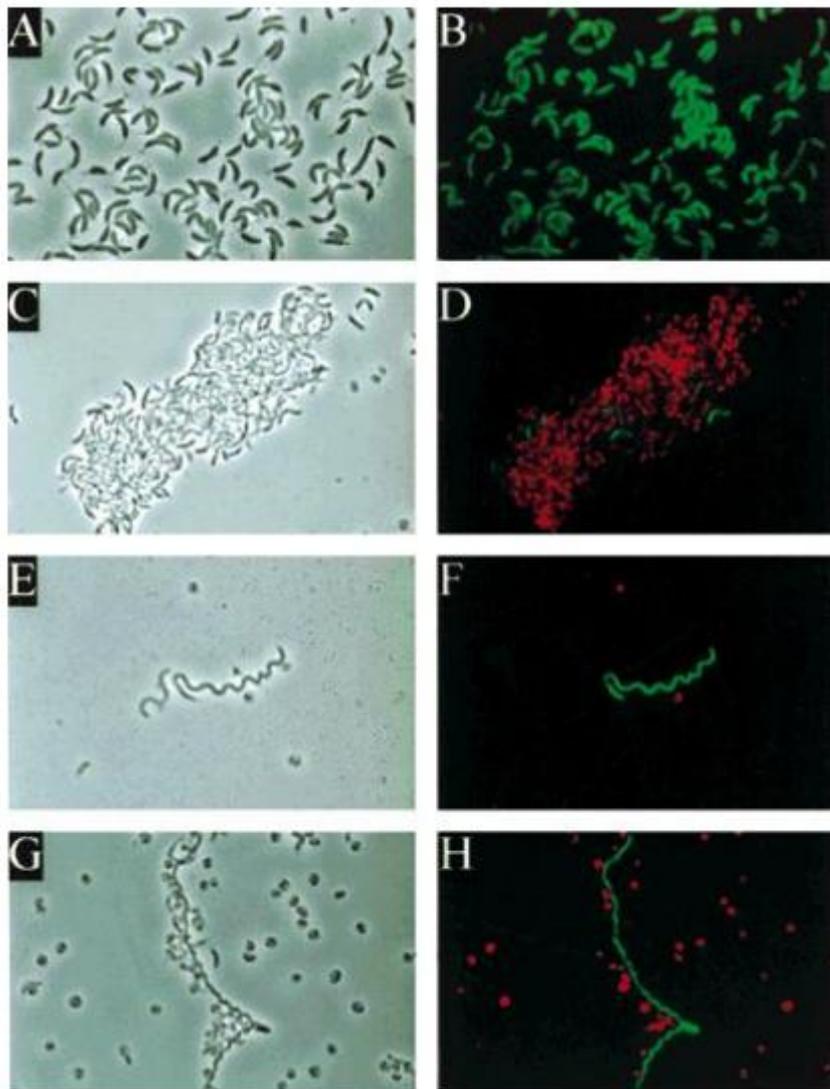


Figura 1: Morfologia de células de *Caulobacter crescentus* nas fases exponencial e estacionária. Na coluna da esquerda são microscopias de contraste de fase e na direita, microscopias de fluorescência com a coloração LIVE/DEAD. As células viáveis são representadas pela coloração verde, e as células mortas são as vermelhas. (A) e (B) são microscopias de culturas em fase exponencial de crescimento. (C) e (D) são microscopias de culturas com 7 dias de incubação, (E) e (F) 14 dias e (G) e (H) 28 dias.

Fonte: Wortinger; Quardokus e Brun (1998).

Várias fontes de carbono podem ser utilizadas por *C. crescentus*, incluindo vários carboidratos (POINDEXTER, 1964), ácidos graxos (O'CONNELL; HENRY; SHAPIRO, 1986), aminoácidos (FERBER; KHAMBATY; ELY, 1988; POINDEXTER, 1964) e compostos aromáticos (CHATTERJEE; BOURQUIN, 1987). A análise do genoma de *C. crescentus* revela que esta bactéria apresenta um potencial para degradar biopolímeros derivados de plantas através da produção de exoenzimas, incluindo celulases e xilanases, xilosidases e deacetilases de polissacarídeos (NIERMAN et al., 2001). Um trabalho recente

indica que receptores de TonB associados a enzimas beta-glicosidasas atuam na degradação de gluco-oligosacarídeos e na assimilação de glicose (PRESLEY et al., 2014). Uma análise de transcriptoma em carência de carbono em *C. crescentus* revelou uma possível estratégia para adaptação ao estilo de vida oligotrófico desta bactéria. Foi observado que a maior parte dos genes que foram induzidos nesta condição apresenta relação com a degradação de compostos conhecidos por serem abundantes em ambientes de água doce, local onde macronutrientes estão disponíveis em concentrações de nível micromolar (ENGLAND et al., 2010).

Através de análises de ensaios de transcriptoma associado com ensaios de proteômica Britos et al. (2010) avaliaram o efeito na regulação gênica em carência de carbono em *C. crescentus*. Os autores observaram uma redução nos níveis de proteínas envolvidas no metabolismo e transporte de aminoácidos, nucleotídeos, carboidratos e motilidade e um aumento nos níveis de proteínas envolvidas na produção e conversão de energia, transporte e metabolismo de íons inorgânicos e mecanismo de defesa durante a carência de carbono. Comparando os dados de proteômica com os de transcriptoma, em 14,8% foram observadas alterações tanto nos níveis de proteínas quanto em níveis transcricionais, indicando uma regulação transcricional. Já outra fração de proteínas (13,6%) teve uma mudança significativa em seus níveis, mas não foi observado alterações na transcrição de seus genes, indicando uma possível regulação pós-transcricional. Interessantemente, SigT e CspC fazem parte deste segundo grupo. Outro dado importante observado foi que uma boa parte dos genes que são mais expressos na resposta a estresse gerado por metais também apresenta a expressão aumentada na carência de carbono (BRITOS et al., 2010), sugerindo que provavelmente esses genes estão relacionados a uma resposta geral a estresses.

1.3 Estresse oxidativo

A forma de vida aeróbica inevitavelmente gera o estresse oxidativo. O oxigênio molecular (O_2) é utilizado para a respiração ou para a oxidação de nutrientes a fim de obter energia, no entanto, as espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), o radical hidroxil ($\cdot OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são geradas continuamente em células cultivadas em condições aeróbicas. A redução incompleta do oxigênio molecular ocorre naturalmente pelo escape de elétrons na cadeia respiratória e é a principal fonte endógena de H_2O_2 , de $O_2^{\cdot-}$ e $\cdot OH$. A exposição a concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS) que excedem a capacidade de defesa celular pode levar a danos às proteínas, aos ácidos

nucléicos e aos lipídeos, desenvolvendo o estresse oxidativo (revisado por STORZ; IMLAY, 1999).

Para enfrentar as espécies reativas de oxigênio as bactérias aumentam a expressão de algumas enzimas, como por exemplo, a enzima catalase, que decompõe peróxido de hidrogênio a água e oxigênio molecular, e proteínas de reparo de DNA. O radical hidroxil é o oxidante mais ativo entre os ROS, e ele apresenta uma curta distância de difusão, devido a sua curta meia-vida. Provavelmente por este motivo, organismos vivos não desenvolveram sistemas enzimáticos específicos para a sua destoxificação, sendo a prevenção a forma mais eficiente de proteger as células dos efeitos deletérios contra este ROS. A prevenção inclui a ação da vitamina C, vitamina E, glutatona, ácido úrico e outras formas de grupos de antioxidantes de baixo peso molecular, que podem até mesmo neutralizar diretamente o $\bullet\text{OH}$ (LUSHCHAK, 2010).

OxyR e SoxR são dois principais reguladores transcricionais bacterianos que coordenam a resposta ao estresse oxidativo, sendo que o primeiro responde ao estresse provocado por peróxido de hidrogênio enquanto o segundo responde ao estresse induzido por ânion superóxido em *E. coli* (LUSHCHAK, 2010). OxyR é conhecido em bactérias do grupo Proteobacteria e nos filos *Bacteroides* e *Actinobacteria*, e é um fator de transcrição da família LysR sensível a peróxido de hidrogênio. OxyR é um polipeptídeo de 34 kD e forma tetrâmeros em solução, e a sua ativação da transcrição *in vivo* é dependente de dois resíduos de cisteína (Cys199 e Cys208), que formam pontes de disulfeto (POMPOSIELLO; DEMPLE, 2001). Estes resíduos de cisteína são altamente conservados e a substituição deles inativa a proteína (LUSHCHAK, 2010). A ativação de OxyR é reversível através da redução da ponte de disulfeto e é dependente de glutaredoxina (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000). OxyR em *E. coli* regula negativamente a expressão de seu gene, *oxyR*, e positivamente o sRNA *oxyS* (CHIANG; SCHELLHORN, 2012). Além disso, regula a expressão de mais de 40 genes envolvidos na resposta a peróxido de hidrogênio, incluindo catalase, glutatona redutase e até mesmo importantes reguladores como Fur (CHIANG; SCHELLHORN, 2012; MONGKOLSUK; HELMANN, 2002; STORZ; TARTAGLIA 1992). Este fator de transcrição também auxilia na proteção contra outros tipos de estresses como choque de calor, radiação UV, oxigênio singlete e danos celulares provocados por peroxidação lipídica (revisado em CHIANG; SCHELLHORN, 2012).

Superóxido dismutases (SODs) são enzimas antioxidantes responsáveis por converter superóxidos a água, e três tipos diferentes foram descritos, MnSOD (SodA), FeSOD (SodB) e CuZnSOD (SodC). Em *Caulobacter crescentus*, Schnell e Steinman, (1995) verificaram que

esta bactéria apresenta duas enzimas superóxido dismutases, uma ferro superóxido dismutase (FeSOD) e uma cobre-zinco superóxido dismutase (CuZnSOD), localizadas no citosol e no periplasma respectivamente. *Caulobacter crescentus* também apresenta o gene *katG* que codifica a enzima catalase-peroxidase, este gene é induzido na presença de H₂O₂ e durante a fase estacionária (STEINMAN et al., 1997). Um estudo feito pelo nosso grupo nesta mesma bactéria mostrou que OxyR regula *katG* na fase estacionária e na resposta a peróxido de hidrogênio e o mutante nulo de *oxyR* é extremamente sensível a peróxido de hidrogênio (ITALIANI et al., 2011).

Análises globais da transcrição vêm demonstrando que alguns dos sigmas ECF (função extracitoplasmática) de *C. crescentus* são importantes para a resposta ao estresse oxidativo. SigE está envolvido na resposta a cádmio, hidroperóxido orgânico, oxigênio singlete e UV (LOURENÇO; GOMES, 2009). SigF está associado à resposta a estresse oxidativo na fase estacionária (ALVAREZ-MARTINEZ; BALDINI; GOMES, 2006) e SigT responde a estresse oxidativo e estresse osmótico (ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2007).

1.4 Cadeia respiratória

O complexo de enzimas da cadeia respiratória de bactérias inclui várias desidrogenases que funcionam como sensores dos elétrons dentro do sistema e duas ou três terminal oxidases que catalisam a redução do oxigênio molecular a água (ANRAKU; GENNIS, 1987). Bactérias aeróbicas frequentemente apresentam varias oxidases respiratórias que permitem às células se adaptarem em ambientes com flutuações de oxigênio (COSSEAU; BATUT, 2004). Os elétrons são introduzidos na cadeia de transporte de elétrons, que contém quinonas, citocromos tipo *b* e citocromo oxidases, citocromo oxidase *bd* ou citocromo oxidase *bo*. Estas duas últimas enzimas são reguladas pela quantidade de oxigênio, sendo que na ausência de oxigênio os níveis de *bo* diminuem, enquanto os níveis de *bd* aumentam. A citocromo oxidase *bo* possui baixa afinidade por O₂, mas uma rápida velocidade de consumo, de forma que o oxigênio é consumido rapidamente quando está em excesso. Já a citocromo oxidase *bd* em baixos níveis de oxigênio apresenta 100 x mais afinidade por O₂, podendo assim ser utilizado (revisto em HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O complexo citocromo c oxidase (*cbb₃*), que catalisa a redução de O₂ a água, é codificado pelo operon *ccoNOQP* e possui alta afinidade por O₂, conseqüentemente é utilizado em condições de baixa concentração de O₂. Esse complexo é formado em média por três ou quatro subunidades em bactérias: a subunidade I é uma citocromo tipo *b* integral de

membrana e é codificada pelo gene *ccoN*, as subunidades II e III são codificadas por *ccoO* e *ccoP* respectivamente, são proteínas citocromo tipo *c* que permanecem ancoradas na membrana, e transferem elétrons do citocromo *c₂* para a subunidade I (COSSEAU; BATUT, 2004).

As enzimas terminal oxidases também vêm sendo associadas à resposta a estresse oxidativo. Lindqvist e colaboradores (2000) mostraram que em *E. coli* mutantes das principais terminal oxidases são sensíveis a H₂O₂ e na ausência de RpoS a produção de citocromo oxidases *bd* aumenta, provavelmente para proteger as células do estresse oxidativo gerado na fase estacionária. Corroborando estes resultados, Borisov e colaboradores (2013) observaram que a oxidase terminal *bd* decompõe H₂O₂. Este oxidase terminal também foi associado à sobrevivência em fase estacionária (SIEGELE; KOLTER, 1993) e em altas temperaturas (GOLDMAN et al., 1996).

Em bactérias, sensores convertem o sinal de alteração no ambiente redox em uma cascata regulatória, normalmente em nível de transcrição, possibilitando uma rápida adaptação a esta situação. Dois grupos de sensores redox são conhecidos: um grupo interage diretamente com a molécula sinalizadora, podendo assim monitorar as mudanças ambientais externas, e o outro grupo interage com componentes ou produtos do metabolismo celular, permitindo sentir as mudanças fisiológicas (GREEN; PAGET, 2004). Através de ensaios de microarranjos de DNA, Crosson et al. (2005) mostraram que em *C. crescentus* FixK, um regulador global da transcrição de terminal oxidases, faz parte de uma cascata regulatória que responde diretamente às concentrações de O₂. Em baixas concentrações de O₂ FixK reprime os operons codificando a terminal oxidase *cytaa3* (CC3402-3407) e a terminal oxidase *cytbo3* (CC1767-1773) que possuem baixa afinidade a O₂, e ativa os operons da terminal oxidase *cytbd* (CC0762-0763) e o da terminal oxidase *cytbb3* (CC1401-1408) que possuem alta afinidade.

Em *E. coli*, a mudança entre metabolismo aeróbio e anaeróbio é controlada por um sensor direto de O₂, Fnr, e indiretamente por ArcAB via interação com a cadeia respiratória (GREEN; PAGET, 2004). ArcA/ArcB pertencem a um complexo sistema de regulação transcricional, que permite a bactérias anaeróbias facultativas sentirem e responderem a flutuações de oxigênio. O sistema de dois componentes consiste de uma quinase localizada na membrana citoplasmática, controlada pelo estado redox de quinonas (ArcB) e um regulador de resposta citoplasmático (ArcA) (IUCHI et al., 1990; UNDEN; BONGAERTS, 1997). Em condições anóxicas, ArcA é fosforilado por ArcB e reprime a expressão de muitos operons envolvidos no metabolismo, e ativa alguns operons que codificam proteínas relacionadas ao

metabolismo fermentativo. Já em condições de crescimento aeróbio, ArcB é ativado por oxidação de seus sítios ativos redox (dois resíduos de cisteína) e desfosforila ArcA (IUCHI et al., 1990). Assim como a terminal oxidase *bd*, a falta do regulador de resposta ArcA provoca sensibilidade a H₂O₂ em *E. coli* (LIU et al., 2009) e em *Salmonella enteritidis* (LU et al., 2002).

RegB é uma histidina quinase, que controla a síntese do fotossistema em resposta a baixas concentrações de O₂ na bactéria púrpura fototrófica *Rhodobacter capsulatus*. Assim como ArcB, as concentrações de oxigênio não afetam diretamente RegB, mas este pode sentir o estado redox da célula. Junto com o regulador de resposta RegA formam um sistema de dois componentes, que está envolvido em uma série de processos de utilização e geração de energia, como cadeia de transporte de elétrons, fixação de carbono, fixação de nitrogênio, entre outros (MITROPHANOV; GROISMAN, 2008; UTSUMI, 2008).

As duas formas de RegA, fosforilada e desfosforilada, são capazes tanto de reprimir como de ativar genes. RegA de *R. capsulatus* regula a síntese de citocromo oxidase *cbb₃* através de ligação direta no promotor do operon *ccoNOQP* e controla também a produção da terminal oxidase do tipo citocromo *bd* (SWEM et al., 2001). Em *P. aeruginosa*, RoxR regula *cioAB* que codifica uma oxidase respiratória insensível a um inibidor da cadeia respiratória, a cianida. Neste estudo, os autores mostraram também que RoxR complementa a falta de PrrA de *R. sphaeroides*, e este último compensa a ausência de RoxR, mantendo a resistência a cianida.

A família de proteínas RegA são divididas em dois grupos, o primeiro grupo possui 100% de conservação do motivo HTH de ligação a DNA e o segundo grupo é similar, mas não possui regiões HTH idênticas (ELSEN et al., 2004). *Caulobacter crescentus* possui representantes dos dois grupos, entre eles, o regulador de resposta SpdR, caracterizado como ativador de CspD pela Dra. Carolina Antunes, pertence ao grupo 1 (SILVA et al., 2010). A montante do gene *cspC* existe uma sequência parecida à sequência na região regulatória de *cspD* reconhecida por SpdR (LANG; MARQUES, 2004; BALHESTEROS, 2009) (**Figura 2**). Adicionalmente, *cspC* e *cspD* apresentam um padrão de expressão semelhante, sendo ambos induzidos na fase estacionária, porém SpdR não se ligou a nenhuma sequência da região regulatória de *cspC* (SILVA et al., 2010). Entretanto, nesta mesma região de *cspC* está presente uma sequência muito similar à sequência de ligação predita da família de proteínas RegA do grupo 2 (**Figura 2**). No meu trabalho de mestrado, através de ensaios de atividade de β-galactosidase, foi observado que *cspC* é autoregulado e provavelmente esta regulação de *cspC* ocorre via estabilização do seu próprio mRNA (SANTOS, 2011). Entretanto, sua

indução na fase estacionária continua ocorrendo no mutante *cspC*, e é dependente da região promotora. Em trabalho anterior, através de deleções sucessivas da região regulatória de *cspC* Balhesteros e colaboradores (2009) mostraram que existe uma região regulatória necessária para esta indução (Figura 2). Estes dados sugerem que um fator de transcrição poderia estar envolvido na ativação de *cspC* na fase estacionária.

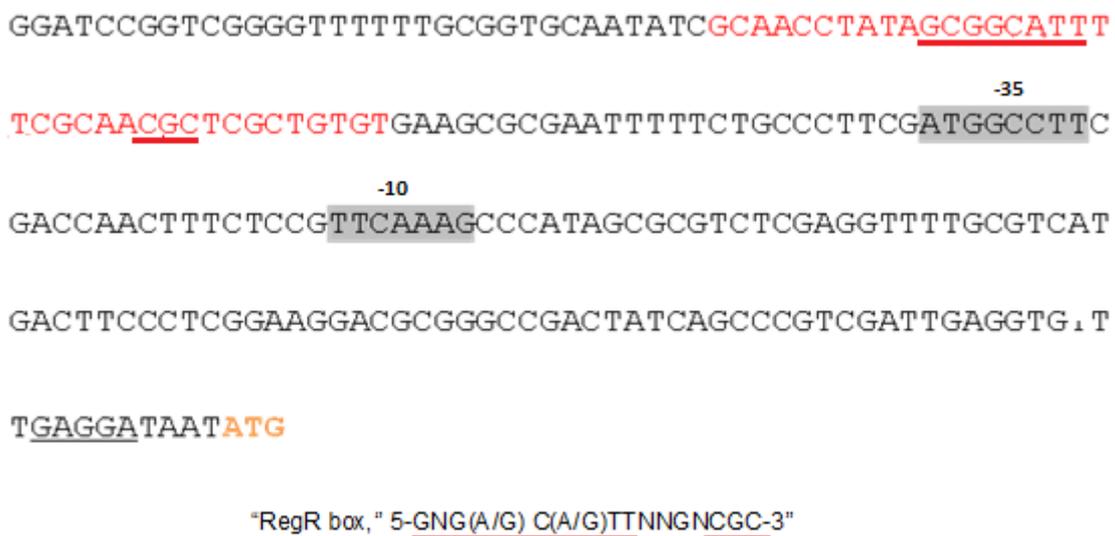


Figura 2: Possível região ativadora de *cspC*. As sequências -35/-10 estão em cinza. O códon de iniciação da tradução está em laranja e sítio de ligação do ribossomo encontra-se sublinhado em preto. Em vermelho, é mostrada a região compreendendo as repetições e os nucleotídeos presentes em *cspD*, constituindo a provável região ativadora de *cspC*, determinada por deleções sucessivas da região regulatória (Balhesteros, 2009). As regiões sublinhadas em vermelho correspondem a região ativadora predita para RegA do grupo 2 como predito por (EMMERICH et al., 2000).

1.5 Proteínas de choque frio

No choque frio ocorre uma mudança drástica na fisiologia da célula, provocando diminuição da fluidez da membrana devido à mudança de um arranjo desordenado para um ordenado das cadeias de ácidos graxos (DE MENDOZA et al., 1983; SINENSKY, 1974). Para retomar a fluidez da membrana, as bactérias aumentam o número de ácidos graxos insaturados nos lipídeos da membrana (MANSILLA; DE MENDOZA, 2005; SINENSKY, 1974). Outro efeito observado no choque frio inclui a desestabilização de estruturas secundárias de RNA conduzindo a uma diminuição na eficiência nos processos de transcrição,

tradução e degradação de RNA. Para enfrentar os efeitos deletérios causados pela formação de estruturas secundárias nos mRNAs no choque frio, as bactérias utilizam dois mecanismos gerais: o primeiro, o aumento da expressão de RNA helicases com o intuito de desfazer as estruturas já formadas, (JONES et al., 1996) e o segundo consiste no aumento da expressão de proteínas de choque frio de baixo peso molecular, as CSPs (“cold shock proteins”) que se ligam ao RNA nascente para prevenir a formação de novas estruturas secundárias (GRAUMANN et al., 1997; JIANG et al., 1997).

As proteínas de choque frio são caracterizadas pela presença de um domínio denominado “Cold Shock Domain” (CSD), contendo os motivos de ligação a ácidos nucleicos, RNP-1 e RNP-2, regiões altamente conservadas (LANDSMAN, 1992) e essenciais para a ligação à RNA e DNA fita simples (SCHRODER et al., 1995). Apenas em bactérias do grupo Alfacproteobactérias, existem proteínas de choque frio que possuem dois domínios CSD, e não se conhece as razões para esta duplicação. Uma proteína de choque frio de mamíferos, Unr, apresenta cinco domínios de choque frio; *unr* é um gene essencial, sendo que ratos com *unr* deficiente morrem com dez dias de desenvolvimento embrionário (BOUSSADIA et al., 1997). Os domínios de Unr apresentam certa redundância na função de ligação a RNA (TRIQUENEAUX et al., 1999). Entretanto, através de estudo de mutações pontuais em cada domínio CSD, Brown e Jackson (2004), mostraram que os cinco CSDs de Unr são necessários para estimular a tradução do local interno para a entrada ribossomal (IRES) do rinovírus humano (HRV).

CspA de *E. coli* é composta por cinco folhas β -pregueadas antiparalelas, com vários aminoácidos aromáticos expostos na superfície formando um barril beta (**Figura 3**). Ensaio de mutações sítio-específicas mostraram que os motivos RNP1 e RNP2 possuem resíduos aromáticos essenciais para a ligação a ssDNA em CspB_{bs} (SCHRÖDER et al., 1995) e essenciais para a atividade antiterminadora de transcrição CspE_{ec} (Figura 3) (PHADTARE et al., 2002).

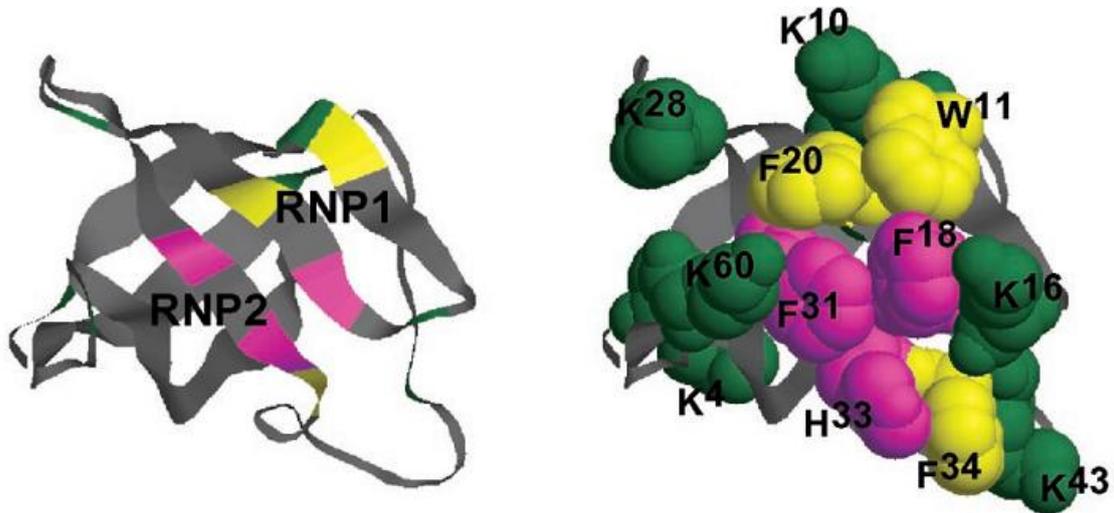


Figura 3. Modelo cristalográfico feito por Raio-X de CspA de *E. coli*. Os motivos de ligação RNP1 e RNP2, estão localizados nas folhas $\beta 2$ e $\beta 3$. O RNP1 Trp¹¹, Phe¹⁸, e Phe²⁰ e o RNP2 Phe³¹, His³³, e Phe³⁴ correspondem aos resíduos de CspE: Trp¹⁰, Phe¹⁷, Phe¹⁹, Phe³⁰, His³², e Phe³³, respectivamente, formando uma compacta superfície de resíduos de aminoácidos aromáticos.

Fonte: Phadtare et al. (2002).

O domínio de choque frio é um dos domínios mais conservados entre bactérias e eucariotos superiores. As CSPs são frequentemente associadas à adaptação ao choque frio, mas também estão envolvidas em outros processos biológicos em condições normais de crescimento. Em eucariotos já foram associadas a importantes processos como reparo de DNA, *splicing* de pré-mRNA e podem ser secretadas da célula para realizar funções extracelulares (revisto em LYABIN, ELISEEVA; OVCHINNIKOV, 2014). Podem provocar efeitos positivos e negativos na transcrição e tradução de células somáticas (MATSUMOTO; WOLFFE, 1998). Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos sobre YB-1 (uma proteína de choque frio de humanos) com intuito de identificar marcadores de transformadores de células malignas e para uso como alvo de terapia de câncer e em processos inflamatórios (revisto em LYABIN, ELISEEVA; OVCHINNIKOV, 2014).

As proteínas de choque frio de eucariotos são conhecidas como proteínas de ligação Y-box (YB). A estrutura do domínio de ligação Y-box de vertebrados apresenta 100% de homologia comparada ao CSD de bactérias (CHAIKAM; KARLSON, 2009). Algumas proteínas Y-box apresentam um papel na regulação da tradução de mRNAs e são conhecidas principalmente como reguladores transcricionais. Diferente das CSPs de bactérias, as proteínas YB-1 apresentam domínios auxiliares e algumas possuem especificidade por sítio de

ligação no RNA, mas a estrutura dos CSDs e o arranjo de motivo de ligação a RNA de eucariotos são similares aos de bactérias.

Bacillus subtilis apresenta três proteínas de choque frio (CspB, CspC e CspD), todas são induzidas no choque frio e CspB e CspC são induzidas também na fase estacionária, sendo que no mínimo uma cópia do gene de uma destas três proteínas é necessária para a viabilidade celular desta bactéria (GRAUMANN; MARAHIEL, 1998; GRAUMANN; MARAHIEL, 1999; GRAUMANN et al., 1997). Uma sobreposição de função entre estas CSPs foi proposta, já que qualquer gene *csp* é suficiente para o crescimento de *B. subtilis* (GRAUMANN et al., 1997; GRAUMANN; MARAHIEL, 1999). Uma redundância entre as CSPs também é observada em *E. coli*, sendo que a linhagem mutante quádrupla BX04 ($\Delta cspA\Delta cspB\Delta cspG\Delta cspE$) é sensível ao choque frio, e a superexpressão de qualquer um dos genes, com exceção de *cspD*, é capaz de complementar o fenótipo de choque frio (XIA; INOUE, 2001).

O papel das proteínas de choque frio (CSPs) em *E. coli* foi amplamente estudado, mostrando que CspC e CspE estão envolvidas na divisão celular e possivelmente na condensação do cromossomo a 37 °C (YAMANAKA et al., 1994). CspE apresenta atividade de antiterminação de transcrição, sendo essencial para a adaptação em baixas temperaturas (PHADTARE et al., 2002). CspD é induzida na carência de carbono e na entrada da fase estacionária e é um inibidor da replicação ao DNA (YAMANAKA et al., 2001). CspD também está diretamente envolvida com o aumento da produção de células persistentes (KIM; WOOD, 2010). Células persistentes são pequenas subpopulações de células dormentes com capacidade de sobreviver ao tratamento de antibióticos sem alterações genéticas (LEWIS, 2007). A resposta a estresses em geral pode funcionar como ativadora de formação de células persistentes. Sistemas toxina/antitoxina são conhecidos por estabilizarem regiões de integrons do cromossomo contra deleções e mediar a adaptação e sobrevivência em condições de estresses. Em *E. coli* sistemas toxina/antitoxina (TA) estão envolvidos na formação de persistentes. Além disso, o bloqueio de muitos reguladores de transcrição, DksA, (p)ppGpp, SsrS e YgfA, já foram descritos como um mecanismo de indução para a formação de células persistentes (LEWIS, 2010). Recentemente, foi descrito que nesta bactéria, a protease Lon está envolvida na regulação de sistemas toxina/antitoxina e conseqüentemente na formação de células persistentes, é responsável por degradar CspD de maneira coordenada conforme a taxa de crescimento. A degradação de CspD é alta em fase logarítmica e é baixa na entrada da fase estacionária e na fase lag, confirmando a função de CspD como inibidora da replicação de DNA em *E. coli* (LANGKLOTZ; NARBERHAUS, 2011).

O papel na célula bacteriana desempenhado pelas CSPs durante a fase estacionária na subdivisão alfa das proteobactérias ainda permanece não esclarecido. *C. crescentus* possui em seu genoma quatro genes codificando CSPs: *cspA*, *cspB*, *cspC* e *cspD*. CspA e CspB são expressas durante o choque frio e apresentam um único domínio CSD. CspC e CspD possuem dois CSDs e são expressas em fase estacionária. As proteínas de choque frio CspA e CspB atingem um pico de expressão 1 hora após o choque frio, e a deleção de *cspA* provoca a perda de crescimento durante o choque frio em *C. crescentus* (MAZZON et al., 2012). Diferente de *E. coli*, a falta de *cspB* de *C. crescentus* provoca uma diminuição sutil no crescimento a 10 °C após 24 horas e o mutante duplo $\Delta cspAB$ apresenta um fenótipo mais severo que o $\Delta cspA$ (MAZZON et al., 2012). Através de ensaios de atividade da beta-galactosidase no mutante $\Delta cspAB$ foi observado que não ocorrem alterações nos níveis de expressão de *cspD*, entretanto, a expressão de *cspC* aumentou na linhagem mutante $\Delta cspAB$, cerca de 40% a mais comparado a linhagem selvagem (MAZZON et al., 2012).

Os genes *cspC* e *cspD* não são induzidos em baixa temperatura, e sim no início da fase estacionária. A transcrição do gene *cspC* já é elevada na fase exponencial, corroborando a afirmativa de Schellhorn e colaboradores que descreveram que a produção de proteínas importantes para adaptação a longos períodos de carência nutricional deve ocorrer enquanto a célula é capaz de uma expressão gênica robusta (SCHELLHORN et al., 1998). Entretanto, os níveis de CspC aumentam no início da fase estacionária, alcançando um acúmulo máximo após 24 horas de crescimento. Já os níveis de CspD, que também aumentam nesta fase, permanecem elevados durante toda a fase estacionária (BALHESTEROS et al., 2010). Foi descrito que o sistema de dois componentes, composto do regulador de resposta, SpdR, e da histidina quinase SpdS apresenta um papel na ativação da expressão do gene *cspD* (SILVA et al., 2010).

cspD não é essencial para o crescimento ou sobrevivência a 30 °C e sua deleção pode ser compensada pela presença de *cspC* (LANG; MARQUES, 2004). Já a falta de *cspC* provoca um aumento na perda da viabilidade celular durante a transição para o período de senescência no início da fase estacionária (BALHESTEROS et al., 2010). Esse fenótipo é mais severo no mutante duplo *cspCD*, indicando que ambos os genes exercem um papel importante na adaptação e na permanência da célula a longos períodos em fase estacionária. A morfologia da célula também é alterada com a falta de *cspC* na fase estacionária; as células são mais longas, possuem um formato mais encurvado e muitas destas células não são mais viáveis. Já no mutante triplo *cspABD* nenhuma alteração na morfologia das células foi identificada e não foi verificada perda da viabilidade neste mutante (BALHESTEROS et al.,

2010). Em *Caulobacter crescentus*, foi proposto que *cspC* é um gene essencial (CHRISTEN et al., 2011), sendo o primeiro gene de proteína de choque frio a ser descrito como essencial para bactérias.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo determinar o papel do gene *cspC* na manutenção da viabilidade de *Caulobacter crescentus* durante a fase estacionária, bem como estudar a importância da duplicação de seus domínios de choque frio. Para isso, as estratégias utilizadas foram as seguintes:

1. Determinar genes expressos diferencialmente no mutante *cspC* na fase logarítmica e estacionária e associá-los à importância de CspC para a manutenção da viabilidade celular;
2. Avaliar o papel do sistema RegA/RegB na regulação de *cspC*
3. Determinar o mecanismo de ação de CspC na regulação dos genes de interesse;
4. Avaliar a estrutura de duplo domínio CSD para a função de CspC.

3 METODOLOGIA

3.1 Condições de crescimento e meios de cultivo utilizados

As linhagens de *C. crescentus* foram cultivadas em meio rico PYE (peptona 2 g/l; extrato de levedura 1 g/l; MgSO₄ 0,2 g/l; CaCl₂ 0,5 mM) ou em meio mínimo M2- glicose (Na₂PO₄ 0,5 g/l; KH₂PO₄ 1,74 g/l; NH₄Cl 1,06 g/l; pH 6,9; FeSO₄ 1 mM; glicose 20%; MgSO₄ 1 mM; CaCl₂ 0,5 mM) (ELY, 1991) ou em meio M2A (meio mínimo sem glicose e contendo 0,2% de acetato), utilizado em ensaios específicos, e incubadas a 30 °C. Quando necessário, os meios de cultivo foram suplementados com canamicina (5 µg/ml), ou tetraciclina (1 µg/ml). Para os ensaios na presença de estresse, foram adicionados quando necessário Paraquat para 500 µM, ou *tert*-butil hidroperóxido para 200 µM ou H₂O₂ para 800 µM.

As linhagens de *E. coli* foram inoculadas e mantidas em temperatura de 37 °C, em meio LB (triptona 10 g/l; extrato de levedura 5 g/l; NaCl 10 g/l; pH 7,5) ou 2 x TY (triptona 16 g/l; extrato de levedura 10 g/l; NaCl 5 g/l; pH 7,5) (AUSUBEL et al., 1995). Quando necessário, os meios foram acrescidos de antibióticos ampicilina (100 µg/ml), canamicina (50 µg/ml), ou tetraciclina (12,5 µg/ml).

Tabela 1 – Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.

	Linhagens	Descrição	Origem /Referência
<i>Escherichia. coli</i>	DH5α	Utilizada para clonagens	(HANAHAN, 1983)
	S17-1	Utilizada para mobilização de plasmídeos	(SIMON, 1983)
	BX04	linhagem mutante quádrupla ($\Delta cspA\Delta cspB\Delta cspG\Delta cspE$)	(XIA; INOUE, 2001)
	BX04 H30R	BX04 complementada com pinIII contendo <i>cspC</i> com troca de base mudando o códon 30 de His para Arg	Este trabalho
	BX04 H137R	BX04 complementada com pinIII contendo <i>cspC</i> com troca de base mudando o códon 137 de	Este trabalho

		His para Arg	
	BX04 H30/173R	BX04 complementada com pinIII contendo <i>cspC</i> com trocas de bases mudando os códons 30 e 137 de His para Arg	Este trabalho
	BX04 + <i>cspA</i>	BX04 complementada com pinIII contendo <i>cspA</i>	Este trabalho
	BX04 + <i>cspB</i>	BX04 complementada com pinIII contendo <i>cspB</i>	Este trabalho
	BX04 + <i>cspC</i>	BX04 complementada com pinIII contendo <i>cspC</i>	Este trabalho
	BX04 + <i>cspD</i>	BX04 complementada com pinIII contendo <i>cspD</i>	Este trabalho
	BX04 + <i>cspE</i>	BX04 complementada com pinIII contendo <i>cspE</i> de <i>E. coli</i>	Este trabalho
	NA1000	Derivado sincronizável da linhagem CB15	(EVINGER; AGABIAN, 1977)
	MM26	NA1000 $\Delta cspC :: \Omega spec^R$	Balhesteros, 2009
	MM26 (pMR20 <i>PcspC-cspC</i>)	NA1000 $\Delta cspC :: \Omega spec^R$ complementada com pMR20 contendo o promotor de <i>cspC</i> e a região codificante de <i>cspC</i>	Balhesteros, 2009
<i>Caulobacter crescentus</i>	MM26 (pMR20- <i>PcspC-cspD</i>)	NA1000 $\Delta cspC :: \Omega spec^R$ complementada com pMR20 contendo o promotor de <i>cspC</i> e a região codificante de <i>cspD</i>	Este trabalho
	MM26 (pMR20- <i>PcspC-domI cspC</i>)	NA1000 $\Delta cspC :: \Omega spec^R$ complementada com pMR20 contendo o promotor de <i>cspC</i> e o primeiro domínio de CspC	Este trabalho
	MM26 (pMR20- <i>PcspC-domII cspC</i>)	NA1000 $\Delta cspC :: \Omega spec^R$ complementada com pMR20 contendo o promotor de <i>cspC</i> e o segundo domínio de CspC	Este trabalho

Tabela 1 continuação

MM26 (<i>P_{cspC}-cspC_{H30R}</i>)	NA1000 $\Delta cspC::\Omega spec^R$ complementada com pMR20 contendo <i>cspC</i> com troca de base mudando o códon 30 de His para Arg	Este trabalho
MM26 (<i>P_{cspC}-cspC_{H137R}</i>)	NA1000 $\Delta cspC::\Omega spec^R$ complementada com pMR20 contendo <i>cspC</i> com troca de base mudando o códon 137 de His para Arg	Este trabalho
MM26 (<i>P_{cspC}-cspC_{H30/173R}</i>)	NA1000 $\Delta cspC::\Omega spec^R$ complementada com pMR20 contendo <i>cspC</i> com trocas de bases mudando os códons 30 e 137 de His para Arg	Este trabalho
$\Delta 1767$	NA1000 $\Delta regA\Omega::tet^R$	Skerker et al. 2005
$\Delta 1768$	NA1000 $\Delta regB\Omega::tet^R$	Skerker et al. 2005

Tabela 2 - Plasmídeos utilizados neste trabalho.

Plasmídeo	Características	Fonte/Referência
pMR20	Vetor de baixo número de cópias e ampla gama de hospedeiros, Tc^r , <i>oriT</i>	Roberts et al. 1996
pINIII	Vetor de expressão derivado do pBR322, Ap^r , com promotor induzível por IPTG utilizado para expressão heteróloga	Inouye, 1983
pBluescript KS	Replicon ColE1, Ap^r	Stratagene ^a
pGEM-T Easy	Vetor de clonagem, Ap^r	Promega ^b
pProEX HTb	Vetor de expressão que adiciona 6 resíduos de histidina à extremidade amino-terminal da proteína cuja seqüência codificadora foi clonada	Invitrogen
pProEX HTb + RegA	Vetor pProEX HTb carregando a região codificante de RegA	Este trabalho
pRKlacZ- <i>PsodB</i>	Vetor pRRKlacZ290 carregando a região promotora de <i>sodB</i> .	Previato, 2014

Tabela 2 continuação

pRKlacZ- <i>PsigT</i>	Vetor pRRKlacZ290 carregando a região promotora de <i>sigT</i> .	Alvarez-Martinez et al. 2007
pRKlacZ- <i>PsigU</i>	Vetor pRRKlacZ290 carregando a região promotora de <i>sigU</i> .	Alvarez-Martinez et al. 2007
pGEM + 1,5 kb	pGEM contendo fragmento de 1,5 kb, compreendendo a região do genoma de NA1000 que contém o gene <i>cspC</i> íntegro	Balhesteros, 2010
TOPO + 1,2 kb	Vetor de clonagem, neo(Km ^r), Ap ^r (Invitrogen), com fragmento de 1,2 kb da região do genoma de NA1000 contendo gene <i>cspC</i> truncado	Lang, 2005
pINIII <i>cspA</i>	Vetor pINIII carregando a região codificante de <i>cspA</i>	Mazzon, 2011
pINIII <i>cspB</i>	Vetor pINIII carregando a região codificante de <i>cspB</i>	Mazzon, 2011
pINIII <i>cspC</i>	Vetor pINIII carregando a região codificante de <i>cspC</i>	Mazzon, 2011
pINIII <i>cspD</i>	Vetor pINIII carregando a região codificante de <i>cspD</i>	Mazzon, 2011
pINIII <i>cspE</i>	Vetor pINIII carregando a região codificante de <i>cspE</i> de <i>E. coli</i>	Phadtare; Inouye; Severinov, 2002
pINIII + H30R	Vetor pINIII carregando a região codificante de <i>cspC</i> com troca de base mudando o códon 30 de His para Arg	Mazzon, 2011
pINIII + H137R	Vetor pINIII carregando a região codificante de <i>cspC</i> com troca de base mudando o códon 137 de His para Arg	Mazzon, 2011
pINIII + H30R/173R	Vetor pINIII carregando a região codificante de <i>cspC</i> com trocas de bases mudando os códons 30 e 137 de His para Arg	Mazzon, 2011

^aStratagene Co., La Jolla, CA, E.U.A.; ^bPromega Co., Madison, WI, E.U.A.

Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Nome	Seqüência (5' → 3')	Finalidade
sodA _{fow}	GCCTTGCAGGAAAGTCTCTGGAT	qRT-PCR
sodA _{rev}	CCATCAAGCTCCAGAAGAGGGTGT	qRT-PCR

Tabela 3 continuação

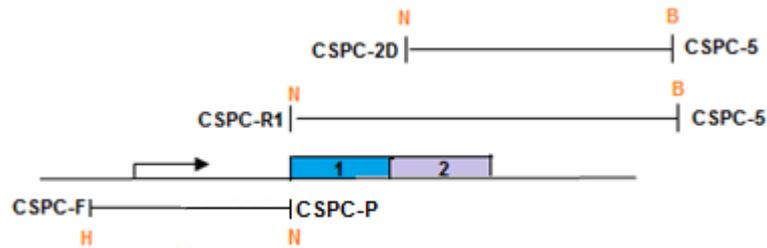
sigU F	ACCTTCATGATCCTGCGCAACCA	qRT-PCR
sigU R	TGGCGCTGTCGAAATTGGTGTT	qRT-PCR
CC0679 F	GCTCCGCTTTGATCTCTGCCTT	qRT-PCR
CC0679 R	TCGATCCGATGAACCCCAACCT	qRT-PCR
CC1773 F	AAGTTTCACGGCATGAGCGAGG	qRT-PCR
CC1773 R	GCAGGACAGGTTGCTTTTCGCT	qRT-PCR
CC0763 F	TCGGGATTCTCCTGATCGGCTT	qRT-PCR
CC0763 R	GTGTTGATCACCATCCGGCGTT	qRT-PCR
CC2331 F	AACTGACGAAGACCCAGGCCAA	qRT-PCR
CC2331 R	CCTGGACCTTGAACTTGCCGAA	qRT-PCR
CC1402 F	TGGCCACCAATGACCTGGACTA	qRT-PCR
CC1402 R	CGAGATCCTTCTTGCGTTGGT	qRT-PCR
CC0903 F	CGACCGGTGCGCCTCTCACT	qRT-PCR
CC0903 R	CGAGAGCAGACCCCCGCGAA	qRT-PCR
CC0285 F	AGGTGGACGTGACCGACAAGAA	qRT-PCR
CC0285 R	AGCAACGCGGTCTTCTGTTTGA	qRT-PCR
CC2880 F	CGGCCGTCGAAAATCTCAGAACA	qRT-PCR
CC2880 R	GACGTTCAAGGCTGTGTCCGAT	qRT-PCR
CC0556 F	CCGGTCGTTTCCAGGATTTGGT	qRT-PCR
CC0556 R	ACCTCAAGGAACATCTCGCGGT	qRT-PCR
CC0682 F	AGGTGCGCCGGCGCTAATATG	qRT-PCR
CC0682 R	AGCACCAACTCTTGCTCCCA	qRT-PCR
CC1765 F	ACCTCCGCTGTGCTGAAAATCC	qRT-PCR
CC1765 R	GCGTAGAGGCCAAAGTCGAACA	qRT-PCR
CC0088 F	AGCGCGACTTTTTGGCTCAGGT	qRT-PCR
CC0088 R	AGGTGCGCGCAAAGTCGAAGAA	qRT-PCR
CC1764 F	GACAGCTCCAAGTTCACCCA	qRT-PCR
CC1764 R	TCCAGCCCGACAGATAGACA	qRT-PCR
CC3581 F	ACAGGTTTTCCCGGTTCTG	qRT-PCR
CC3581 R	ATGTCGCGCCAATAGCCTTC	qRT-PCR
CC1770 F	ACATGAACACCCGGTCTGAG	qRT-PCR
CC1770 R	GGCATCATGTGGGTGTTGAG	qRT-PCR
CC0762 F	ACCTGTGCGGACTACAGTTC	qRT-PCR
CC0762 R	GGGCGCTTGGTCATCACATA	qRT-PCR
CSPC-5	AAAGGATCCGCGGTGAATCAGGCGG	qRT-PCR
H3	AGAATTCAGCGCTCTCGAGGTTTTGCG	qRT-PCR
CSPC-R1	AAACATATGGCGAACGGTGTCTGTTAAG	Construção da linhagem complementada com os domínios de <i>cspC</i>

CSPC-P	AAACATATGATCCTCAAACACCTCAATC G	Construção da linhagem complementada com os domínios de <i>cspC</i>
CSPC-F	AAAAAGCTTCGGGGTTTTTTGCGGTGCA	Construção da linhagem complementada com os domínios de <i>cspC</i>
CSP5-C	AAAGGATCCGCGGTGAATCAGGCGG	Construção da linhagem complementada com os domínios de <i>cspC</i>
CSPC-2D	AAACATATGACGGGCGTCGTGAAGTGG	Construção da linhagem complementada com os domínios de <i>cspC</i>
Reg exp 1	AAGGATCCATGGCTGAACCCAAACGCCC	Expressão de RegA
Reg exp 2	ATAAGCTTTCCACCGTTCAGGAGC	Expressão de RegA

3.2 Construções para os ensaios de complementação fenotípica

A fim de se obter os vetores para complementação do fenótipo do mutante *cspC*, foram construídas as seguintes variantes do gene, clonadas no vetor pMR20, sob controle do promotor endógeno de *cspC*: a) cada um dos domínios CSD da proteína CspC individualmente com intuito de verificar a necessidade da estrutura de dois domínios (**Figura 4**); b) mutantes com substituição nos resíduos de histidinas e fenilalaninas conservadas dentro de cada CSD; c) a região codificadora de *cspD*.

(A)



(B)

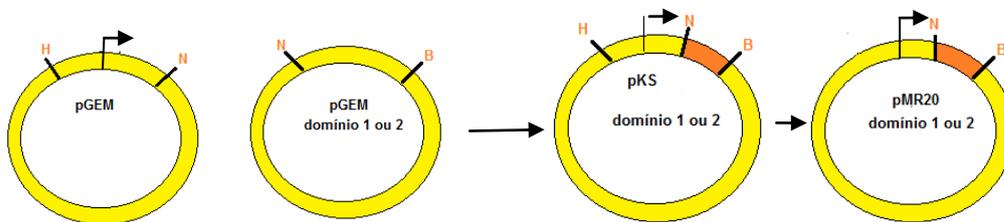


Figura 4. Esquema das construções de complementação dos domínios de CspC. A) mostra as posições dos fragmentos amplificados por PCR para as construções de complementação dos domínios de CspC. De cada lado das barras, estão os oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos: CSPC-F, CSPC-P, CSPC-R1, CSPC-2D e CSPC-5. Na amplificação do primeiro domínio (com os óligos CSPC-R1 e CSPC-5), o vetor utilizado (TOPO + 1,2 kb) não possui o segundo domínio de *cspC*, sendo portanto, amplificado apenas o primeiro domínio e em B) mostra os plamídeos necessários para estas construções e a forma como foram feitas as clonagens. A caixa azul indica o primeiro domínio de CspC e a caixa lilás indica o segundo domínio. H representa a enzima de restrição HindIII; N a enzima NdeI e B a enzima BamHI. As setas dobradas indicam a região promotora promotor de *cspC*.

3.2.1 PCR para construção dos insertos de complementação dos domínios de CspC

Para amplificar o promotor de *cspC* utilizamos os oligonucleotídeos CSPC-F e CSPC-P, para amplificar a região codificando o primeiro domínio de CspC usamos os oligonucleotídeos CSPC-R1 e CSPC-5 e para amplificar a do segundo domínio usamos os CSPC-2D e CSPC-5 (**Figura 5**). Para amplificar os domínios de *cspC* separadamente foi necessário amplifica-los utilizando moldes de DNA diferentes. O molde utilizado para amplificar o segundo domínio foi o gene *cspC* completo construído por Heloise Balhesteros (pGEM +1,5 kb) e o primeiro domínio é um fragmento contendo o gene *cspC* truncado construído através de um plasmídeo (TOPO + 1,2 kb) que foi gerado por PCR obtido no

trabalho de doutorado da Dra. Elza Lang. A primeira anotação do gene *cspC* foi feita com apenas um domínio. No entanto, amplificações por PCR de *cspC*, geravam dois tamanhos de fragmentos (um com o tamanho que era esperado e o outro com 300 pb a mais). O sequenciamento destes fragmentos permitiu identificar o segundo domínio de *cspC*. O primeiro fragmento do tamanho esperado (baseado na anotação do banco de dados KEGG) apresentava o gene truncado (**Figura 5**) e o segundo fragmento com 300 pb a mais apresentava o gene completo contendo o segundo domínio. É possível que as repetições existentes dentro do gene *cspC* possam promover a recombinação deste, de forma que elimine o segundo domínio e produza uma sequência aproximadamente 300 bases menor do que a real.

A reação de PCR foi feita com 50 pmol de cada oligonucleotídeo; 0,2 mM de cada dNTPs; 1,5 mM MgCl₂; 0,5 U de Taq DNA Polymerase Platinum (Invitrogen) e tampão fornecido pelo fabricante. As condições de PCR foram de 95 °C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto. Após os 30 ciclos a reação permaneceu a 72 °C por 7 minutos e em seguida a temperatura foi mantida a 4 °C. As amplificações dos produtos de PCR foram confirmadas através de visualização em gel de agarose 1%. Posterior à corrida, o gel foi corado com gel red e foi visualizado sob luz UV.



Figura 5. Sequência do gene *cspC*. O esquema mostra a região do genoma que contém o gene *cspC*, indicando a sequência do gene truncado que foi utilizada como molde para a construção do primeiro domínio isolado, o início e o fim do gene (sublinhado em azul) e o gene completo contendo o segundo domínio CSD (sublinhado em amarelo). A localização dos oligonucleotídeos está representada pelas setas. A seta preta representa o oligonucleotídeo CSPC-R1 (que foi utilizado para construir o primeiro domínio), a seta roxa representa o CSPC-2D (que foi utilizado para construir o segundo domínio), e a seta laranja representa o CSPC-5 (que foi utilizado como oligonucleotídeo reverso das duas construções).

3.2.2 Sequenciamento de DNA dos insertos

Após confirmação da clonagem do inserto nos plasmídeos (através da digestão destes com EcoRI), a extração do DNA plasmidial foi feita com o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) para o sequenciamento automático com o BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems do Brasil). Para o sequenciamento, foram utilizados os oligonucleotídeos que hibridam no vetor (M13 Forward (-20) e M13 Reverse). Aproximadamente 1 µg de cada minipreparação de DNA plasmidial foi transferido para um tubo contendo 3,2 pmol de um dos oligonucleotídeos, adicionando-se 2 µl do tampão 5 X e 1 µl do “Cycle Sequencing Mix”, em um volume final de 10 µl. Os sequenciamentos foram realizados nas seguintes condições de PCR: 95 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 52 °C por 20 segundos e 60 °C por 4 minutos. Foram adicionados 50 µl de isopropanol 75% aos 10 µl de cada reação para precipitação. Em seguida, esta mistura foi

homogeneizada e permaneceu à temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir, os tubos foram centrifugados por 50 minutos a 1500 x g e 20 °C. Os precipitados passaram por duas lavagens com etanol 70% e então o DNA foi seco a 37 °C por 30 minutos e ressuspendido em 2,5 µl de tampão apropriado. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 2 horas ou durante a noite a 4 °C, e a seguir foram desnaturadas por calor para serem aplicadas no aparelho de sequenciamento ABI-377-36 Autosequencer (Perkin-Elmer Biosystems Inc., Foster City, CA, E.U.A.).

3.3 Ensaio de atividade de β-galactosidase

O ensaio de atividade de β-galactosidase foi feito conforme o método de Miller (1972). Foram inoculadas células da linhagem NA1000, em meio PYE contendo tetraciclina e incubadas a 30 °C durante a noite. Foram utilizadas culturas contendo o plasmídeo pRK*lacZ*290 com a região promotora de interesse. A fase aquosa foi utilizada para a leitura da absorbância a 420 nm, e a absorbância das culturas foi lida a 600 nm antes de iniciar o ensaio. As unidades de atividade de β-galactosidase foram calculadas da seguinte maneira: Unidades = 1000 x [A₄₂₀ / (T x V x A₆₀₀)], onde T = tempo em minutos e V = volume de células em ml.

3.4 Ensaio de expressão de *cspC* em presença de *tert*-butil ou paraquat

As células de NA1000(*PcspC/lacZ*) foram crescidas durante a noite em meio PYE/tetraciclina e incubadas a 30 °C sob constante agitação. Em seguida, as células foram diluídas para uma DO₆₀₀ 0,1 e após atingirem uma DO₆₀₀ de 0,5, as células foram divididas em dois tubos estéreis, ao primeiro tubo foram adicionados 200 µM de *tert*-butil ou 500 µM de paraquat e ao segundo tubo (controle) não foi adicionado nada. Foram feitos ensaios de atividade de β-galactosidase nos tempos 15, 30 e 60 minutos após a adição do estresse.

3.5 Ensaio para determinar a meia vida de mRNA

3.5.1 Preparação das amostras

Para obter uma cultura de fase exponencial ou fase estacionária, 40 ml de células de *Caulobacter crescentus* NA1000 ou do mutante *cspC* foram incubadas por 16 horas a 30 °C

sob constante agitação e diluídas para uma DO_{600} igual a 0,1. Após as células atingirem a $DO_{600} = 0,5$ (fase exponencial) ou 24 horas (fase estacionária) de crescimento, as células foram divididas em 4 tubos. Foram adicionados 2 μ l de 10 μ g/ μ l de rifampicina a cada tubo, e deixados incubando sob constante agitação por tempos determinados (0', 3', 6', 9', 12'), com exceção do ponto 0' que não recebeu nenhum tipo de adição. A seguir, as células foram transferidas para tubos livre de RNase e centrifugadas por 2 minutos a 12000 x g a 20 °C. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 1 ml de Trizol (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Cada suspensão foi transferida para tubos de microcentrifuga e armazenada a -80 °C.

3.5.2 Extração de RNA com Trizol

As suspensões de células em Trizol foram incubadas por 10 minutos a 65 °C. A seguir, adicionou-se 200 μ l de clorofórmio para cada 1 ml de Trizol, os tubos foram invertidos com constante agitação por 15 segundos e depois incubados a temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, a fase superior (transparente) foi removida e transferida para um novo tubo de microcentrifuga. Precipitou-se o RNA da fase aquosa adicionando 500 μ l de isopropanol para cada ml de Trizol utilizado na homogeneização. Após a precipitação o RNA permaneceu 1 hora no gelo seco, e em seguida centrifugou-se por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 1 ml de etanol 75% para cada 1 ml de Trizol utilizado, centrifugando por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido, os precipitados foram secos e ressuspensos com 100 μ l de H₂O MilliQ tratada com DEPC.

3.5.3 Conversão de RNA em cDNA

Os RNAs foram convertidos em cDNA conforme instruções do kit SuperScript III first strand synthesis for RT-PCR da Invitrogen, utilizando 3 μ g de molde de RNA que foram tratados com 5 U de DNase I (Fermentas, Thermo Scientific Inc., MD, E.U.A.) em tampão próprio fornecido pelo fabricante, juntamente com 20 U de inibidor de RNase (RNase OUT, Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil) a 37 °C por 40 minutos.

3.6 RT-PCR quantitativo

O PCR em tempo real foi realizado utilizando 50 ng de cDNA, 0,1 μ M dos oligonucleotídeos para cada gene e 12,5 μ l Syber Green, nas seguintes condições: 50 °C por 2 min; 95 °C por 2 min; 40 ciclos de 95 °C por 15 seg; 60 °C por 1 min. A formação de dímeros entre os oligonucleotídeos e a presença de produtos inespecíficos foram monitoradas por meio de curva de dissociação fornecida pelo sistema ABI 7500 (Applied Biosystem). O método $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi utilizado para medir a expressão relativa de cada gene entre as duas linhagens, NA1000 pMR20 vazio *versus* mutante *cspC* pMR20 ou NA1000 pMR20 *versus* linhagem complementada (mutante *cspC* pMR20-*cspC*) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

3.7 Ensaios de microarranjos de DNA

Uma análise global de expressão gênica do mutante *cspC* versus NA1000 na fase estacionária e exponencial foi realizada utilizando-se a metodologia de microarranjos de DNA. Foram utilizadas as lâminas da Agilent Technologies contendo oligonucleotídeos de 50 nucleotídeos correspondentes às regiões em torno do códon inicial de todas as 3767 ORFs preditas no genoma de *Caulobacter crescentus*. Há um conjunto de oligonucleotídeos parcialmente superpostos (*tiled*) nas lâminas, sendo que cada gene possui de 9 a 11 oligonucleotídeos cobrindo uma região em torno do início de tradução (-300 até +200 do início de tradução +1). Logo, os quatro últimos oligonucleotídeos correspondem mais fielmente à região transcrita de cada gene e somente estes foram utilizados para as análises neste trabalho. A aquisição e utilização das lâminas de *C. crescentus* foram gentilmente permitidas pelo Dr. Michael Laub, do MIT, e adquiridas junto à Agilent Technologies.

Os RNAs de diferentes amostras biológicas (três réplicas) de cada linhagem foram isolados na fase exponencial (DO_{600} entre 0,4 a 0,5) e na fase estacionária (24 horas, DO_{600} entre 1,2 a 1,3), submetidos à reação de transcrição reversa na presença da enzima Super Script III e em seguida, foram marcados utilizando o sistema FairPlay III Microarray Labeling (Agilent). O cDNA foi sintetizado a partir de aproximadamente 20 μ g de RNA na presença de dUTP e oligonucleotídeos randômicos. Após purificação, os cDNAs foram marcados com fluoróforos Alexa 555 (Cy3) ou Alexa Fluor 647 (Cy5) que correspondem aos nucleotídeos modificados. Em seguida, foram misturados com tampão de hibridização, inseridos nas lâminas e hibridizados em forno de hibridização por 24 horas a 65 °C. As lâminas foram então lavadas com soluções contendo SDS, DTT e SSC e em seguida foram escaneadas. A

varredura das lâminas, a extração e normalização dos dados foram realizadas utilizando o programa Agilent Feature Extraction Software 9.0 (Agilent).

A relação de indução dos genes foi calculada na base de \log_2 e foram selecionados os genes com indução $<2,5$ (mutante/parental ou estacionária/exponencial) ou $>2,5$ (mutante/parental ou estacionária/exponencial) no mínimo em três dos quatro últimos oligonucleotídeos nas três replicatas biológicas.

Para validar os genes selecionados nos ensaios de microarranjos de DNA foram realizados ensaios de RT-PCR quantitativo em tempo real na linhagem mutante (mutante *cspC* pMR20), na linhagem selvagem (NA1000 pMR20) e na linhagem complementada (mutante *cspC* pMR20-*cspC*), como descrito no item 3.6. A validação também foi feita através de ensaio de atividade β -galactosidase, descrito no item 3.3.

3.8 Expressão heteróloga de RegA em *E. coli*

3.8.1 Clonagem do gene *regA* e indução da expressão

Inicialmente a região codificadora do gene *regA* foi amplificada a partir do DNA genômico da linhagem NA1000 com oligonucleotídeos adequados (**Tabela 3**) e clonada no vetor pGEM-T Easy (Promega Co., Madison, WI, E.U.A.). Os clones positivos foram sequenciados e após confirmação da sequência, conforme método descrito no item 3.2.2, os plasmídeos foram digeridos com BamHI/HindIII e o fragmento foi isolado para ligação com o vetor de expressão pProEX HTa digerido com as mesmas enzimas. A construção pProEX HTa (*regA*) em *E. coli* DH5 α foi utilizada para indução da expressão do gene *regA*, através da adição de IPTG ao meio de cultura. Uma cultura de *E. coli* DH5 α contendo esta construção foi incubada durante 16 h a 37 °C, sendo diluída para uma DO₆₀₀ de 0,15. Ao atingir uma densidade óptica de aproximadamente 0,5, adicionou-se IPTG para uma concentração final de 0,3 mM. A cultura foi incubada a 30 °C durante 3 horas. Alíquotas foram removidas antes e depois da adição de IPTG, e os extratos foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS 12% com voltagem constante de 200 V por 45 minutos. As proteínas foram visualizadas após coloração do gel com solução de Coomassie Blue R-250 0,05% em metanol 50% e ácido acético 10%, e descoloração do fundo com solução Destain (ácido acético 7%; metanol 5%).

3.8.2 Purificação da proteína RegA

Culturas de 200 ml de *E. coli* DH5 α expressando RegA foram centrifugadas, e os precipitados foram ressuspensos em 20 ml de tampão de lise cada um. As amostras foram então submetidas a sonicação no aparelho Branson Sonifer 450, com 10 pulsos de 15 segundos cada. As amostras foram centrifugadas a 5000 x g a 4 °C, por 45 minutos. Para a análise da eficiência da sonicação, 10 μ l de sobrenadante e uma pequena fração do precipitado foram adicionadas de 50 μ l de solução O 2X (Tris base 0,62 mM; SDS 10%; DTT 0,01 mM; glicerol 0,2%; azul de bromofenol 0,01%; pH 6,8). Em seguida, esta mistura foi fervida e centrifugada por 5 minutos. Ambos foram aplicados em gel de poli-acrilamida-SDS 12% (20 μ l) para avaliar a localização da proteína superexpressa (no precipitado ou sobrenadante). A proteína foi purificada através de cromatografia de afinidade em resina de níquel. A resina (Qiagen) foi equilibrada no dobro de volume de tampão A com 20 mM de imidazol, homogeneizada por 5 minutos e centrifugada por 1 minuto a 4 °C e 10000 x g. Um ml da resina equilibrada foi adicionada ao sobrenadante obtido após a sonicação. A suspensão foi incubada a 4 °C sob agitação por 40 minutos, e centrifugada por 1 minuto a 4 °C e 10.000 x g. A resina foi transferida para outro tubo e lavada com tampão A com 50 mM de imidazol por 3 vezes. A seguir, a proteína His-RegA foi eluída da resina com tampão C (Tris-HCl 20 mM pH 8,5; KCl 100 mM; β -mercaptoetanol 5 mM; glicerol 10%) com concentrações consecutivamente maiores de imidazol (100, 200, 300, 400 e 500 mM).

3.8.3 Ensaio de alteração de mobilidade eletroforética em gel (EMSA)

A região de 300 nucleotídeos a montante do códon de início de tradução do gene *cspC* foi amplificada por PCR com oligonucleotídeos adequados (**Tabela 3**) e purificadas com o kit Qiaquick PCR Purification (Qiagen). As reações de ligação ao DNA foram feitas em um volume de 20 μ l contendo tampão de ligação, DNA competidor de esperma de salmão (0,1 mg/ml), DNA de *cspC* (contendo a região promotora de *cspC* com sua possível região regulatória) e diferentes quantidades da proteína His-RegA purificada (0, 50, 200, 500 nM). Uma reação de controle negativo foi feita com apenas o DNA de *cspC* sem a proteína. Após incubação por 30 minutos a 30 °C, as amostras foram carregadas em gel de poli-acrilamida 8% nativo e submetidas à eletroforese em tampão TBE 0,5X por 1 hora a 25 mA. Os resultados foram detectados por coloração com gel red (Invitrogen).

3.9 Ensaio de Western blotting

O ensaio de Western blotting utilizado seguiu o método descrito por Towbin, Staehelin e Gordon (1979). As linhagens MM26 (pMR20-*PcspC*-H30R), MM26 (pMR20-*pcspC*-H137R), MM26 (pMR20-*pcspC*-H30R/H137R), MM26 (pMR20-*pcspC*-domI), MM26 (pMR20-*pcspC*-domII), MM26 (pMR20-*cspC*) foram cultivadas durante 48 horas de crescimento, centrifugou-se 1 ml de cultura por 5 minutos e em seguida, as células foram ressuspendidas em solução O 2X. Quinze µl de cada amostra foram aplicados em gel de poliacrilamida-SDS 16%, utilizando o padrão de peso molecular Bench Mark Prestained Protein Ladder (Invitrogen) e submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE. Em seguida, as proteínas foram transferidas para um filtro de nitrocelulose por 1 hora a 4 °C, aplicando-se uma corrente de 250 mA. O filtro de nitrocelulose foi corado por 5 minutos com solução de Ponceau e incubado sob agitação por uma hora em TBS (Tris-HCl pH 8,0 10 mM; NaCl 150 mM) contendo 5% de leite desnatado para interromper possíveis ligações inespecíficas. Depois o filtro foi incubado por no mínimo 16 horas com o anti-soro diluído (1:1000 de anti-*CspC*) em TBSTT (Tris-HCl pH 8,0 10 mM; NaCl 150 mM; Tween 20 0,03%; Triton X-100 0,02%). O filtro foi então lavado por 30 minutos, trocando-se a solução a cada 5 minutos. As quatro primeiras lavagens foram feitas em TBST (Tris-HCl pH 8,0 10 mM; NaCl 150 mM; Tween 20 0,05%) e a última em TBS. Em seguida, incubado por 16 horas a 4 °C com o anticorpo anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma), com diluição de 1:5000 em TBS contendo 5% de leite, e o filtro foi lavado como descrito acima. Para a revelação utilizou-se NBT 0,5 mg/ml e BCIP 0,15 mg/ml em tampão de fosfatase alcalina, e a reação foi interrompida com a adição de TE.

3.10 Curva de crescimento em diferentes fontes de carbono

As linhagens mutante *cspC* e NA1000 foram incubadas em temperatura ótima (30 °C), sob agitação, em meio M2 contendo glicose por uma noite. A seguir, foram diluídas para uma DO₆₀₀ de 0,1 e incubadas até uma DO₆₀₀ de aproximadamente 0,3 em meio mínimo com glicose (M2). Em seguida, as células foram centrifugadas por 3 minutos a 12.000 x g, lavadas com meio mínimo sem adição de fonte de carbono e depois ressuspendidas em meio M2 com glicose 0,2% ou acetato de sódio 0,2% como fonte de carbono. As taxas de crescimento foram calculadas por medida da DO₆₀₀ em intervalos regulares. Alíquotas foram centrifugadas a 12.000 x g por 5 minutos a 4 °C e os sobrenadantes foram estocados a -20 °C até as análises

de consumo de acetato. A presença de acetato foi quantificada por cromatografia líquida (HPLC) Ultimate 3000 (Dionex, Sunnyvale, CA, Estados Unidos) com detector por Índice de Refração (Shodex, Kawasaki, Kanagawa, Japan) a 35 °C, coluna HPX-37 87H (Bio-Rad, Hercules, CA, Estados Unidos) a 45 °C, fase móvel de 5 mM de H₂SO₄ com fluxo de 0,6 mL/min. e volume de injeção de 10 µL.

3.11 Ensaio de viabilidade sob choque frio

O ensaio de complementação heteróloga foi realizado com a linhagem de *E. coli* BX04 carregando o plasmídeo pINIII vazio ou contendo os genes *cspA*, *cspB*, *cspC* ou *cspD* de *C. crescentus* (NA1000) íntegros individualmente ou com mutações sítio específicas nos domínios de *cspC* da linhagem *C. crescentus* NA1000 gerando os produtos: CspC(H30R), CspC(H137R) ou CspC(H30R/H137R) (construções feitas pelo Dr. Ricardo Mazzon; MAZZON, 2011). A linhagem BX04 produzida por Xia et al. (2001) é incapaz de formar colônias quando incubada a 15 °C. Esta linhagem foi transformada com cada uma das construções (mutantes e selvagens), bem como com o plasmídeo vazio, além do plasmídeo pINIII carregando o gene *cspE* de *E. coli*. As culturas foram diluídas para uma DO₆₀₀ de 0,1 em meio LB suplementado com ampicilina (50 µg/mL) a 37 °C e quando estas atingiram a DO₆₀₀=1,0, foram semeadas diluições seriadas (10⁻¹ a 10⁻⁵) em placas de LB ágar (contendo ampicilina com ou sem 0,1M de IPTG). As placas foram incubadas a 15 °C por 96 horas quando então o crescimento foi analisado pela contagem do número de U.F.C.

3.12 Ensaio de sobrevivência em estresse oxidativo

3.12.1 Ensaio em meio líquido

As culturas foram cultivadas até a fase exponencial, receberam os agentes estressantes e foram mantidas sob agitação em temperatura ótima (30 °C). Para o teste com H₂O₂, a 3 ml de cultura foram adicionados H₂O₂ para 800 µM e permaneceram com o estresse durante 10 minutos. Removeu-se uma alíquota antes e depois da adição de cada estresse para contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs), em meio sólido PYE com tetraciclina. As placas foram incubadas a 30 °C para crescimento das colônias, que foram contadas após 3 dias de crescimento.

3.12.2 Ensaio em meio sólido

As linhagens testadas foram incubadas durante a noite em meio PYE tetraciclina a 30 °C sob agitação constante. A seguir, as culturas foram diluídas para $DO_{600} = 0,1$ e após 48 h, foram espalhadas em placas de meio PYE e tetraciclina. Após as placas secarem, foi inserido um disco estéril de papel, sobre cada placa, adicionado ao disco 10 μ l de H_2O_2 (3%), e a seguir, as placas foram incubadas a 30 °C. A inibição do crescimento foi avaliada pela medida do diâmetro do halo de inibição após 3 dias de crescimento com adição do estresse.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão divididos em três partes, sendo cada parte discutida individualmente, para facilitar a organização e a compreensão dos dados.

Parte 1 – Análise dos dois domínios CSD para a função de CspC

4.1 Fenótipo da linhagem MM26 e expressão de *cspC* em resposta a agentes oxidantes

Em bactérias o estresse oxidativo e o envolvimento de CSPs não é bem caracterizado. O único relato do envolvimento de CSPs com o estresse oxidativo em bactérias foi descrito em *E. coli*. CspC e CspE de *E. coli* estabilizam o mRNA de um regulador central da fase estacionária, *rpoS* (PHADTARE; INOUE, 2001). Em membros de α -proteobactérias não apresentam ortólogos dos sigmas *rpoS* e *sigB*, sendo assim, provavelmente a resposta geral a estresses é intermediada por diferentes reguladores. Como *C. crescentus* é uma bactéria de vida livre e vive em contato com estresses ambientais constantemente, a resposta ao estresse oxidativo vem recentemente sendo mais bem estudada nesta bactéria. No meu Mestrado identificamos que *cspC* é importante para a resposta a estresse oxidativo, já que o mutante *cspC* é sensível a paraquat e a peróxido de hidrogênio, mas é resistente a *tert*-butil hidroperóxido. A sensibilidade ao composto paraquat foi observada em ensaios de viabilidade, mas não confirmamos se esta sensibilidade é perdida na linhagem complementada MM26 (pMR20-*cspC*) (SANTOS, 2011). Essa informação é importante já que é possível que o mutante *cspC* construído pela Dra. Heloíse Balhesteros apresente uma mutação secundária, visto que o gene *cspC* foi proposto como sendo essencial em *C. crescentus* (CHRISTEN et al., 2011).

Testamos a sensibilidade a este agente das linhagens MM26 (pMR20), na linhagem complementada MM26 (pMR20-*cspC*) e NA1000 (pMR20) na fase exponencial e na fase estacionária (24h e 48h) em ensaios de halo de inibição de crescimento (**Tabela 4**). Como esperado, o mutante *cspC* apresentou uma sensibilidade a paraquat em todos os pontos testados e esta sensibilidade aumenta conforme o andamento das fases de crescimento, coincidindo com o aumento de expressão de *cspC* na fase estacionária. A linhagem complementada MM26 (pMR20-*cspC*) mantém o mesmo padrão de sensibilidade que a

linhagem selvagem, NA1000 (pMR20), mostrando que este fenótipo é realmente devido à falta de *cspC* e não a uma possível mutação secundária.

Tabela 4: Sensibilidade a Paraquat. Os resultados mostram o diâmetro da zona de inibição (em cm). Os valores representam a média de medidas com duas replicatas biológicas cada.

Halo de inibição de crescimento em 10 mM de Paraquat			
Linhagens	Fase exponencial	24hs	48hs
NA1000 (pMR20)	1,15 ± 0,00	1,63 ± 0,14	1,5 ± 0,18
MM26 (pMR20)	1,6 ± 0,13	2,05 ± 0,06	2,52 ± 0,07
MM26 (pMR20- <i>cspC</i>)	0,95 ± 0,06	1,48 ± 0,16	1,38 ± 0,20

No meu Mestrado verificamos que *cspC* não é induzido em condições de estresse oxidativo gerado por H₂O₂. A fim de averiguar melhor o envolvimento de *cspC* na resposta ao estresse oxidativo, ensaios preliminares foram realizados para verificar se a expressão do gene *cspC* é induzida na presença de *tert*-butil hidroperóxido e de paraquat. As culturas foram incubadas até o início da fase exponencial (DO₆₀₀ = 0,3) e uma alíquota foi removida para realizar o ensaio de atividade de β-galactosidase do ponto 0. Em seguida, o agente oxidante foi adicionado, e alíquotas foram retiradas nos pontos 15, 30 e 60 minutos após a adição de *tert*-butil e nos pontos 15 e 30 minutos após a adição de paraquat. A atividade de β-galactosidase foi determinada nas alíquotas removidas dos pontos mencionados. Os resultados estão descritos na **Figura 6** e mostram um pequeno aumento na expressão de *cspC* após 30 minutos da adição dos agentes oxidantes, porém não são significativos. Estes resultados indicam que *cspC* não é induzido em condições de estresse oxidativo por *tert*-butil ou paraquat. Assim estes resultados como um todo sugerem que a sensibilidade do mutante *cspC* a agentes oxidantes é provavelmente resultado de um efeito indireto da perda deste gene.

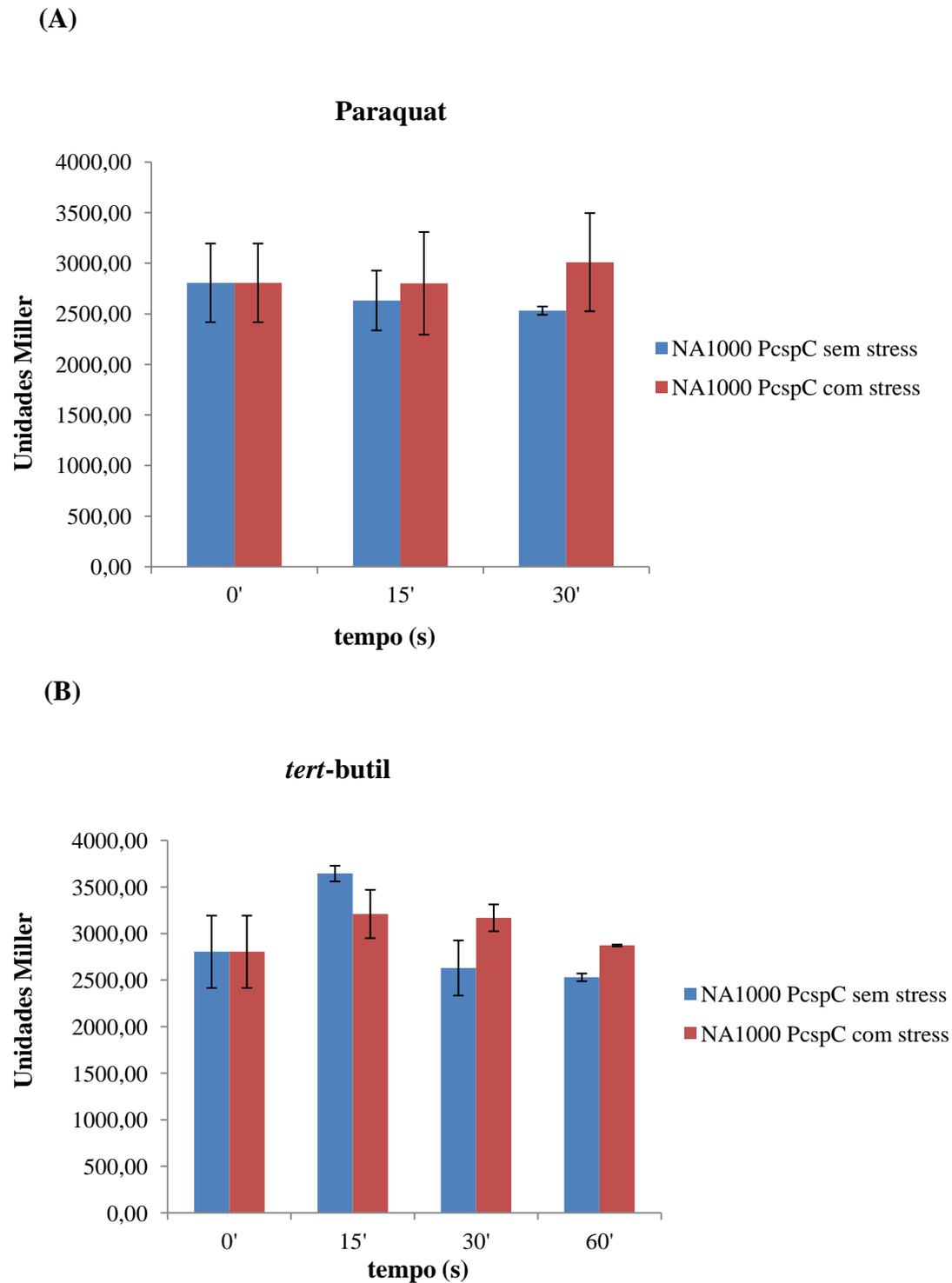


Figura 6. Ensaio de expressão de *cspC* em presença de paraquat e *tert*-butil. Culturas de NA1000 carregando o plasmídeo *PcpsC/lacZ* foram ou não incubadas na presença de (A) paraquat e (B) *tert*-butil. A expressão foi avaliada 15 minutos, 30 minutos após a adição dos agentes oxidantes, em *tert*-butil foi avaliada também no ponto 60 minutos. A expressão foi avaliada por ensaios de β -galactosidase. A significância foi assegurada usando o teste ANOVA e teste de Tukey; $p < 0.01$ (**).

4.2 A duplicação dos domínios de choque frio de CspC e o fenótipo de sensibilidade a estresse oxidativo

As proteínas de choque frio são caracterizadas pela presença de um domínio denominado “Cold Shock Domain” (CSD), contendo os motivos de ligação à ácidos nucleicos, RNP-1 e RNP-2, conhecidas como regiões altamente conservadas, (LANDSMAN, 1992) e essenciais para a ligação à RNA e DNA fita simples (SCHRODER et al., 1995). Entretanto, em *C. crescentus*, as proteínas de fase estacionária CspC e CspD apresentam dois domínios de choque frio (BALHESTEROS et al., 2010; LANG; MARQUES, 2004). Com base no fato de que as proteínas de choque frio de *E. coli* são as que mais foram estudadas entre as bactérias, uma busca por identidade de domínios, comparando as proteínas de choque frio de *E. coli* com os dois domínios isolados de CspC de *C. crescentus* foi feita como abordagem inicial para investigar o papel dessa duplicação de domínios em CspC. Como podemos observar CspEec é a proteína que apresenta maior identidade na sequência de aminoácidos com o primeiro domínio de CspCcc. Com o segundo domínio a CspAec foi a mais próxima em identidade na sequência de aminoácidos (**Tabela 5**). Também comparamos as quatro CSPs de *C. crescentus* através de alinhamento de aminoácidos. As proteínas CspC e CspD apresentam grande similaridade de sequência em seus domínios de choque frio. Entretanto, as regiões amino terminais e as compreendidas entre os dois CSDs de CspC e CspD mostram divergências (**Figura 7**). O primeiro domínio de CspC (CSD1) apresenta similaridade a CspA (72%) e CspB (70%), e o domínio CSD2 apresenta similaridade de 79% com CspA e 68% com CspB.

Tabela 5. Comparação de identidade dos domínios de choque frio de CpsC com os das proteínas de *E. coli*.

	CspAec	CspBec	CspCec	CspDec	CspEec	CspFec	CspGec	CspHec	CspIec
CspCcc (CSD1)	52%	51%	52%	42%	57%	33%	50%	52%	52%
CspCcc (CSD2)	59%	57%	52%	51%	57%	35%	56%	55%	52%

Programa utilizado: BLASTP. Marcados em amarelo os mais próximos em identidade. CSD 1, primeiro domínio de CspC; CSD 2, segundo domínio de CspC.

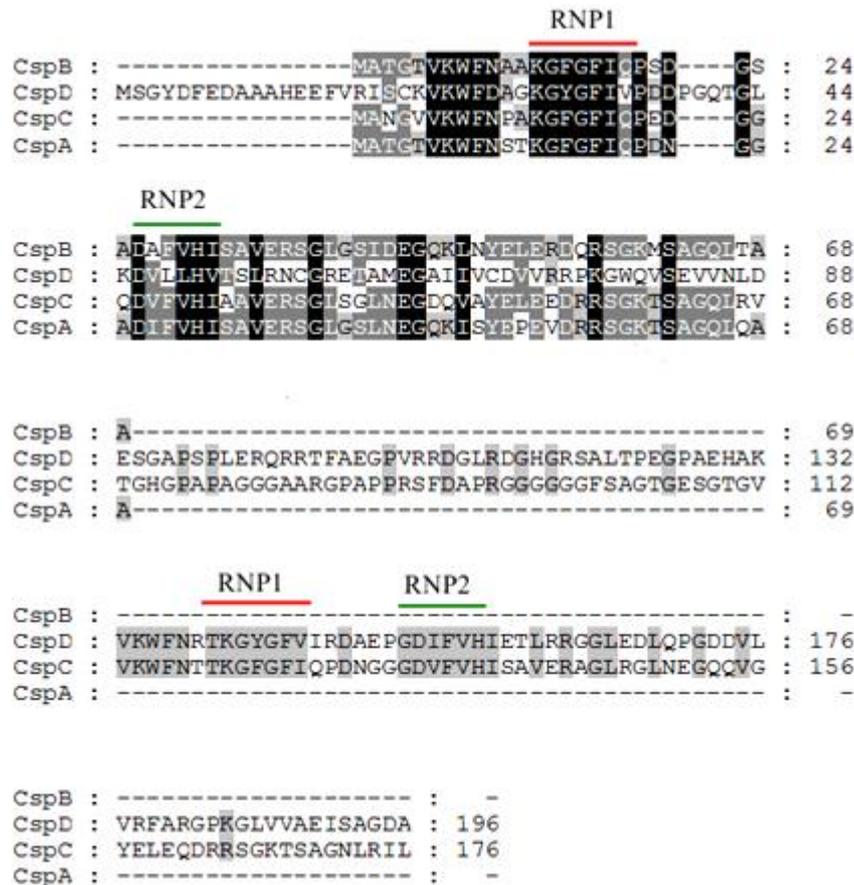


Figura 7. Alinhamento entre as proteínas de choque frio de *C. crescentus*. Os resíduos de aminoácidos em fundo preto indicam aqueles conservados em todas as proteínas comparadas. Os resíduos de aminoácidos sombreados em cinza indicam aqueles conservados em duas das quatro proteínas. Os motivos RNP1 e RNP2 de cada domínio CSD estão demarcados em vermelho e verde, respectivamente. O alinhamento foi realizado utilizando o programa ClustalW2.

Em CspE de *E. coli*, três aminoácidos aromáticos localizados nos motivos RNP-1 e RNP-2 do domínio CSD são essenciais para a atividade antiterminadora de transcrição desta proteína (PHADTARE et al., 2002). Phadtare e colaboradores mostraram que a troca da fenilalanina na posição 17 (RNP-1) e a fenilalanina e histidina nas posições 30 e 32 (RNP-2) por arginina mantém a capacidade de CspE a se ligar a ácidos nucleicos, porém elimina a atividade de desfazer suas estruturas secundárias. Com base neste trabalho, através de alinhamento e predição das estruturas dos domínios de CspC de *C. crescentus* feita com base na estrutura de CspA de *E. coli*, o Dr. Ricardo Mazzon do nosso laboratório verificou que os dois aminoácidos críticos para a atividade de antiterminação de CspE de *E. coli* estão conservados no motivo RNP-2 de CspC de *C. crescentus*. Assim, realizou mutações pontuais no gene, gerando proteínas CspC contendo os dois domínios, mas substituindo a histidina na

posição 30 e 137 por arginina (RNP-2) em cada domínio separado e uma construção com as alterações combinadas, totalizando três construções (**Figura 8**).

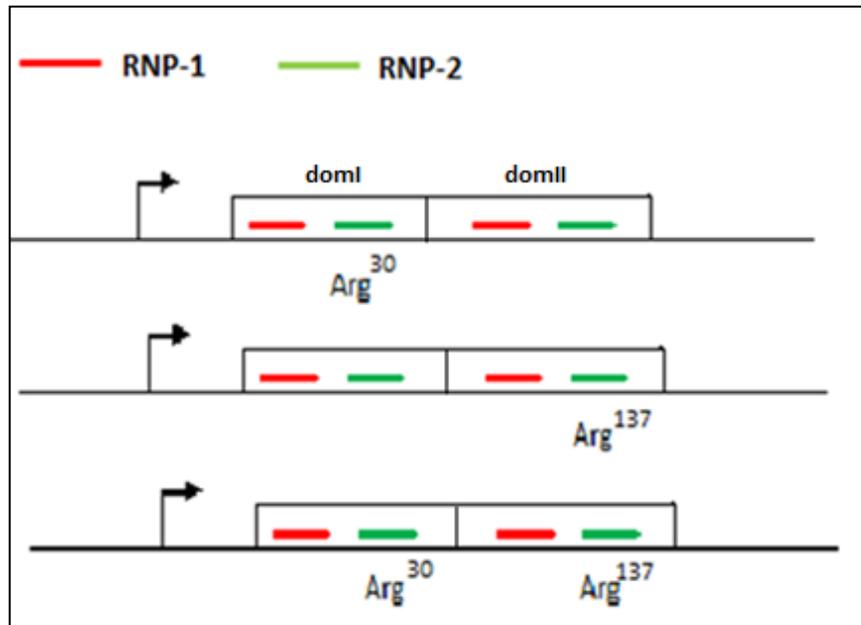


Figura 8: Esquema das construções dos domínios de CspC contendo modificações. As modificações feitas foram a substituição da Histidina nas posições 30 e/ou na 137 por uma Arginina (RNP-2). De cima para baixo, a primeira construção representa a modificação no primeiro domínio de CspC (CspC_{H30R}), a segunda construção no segundo domínio (CspC_{H137R}) e a terceira construção nos dois domínios (CspC_{H30R/H137R}).

Com o intuito de compreendermos melhor o papel dos domínios duplicados em CspC de *C. crescentus*, foi realizada a clonagem das construções de variantes dos domínios desta proteína de choque frio. Os domínios de CspC foram inseridos individualmente no vetor pMR20, à frente do promotor original de *cspC* (**Figura 4B**) gerando as construções pMR20-*PcspCDomI* e pMR20-*PcspCDomII*. Adicionalmente, as construções contendo as mutações pontuais nos domínios de CspC, feitas pelo Dr. Ricardo Mazzon, e também a região codificadora de *cspD* foram inseridas separadamente no vetor pMR20 com o promotor de *cspC* a montante e depois introduzidas no mutante *cspC*. Todas as construções de variantes dos domínios de CspC citadas acima foram utilizadas para realizar os experimentos de complementação do fenótipo, de modo que o mutante *cspC* foi complementado com: a) cada um dos domínios CSD da proteína CspC individualmente, para verificar a necessidade da estrutura de dois domínios; b) domínios com substituição nos resíduos de histidinas conservadas dentro de cada CSD; c) a região codificadora de *cspD*. Para auxiliar a leitura

deste trabalho a **Figura 9** explica como as construções de complementação com variantes ou modificações nos domínios de CspC serão descritas.

Para confirmar se as proteínas destas construções estavam sendo expressas, realizamos um ensaio de *Western blotting* com o soro anti-CspC. As culturas MM26 (pMR20-*cspC*-H30/137R), MM26 (pMR20-*cspC*); MM26 (pMR20-*PcspC*domI), MM26 (pMR20-*PcspC*domII), MM26 (pMR20-*PcspCH*30R) e MM26 (pMR20-*PcspCH*137) foram cultivadas por 48 horas a 30 °C, pois a proteína CspC é mais expressa nesta fase. Apesar de apresentar diferentes quantidades de CspC, a proteína CspC está sendo expressa nas três linhagens contendo CspC com substituição nos resíduos de histidinas dentro de cada CSD (**Figura 10**). Nas construções contendo cada um dos domínios de CspC individualmente não foi observada a presença das proteínas CspC truncadas (**Figura 10**). Embora o soro anti-CspC seja policlonal, é possível que haja necessidade da junção dos dois domínios CSD para que ocorra o reconhecimento de CspC, e neste caso não reconheça as proteínas truncadas.

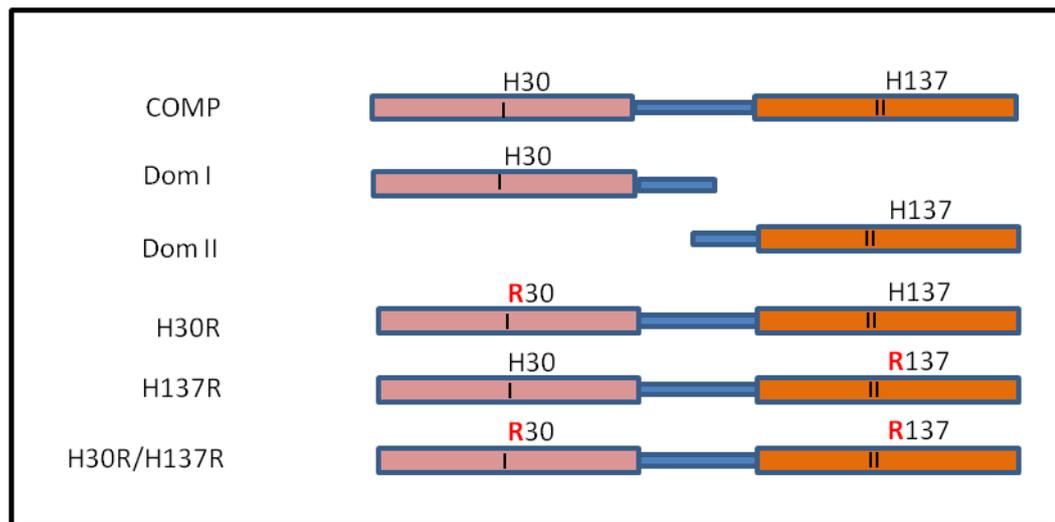


Figura 9: Esquema das construções de complementação dos domínios de CspC. COMP, representa a construção de *cspC* completa contendo os dois domínios e o restante mostra o que foi modificado em cada construção e como será denominada cada construção durante todo o texto. DomI, construção contendo apenas o primeiro domínio de CspC; DomII, construção contendo apenas o segundo domínio de CspC; H30R, substituição da Histidina na posição 30 por uma Arginina (RNP-2); H137R, substituição da Histidina na posição 137 por uma Arginina (RNP-2); H30R/173R, substituição de Histidina por uma Arginina em cada uma das posições nas 30 e 137 (RNP-2).

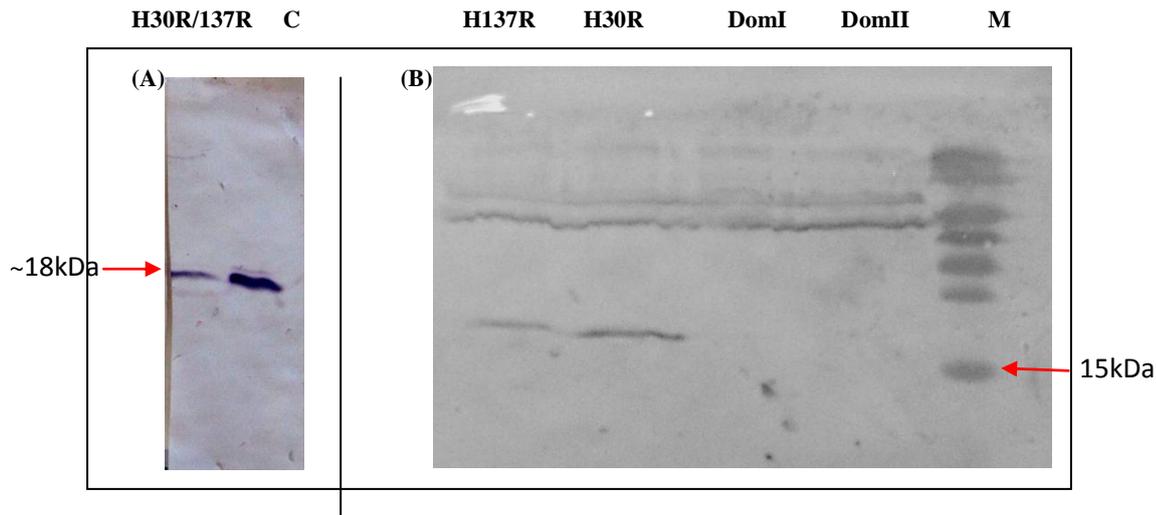


Figura 10. Western blotting com soro anti-CspC. Culturas em fase estacionária tiveram suas proteínas totais extraídas e aplicadas em gel de poliacrilamida-SDS 12%. Após a transferência destas para filtro de nitrocelulose, foi feito um ensaio de *immunoblot* com soro anti-CspC (1:1000) para reconhecimento da banda de ~18 kDa, correspondente à CspC. A canaleta M indica o marcador de peso molecular; H30/137R, MM26(pMR20-*PcspC*-H30/137R); C, MM26(pMR20-*cspC*); H137R, MM26(pMR20-*PcspC*-H137R); H30R, MM26pMR20-*PcspC*-H30R; DomI, MM26(pMR20-*PcspC*-domI); DomII, MM26(pMR20-*PcspC*-domII). Os ensaios de western blotting da figura (A) e da figura (B) foram feitos em dias diferentes.

O oxigênio é utilizado para respiração e oxidação de nutrientes em organismos aeróbios. A geração constante de produtos reativos de oxigênio, como radical ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^\cdot) em células em crescimento aeróbio, pode causar a oxidação de macromoléculas (DNA, lipídeos e proteínas) (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000). Inicialmente observamos a viabilidade das linhagens complementadas frente a peróxido de hidrogênio, já que o mutante *cspC* é muito sensível a este agente (SANTOS, 2011). As culturas foram cultivadas até a fase exponencial, receberam o estresse (H_2O_2 para 800 μ M) e foram mantidas sob agitação em temperatura ótima (30 °C) durante 10 minutos. Removeu-se uma alíquota antes e depois da adição do estresse para contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs), em placas de meio sólido PYE com tetraciclina incubadas a 30 °C.

Os resultados mostraram que a complementação de *cspC* com o primeiro ou com o segundo domínio individualmente não restaura a resistência a H_2O_2 , e não suprimiu a falta de CspC completa (**Figura 11**). As mutações nas histidinas de cada domínio levaram a uma complementação parcial do fenótipo, sugerindo que os aminoácidos críticos para a atividade de antiterminação de CspE de *E. coli*, também são importantes para a função de CspC na resposta ao estresse oxidativo. Na viabilidade em peróxido de hidrogênio, quando trocamos a

histidina nas posições 30 e 137 a sensibilidade parece até maior comparada ao mutante *cspC*, podendo sugerir que a proteína CspC com defeitos pode ser mais prejudicial para a célula que a falta de *cspC*, porém, as análises estatísticas não mostram diferenças significativas entre os resultados do mutante *cspC* e da complementação com os dois domínios contendo mutações sítio dirigidas (**Figura 11**).

Devido as semelhanças encontradas entre CspC e CspD: (I) as duas são induzidas na fase estacionária; (II) apresentam dois domínios CSDs; e (III) apresentam grande similaridade de sequência em seus domínios de choque frio; também testamos a sensibilidade a peróxido de hidrogênio do mutante *cspC* complementado com a região codificadora de *cspD* sob expressão do promotor de *cspC*. Como pode ser observado, *cspD* complementa apenas parcialmente o fenótipo do mutante *cspC* (**Figura 11**). Interessantemente, o mutante *cspD* não é sensível a peróxido de hidrogênio (Dra. Carolina Antunes, comunicação pessoal) sugerindo que a maior dose gênica de *cspD* pode compensar parcialmente a falta de *cspC*. Esses resultados reafirmam a importância de *cspC* para *Caulobacter crescentus* e corroboram a proposta de que *cspC* é um gene essencial, descrita por Christen et al. (2011).

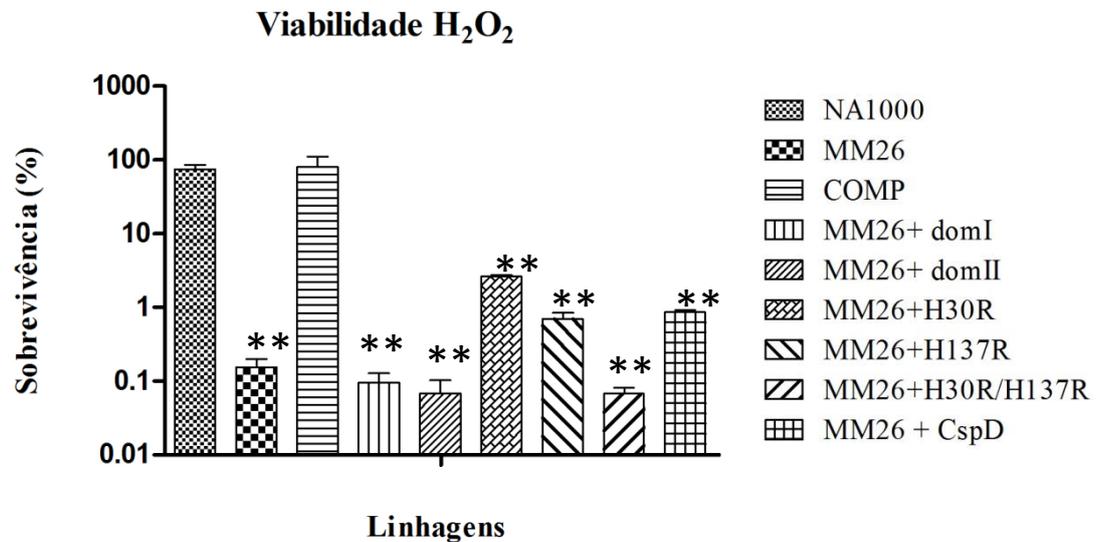


Figura 11 - Sobrevivência relativa das linhagens NA1000 e mutante *cspC* com variantes em H₂O₂ em fase exponencial. A sobrevivência relativa foi determinada como sendo a porcentagem da razão entre o número de UFCs obtido e o número de UFCs inicial. NA1000, NA1000(pMR20); MM26, MM26(pMR20); COMP, MM26(pMR20-*cspC*); MM26+*CspD*, MM26(pMR20-*PcspC-cspD*); MM26+H30R, MM26(pMR20-*PcspCH30R*); MM26+H137R, MM26(pMR20-*PcspCH137R*); MM26+H30R/173R, MM26(pMR20-*PcspCH30R/173R*). Os valores representam a média de medidas de três replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. A significância foi assegurada usando o teste ANOVA e teste de Tukey; $p < 0.01$ (**) comparando com a linhagem referência, NA1000.

Foram testadas também as complementações com as variantes dos domínios de *CspC* frente ao fenótipo de sensibilidade a peróxido de hidrogênio na fase estacionária (48 horas de crescimento). As culturas em fase estacionária foram misturadas em meio sólido PYE com tetraciclina. Após secas, discos de papel, contendo 3% de H₂O₂ foram colocados sobre as placas, e após 24 horas de crescimento o halo de inibição de crescimento formado foi medido. A complementação do mutante *cspC* com o primeiro domínio apresenta uma menor sensibilidade a H₂O₂ comparado com o segundo domínio no tempo testado. Entretanto, esse dado não foi confirmado através de análise estatística, mostrando que tanto os resultados do primeiro domínio quanto os do segundo domínio não são significativamente diferentes dos resultados do mutante *cspC* e da linhagem selvagem NA1000, podendo sugerir uma complementação parcial quando complementamos com cada domínio individualmente (**Figura 12**). Baseando-se nas análises estatísticas, a construção contendo a troca na histidina

na posição 30 foi a única construção que complementou o fenotipo de sensibilidade a H₂O₂ do mutante *cspC* totalmente no tempo testado, já na troca da histidina na posição 137 observamos uma complementação parcial. A sensibilidade a H₂O₂ não foi restaurada quando complementamos o mutante *cspC* com o gene *cspD*, também não ocorreu complementação na construção com mutações sítio dirigidas nos dois domínios, indicando que a troca destes dois resíduos de histidina torna a proteína não funcional (**Figura 12**).

A morfologia das células das linhagens complementadas foi analisada na fase estacionária através de microscopia óptica (**Figura 13**). Percebe-se que o mutante *cspC* apresenta uma morfologia alterada com células retorcidas e mais curvas comparado às linhagens selvagem NA1000(pMR20) e complementada MM26(pMR20-*cspC*), e esse fenótipo já havia sido observado pela Dra. Heloise Balhesteros (BALHESTEROS et al., 2010). Esse fenótipo não foi complementado por nenhuma das construções de complementação, somente com a proteína completa (**Figura 13**). A linhagem complementada com o domínio I apresenta um fenótipo similar ao mutante *cspC*, o mesmo se observa nas complementações do gene *cspC* contendo mutações nas histidinas de cada domínio. Já na complementação com o domínio II, as células além de apresentarem o fenótipo do mutante *cspC* são mais alongadas. Um efeito similar de células alongadas foi observado na complementação com *cspD*. CspD em *E. coli* é descrita como inibidora da replicação e sua superexpressão provoca mudança na morfologia com células alongadas e com morte celular (YAMANAKA et al., 2001). O plasmídeo escolhido para as construções de complementação deste trabalho foi o pMR20, que apresenta um baixo número de cópias. Esses dados juntos levantam a hipótese de que as cópias adicionais do gene *cspD* oriundas da complementação, além do gene *cspD* que a linhagem mutante *cspC* possui, podem ter proporcionado o alongamento celular observado. Interessantemente, o fenótipo mais severo observado foi na complementação contendo mutações pontuais nos dois domínios, onde as células se tornaram filamentosas. Este tipo de fenótipo pode indicar células com defeito mais pronunciado na divisão celular.

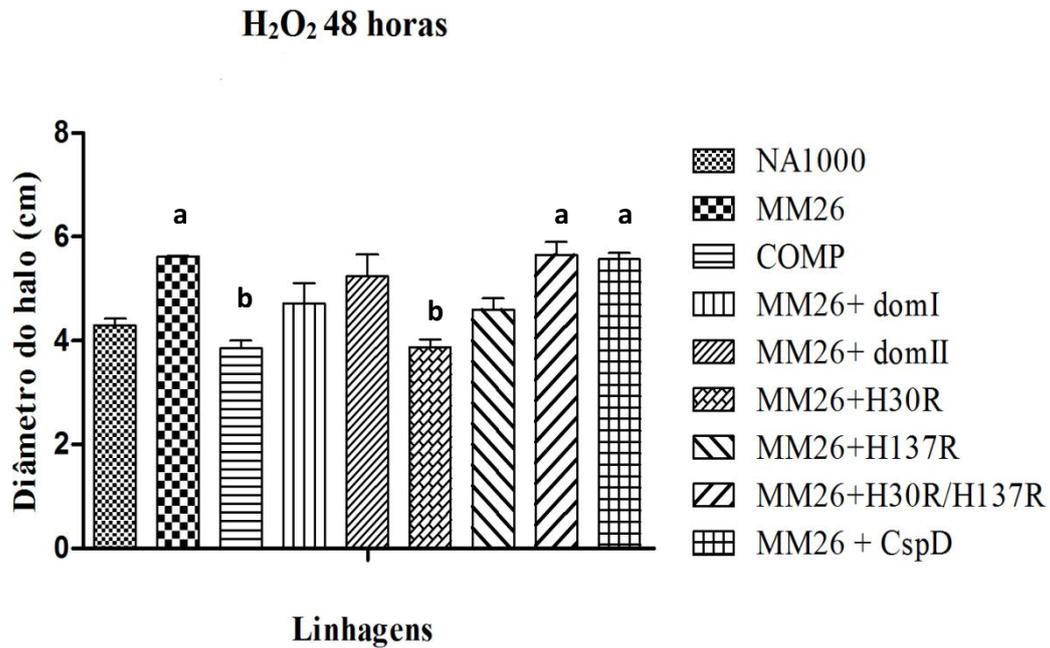


Figura 12: Ensaio de sobrevivência a H₂O₂ em meio sólido na fase estacionária tardia (48 horas). Os resultados mostram o diâmetro da zona de inibição (em cm). Os valores representam a média e o desvio-padrão de experimentos com três replicatas biológicas cada. A significância foi assegurada usando o teste ANOVA e teste de Tukey; $p < 0.01$ (**) comparado com a linhagem referência, NA1000 em ^a e comparado a linhagem MM26 em ^b.

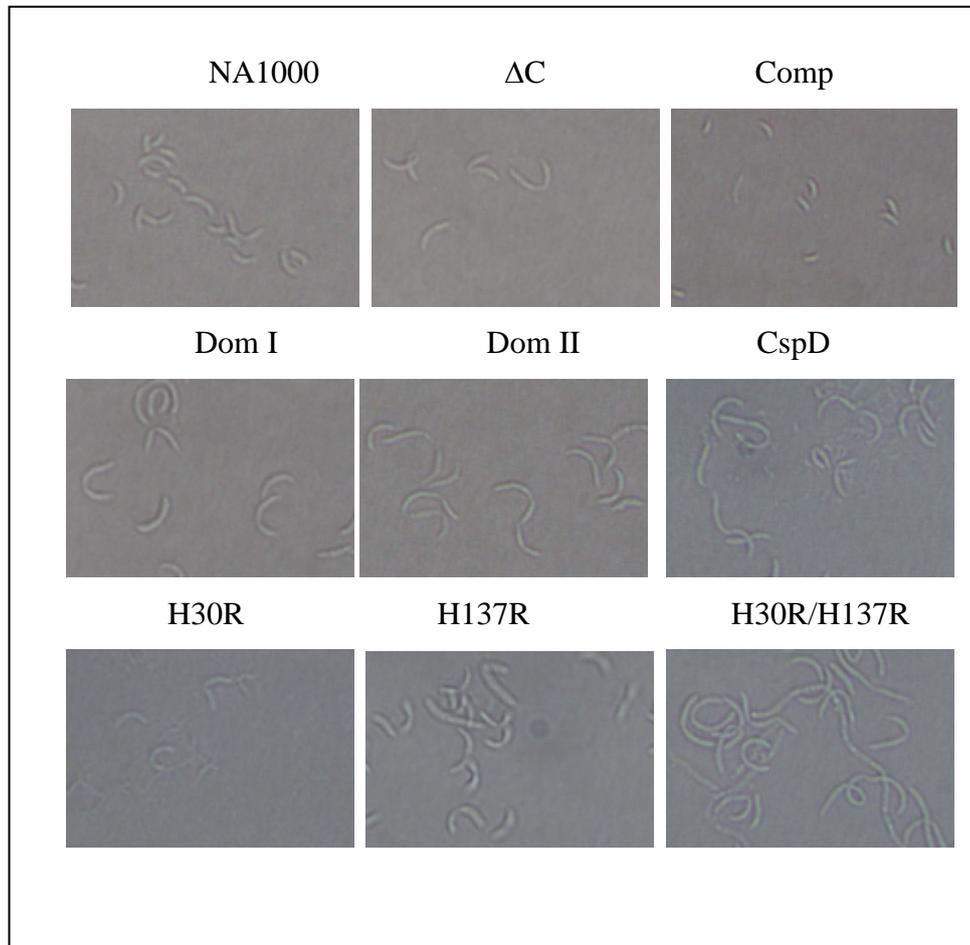


Figura 13. Microscopia óptica na fase estacionária. As linhagens foram incubadas em meio PYE/tetraciclina por 24hs e lâminas foram preparadas para microscopia óptica. NA1000, NA1000 (pMR20); ΔC , MM26(pMR20); COMP, MM26(pMR20-*cspC*); DomI, MM26(pMR20-*PcspC* –domI); DomII, MM26(pMR20-*PcspC*-domII); CspD, MM26(pMR20-*PcspC*-*cspD*); H30R, MM26(pMR20-*PcspCH30R*); H137R, MM26(pMR20-*PcspCH137R*); H30R/H137R, MM26(pMR20-*PcspCH30R/H137R*).

Para facilitar a comparação dos resultados de complementação, construímos uma tabela com todos os resultados que obtivemos nesse trabalho relacionados à análise dos dois domínios CSD de *cspC* (**Tabela 6**). Comparando os dados da viabilidade adicionando H_2O_2 na fase exponencial e a medida do halo de inibição por H_2O_2 na fase estacionária, o que se verifica é que, apesar de apresentarem valores distintos já que são ensaios diferentes e em fases diferentes, uma tendência é observada onde, comparando o primeiro domínio com o segundo domínio, o primeiro domínio complementa um pouco melhor que o segundo.

Entretanto, nenhuma das duas construções complementam totalmente a função de CspC frente ao estresse oxidativo. Nas mutações sítio-dirigidas, diferente da troca da histidina na posição 137, a troca da histidina na posição 30 não impede a complementação do fenótipo frente ao estresse oxidativo em 48 horas de crescimento, e complementa parcialmente em fase exponencial (18,28%), sugerindo que a histidina na posição 137 pode ser importante para a função de CspC frente ao estresse oxidativo na fase exponencial. As construções que obtiveram os resultados que menos complementaram ou não foi observada complementação foram CspD e a troca das histidinas nos dois domínios, sugerindo que apesar das semelhanças identificadas entre CspC e CspD, CspD não é capaz de complementar a falta de CspC frente ao estresse oxidativo. Além disso, assim como ocorre em *cspE* de *E. coli* que perde a função de antiterminação quando é feito a troca dos três aminoácidos aromáticos críticos, *cspC* também pode perder a sua função e a resposta frente ao estresse oxidativo. Na morfologia das células em 24 horas de crescimento, também observamos uma tendência semelhante das complementações, tendo como o resultado mais interessante a morfologia filamentosa que as células assumem quando trocamos a histidina nos dois domínios. Este fenótipo é bem característico de células com problemas na divisão celular, podendo indicar que uma proteína não funcional altamente expressa na célula pode ser mais prejudicial à célula que a própria falta de *cspC*. Juntando todos esses resultados podemos observar a importância de *cspC* para *Caulobacter crescentus* já que com exceção da construção contendo a troca da histidina na posição 30 nenhuma outra construção complementa totalmente os fenótipos de *cspC* analisados e também mostra a importância das trocas na histidina nas posições 30 e 137 dos dois domínios que provavelmente gera uma proteína não funcional.

Tabela 6: Resumo da média dos resultados das construções de complementação frente aos fenótipos do mutante *cspC* baseando-se nos resultados obtidos nesse trabalho.

Linhagens	H₂O₂ 48 hs	H₂O₂ fase exponencial	Morfologia 24 hs
NA1000	100%	100%	
MM26	75,82% ^a	0,21%	Células retorcidas e mais curvas
COMP	110% ^b	106,86%	
MM26+ DomI	90%	0,13%	Manteve o fenótipo da linhagem MM26
MM26+ DomII	79%	0,07%	Manteve o fenótipo da linhagem MM26 e com células mais alongadas
MM26+ H30R	110% ^b	18,28%	Manteve o fenótipo da linhagem MM26
MM26+ H137R	93%	0,94%	Manteve o fenótipo da linhagem MM26
MM26+ H30R/H137R	68,60% ^a	0,09%	Células filamentosas
MM26+ CspD	70% ^a	1,15%	Manteve o fenótipo da linhagem MM26 e com células mais alongadas

^a e ^b representam os resultados das análises estatísticas realizados nos ensaio de sobrevivência a H₂O₂ em meio sólido na fase estacionária tardia (48 horas). ^a comparando com a linhagem referência, NA1000 em e ^b comparando a linhagem MM26. Para que os ensaios na fase estacionária e na fase exponencial fossem comparativos, nesta análise consideramos o valor da NA1000 como sendo 100% e calculamos a porcentagem de complementação das outras linhagens em cima desse valor.

4.3 Complementação do fenótipo de choque frio da linhagem *E. coli* BX04 com proteínas de choque frio de *Caulobacter crescentus*

A linhagem BX04 de *E. coli* não possui quatro genes de proteínas de choque frio (*cspA*, *cspB*, *cspE*, *cspG*) e é incapaz de crescer a 15 °C (XIA; INOUE, 2001). Para verificar se as proteínas de choque frio de *C. crescentus* conseguem complementar o severo fenótipo de choque frio observado na linhagem BX04, construções com o vetor de expressão controlada pINIII contendo os genes das proteínas de *C. crescentus* (*cspA*, *cspB*, *cspC*, *cspD*) íntegros e individualmente (construções feitas pelo Dr. Ricardo Mazzon; MAZZON, 2011) foram inseridas na linhagem BX04. Adicionalmente, as construções contendo os domínios de choque frio de *cspC* pINIII-*cspC*DomI ou pINIII-*cspC*DomII, ou contendo mutações sitio dirigidas pINIII-*cspCH*30R, pINIII-*cspCH*137R, pINIII-*cspCH*30R/H137R também foram inseridas individualmente nesta linhagem. As culturas foram semeadas em meio LB com ampicilina e quando alcançaram a DO600 = 1,0 foram semeadas diluições seriadas em placas

de LB ampicilina contendo ou não IPTG, já que o vetor pINIII possui um promotor induzido por IPTG, e foram mantidas a 15 °C por 96 horas. Foi utilizado como controle positivo a linhagem BX04 contendo o gene *cspE* de *E. coli* no mesmo vetor, que é capaz de complementar esse fenótipo, e como controle negativo esta mesma linhagem, porém, carregando o vetor pINIII vazio.

Após 96 horas de crescimento a 15 °C foi observado que, com exceção de CspC, a qual apresentou uma sutil complementação, nenhuma proteína de choque frio de *C. crescentus* é capaz de complementar o fenótipo de sensibilidade ao frio de *E. coli* BX04. Entretanto, diferente do esperado, os domínios de choque frio de CspC de *C. crescentus* individualmente são capazes de complementar este fenótipo, sendo que a linhagem complementada com o primeiro domínio apresenta uma menor sensibilidade ao frio quando comparada com a linhagem complementada com o segundo domínio (**Figura 14A**). Como as CSPs de *E. coli* apresentam apenas um domínio CSD, pode-se especular que as complementações com apenas um dos dois domínios de *cspC_{cc}* possa ter uma conservação funcional maior, compartilhando assim funções com as CSPs de *E. coli*, por esse motivo provavelmente a complementação foi bem mais eficiente comparado a proteína completa codificada por *cspC_{cc}*. A **Figura 14B** mostra o crescimento normal da linhagem BX04 com todas as construções de complementação individuais testadas em temperatura ótima de crescimento (37 °C).

(A)

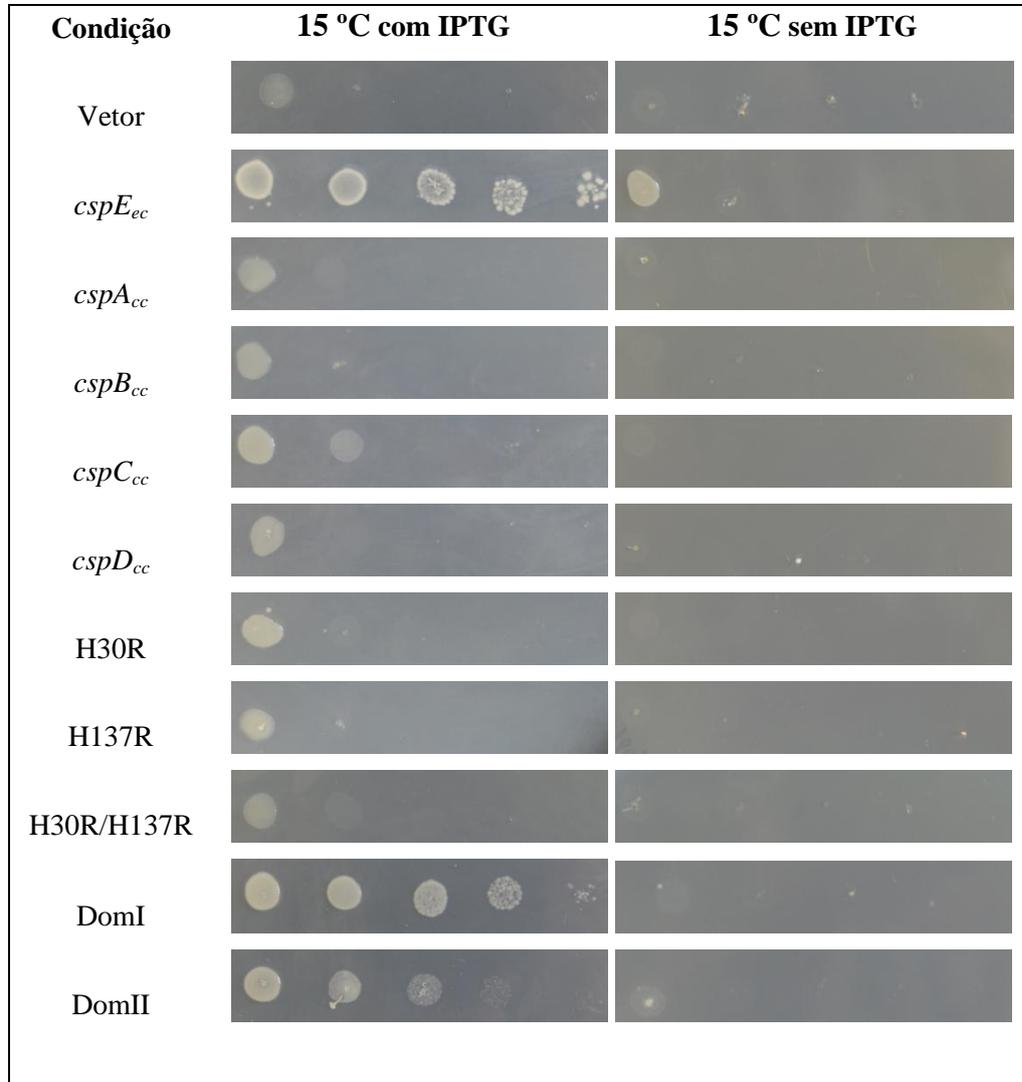


Figura 14: Efeito das CSPs de *Caulobacter crescentus* no crescimento de *E. coli* (BX04) a 15 °C. Foram feitas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-5}) na DO600 = 1.0 de células BX04 expressando cada gene de *Caulobacter crescentus* ou expressando as construções com variações do gene *cspC* em placas de LB ampicilina contendo ou não 0.1 M de IPTG e foram mantidas em (A) a 15 °C ou em (B) a 37 °C por 96 horas.

(B)

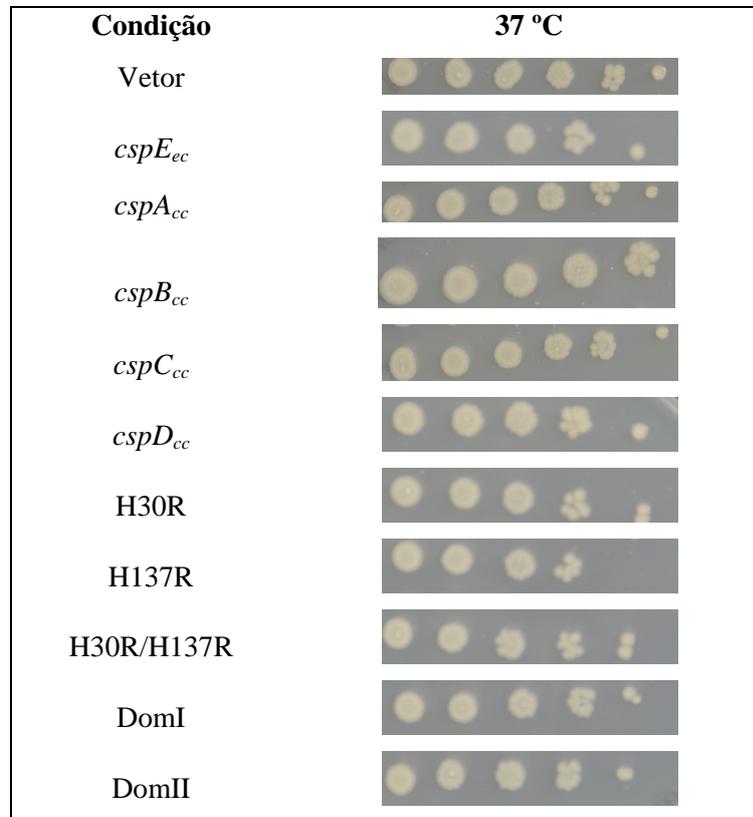


Figura 14 (continuação). Efeito das CSPs de *Caulobacter crescentus* no crescimento de *E. coli* (BX04) a 15 °C. Foram feitas diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-5}) na DO600 = 1.0 de células BX04 expressando cada gene de *Caulobacter crescentus* ou expressando as construções com variações do gene *cspC* em placas de LB ampicilina contendo ou não 0.1 M de IPTG e foram mantidas em (A) a 15 °C ou em (B) a 37 °C por 96 horas.

Interessantemente, uma complementação de fenótipo do mutante BX04 também foi observada por uma proteína de choque frio de plantas, WCSP1 (NAKAMINAMI; KARLSON; IMAI, 2006). Esta proteína possui um domínio CSD associado a domínios *zinc-finger* e domínios ricos em glicina. Várias construções contendo mutações dentro de WCSP1 foram utilizadas para complementar o fenótipo de choque frio da linhagem BX04. As construções contendo todos os domínios íntegros ou a construção contendo o domínio CSD associado a domínios *zinc-finger* complementaram o fenótipo de BX04 de *E. coli*. Entretanto, as construções que possuíam mutações individuais nos resíduos de aminoácidos críticos para a ligação a DNA simples fita presentes nos motivos de ligação RNP-1 e RNP-2 ou a construção que não apresentava os domínios *zinc-finger* não recuperaram o crescimento desta linhagem. (NAKAMINAMI; KARLSON; IMAI, 2006). Além disso, WCSP1 mostrou

atividade de antiterminação de transcrição em *E. coli* assim como, CspA, CspC e CspE desta bactéria (BAE et al., 2000), sendo também descrita como uma chaperone de RNA que auxilia na desestabilização de estruturas secundárias, de modo a facilitar a tradução sob baixas temperaturas (NAKAMINAMI; KARLSON; IMAI, 2006).

Apesar de *cspC* não ser induzido em choque frio em *C. crescentus*, no trabalho de mestrado da Dra. Heloíse Balhesteros, foi observado uma queda na viabilidade do mutante *cspC* sob baixas temperaturas, indicando que a expressão de *cspC* pode ter algum efeito na sobrevivência da célula durante o choque frio que não é compensado por outra CSP nesta bactéria (BALHESTEROS, 2010). Fato semelhante ocorre com CspE de *E. coli*, mesmo não sendo induzida no frio (YAMANAKA; FANG; INOUE, 1998) a atividade de antiterminação de transcrição de CspE de *E. coli* é necessária para a complementação do fenótipo de sensibilidade ao frio do mutante quádruplo para CSPs (PHADTARE; INOUE; SEVERINOV, 2002). Outro dado importante que relaciona *cspC* com a resposta ao choque frio em *C. crescentus* foi observado pelo Dr. Ricardo Mazzon através de análise de crescimento de várias combinações de mutantes das proteínas de choque frio. Entre eles, o mutante duplo $\Delta cspA cspC$ foi o que apresentou a maior sensibilidade a 10 graus, com queda na viabilidade celular nas primeiras 24 horas de crescimento, e apresentando uma ligeira retomada de crescimento entre 24 e 48 horas. Após a entrada na fase estacionária, se manteve nesta fase até o final do experimento (72 horas), sugerindo um possível envolvimento de CspC na resposta a choque frio (MAZZON, 2011).

Parte 2 – Estudo da regulação de *cspC*

O sistema de dois componentes RegA/RegB em várias bactérias está envolvido em uma série de processos de utilização e geração de energia, como cadeia de transporte de elétrons, fixação de carbono, fixação de nitrogênio, entre outros (BEIER; GROSS, 2012; UTSUMI, 2008). RegA é o regulador de resposta e ativador de transcrição, e RegB a histidina quinase cognata. Os homólogos de RegB/RegA são altamente conservados e conhecidos em α e β proteobactérias, inclusive em *C. crescentus* (ELSEN et al., 2004). A família de proteínas RegA está dividida em dois grupos, o primeiro grupo possui 100% de conservação do motivo HTH de ligação a DNA e o segundo grupo tem sequência primária similar, mas não possui regiões HTH idênticas (ELSEN et al., 2004). *C. crescentus* possui um representante de cada um dos dois grupos, o regulador de resposta SpdR, caracterizado como ativador da transcrição

de *cspD* pela Dra. Carolina Antunes da Silva, do nosso laboratório, pertence ao grupo 1 (SILVA et al., 2010). O gene CC1767 codifica o representante do grupo 2, chamado aqui de RegA, e o gene CC1768 codifica o regulador de resposta RegB. Representantes do grupo dois já foram estudados em *Pseudomonas aeruginosa* (RoxR) (COMOLLI; DONOHUE, 2002) e PrrA de *Rhodobacter sphaeroides* (ERASO; KAPLAN, 1994). Um fato muito interessante é que nem todas as bactérias apresentam representantes dos dois grupos (ELSEN et al., 2004).

Algumas observações anteriores levantaram a hipótese de que RegA poderia ser o regulador transcricional de *cspC*: a) mesmo sabendo que *cspC* é autorregulado, provavelmente por estabilização do mRNA (SANTOS, 2011), sua indução na fase estacionária é dependente da região promotora e há uma região necessária para esta indução (BALHESTEROS, 2009); b) Nesta região, existe uma sequência muito similar à sequência de ligação predita da família de proteínas RegA do grupo 2; c) SpdR não se liga à região promotora de *cspC*, e não regula a sua expressão (SILVA et al., 2010); d) Crosson et al. (2005) descreveram *regA/regB* como sendo regulados por FixK, um regulador global da transcrição de terminal oxidases respiratórias que faz parte de uma cascata regulatória que responde diretamente às concentrações de O₂. A análise transcriptômica do mutante *cspC* mostrou que a expressão de algumas terminal oxidases tiveram a expressão alterada (SANTOS et al., 2015); e) Embora SpdR apresente uma alta similaridade com a família de proteínas RegA, o nosso grupo não encontrou muitas semelhanças na via de regulação dos genes alvos (Comunicação pessoal, Dra. Carolina A.P.T. da Silva). Em *E. coli*, a mudança entre metabolismo aeróbio e anaeróbio é controlada por um sensor direto de O₂, Fnr, e indiretamente por ArcAB via interação com a cadeia respiratória (GREEN; PAGET, 2004). Pode-se especular que *C. crescentus* apresenta dois tipos de sensores redox: a) uma via que sente diretamente a molécula de oxigênio, onde FixL, é a histidina quinase que sente as concentrações de oxigênio, FixJ, o regulador de resposta que ativa FixK (regulador de transcrição) e FixT, um inibidor da histidina quinase, descritos no trabalho de Crosson et al. (2005), e b) o sistema de dois componentes RegA/RegB, que ativa *cspC*, já que de forma direta ou indireta, CspC afeta a transcrição de alguns genes da cadeia respiratória (ver item 3 de Resultados). Além disso, outro fato interessante é que o gene *regA* está em operon com genes da cadeia respiratória, podendo sugerir que seja o regulador principal destes genes (Figura 15).

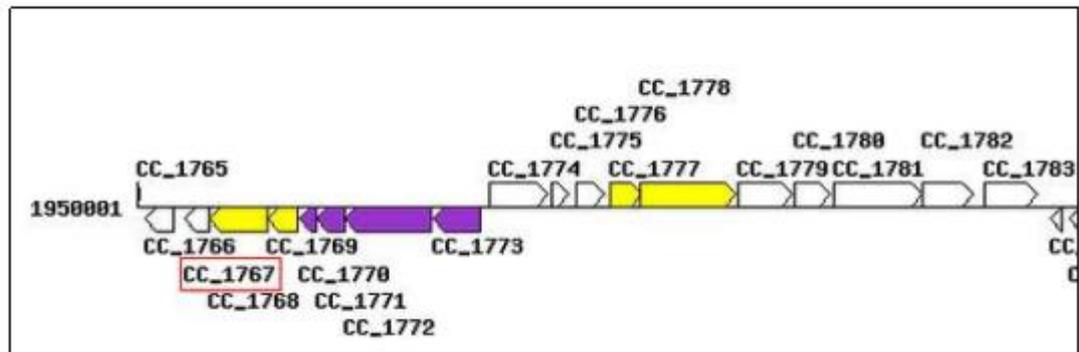


Figura 15. Mapa da região do genoma de *Caulobacter crescentus* NA1000 que contém o gene *regA*. O gene *regA* (CC_1767) está indicado pela caixa e representado por uma seta branca. O gene CC_1768 representado por uma seta amarela grande codifica a histidina quinase RegB, os genes subsequentes e que seguem a mesma orientação das setas (da direita para a esquerda) codificam proteínas da cadeia respiratória.

Fonte: Banco de dados KEGG

Com a finalidade de entender o papel de RegA e RegB e sua relevância para a regulação de *cspC* em *C. crescentus*, realizamos inicialmente um ensaio de sobrevivência relativa dos mutantes na presença de H_2O_2 . Culturas da linhagem NA1000 e dos mutantes *regA* e *regB* foram cultivadas até a fase exponencial, e então divididas igualmente em 3 tubos. O primeiro e o segundo tubo receberam H_2O_2 para concentrações finais de 400 μM e 800 μM , respectivamente e o terceiro tubo não recebeu o estresse, e foram mantidos sob agitação em temperatura ótima (30 °C) durante 10 minutos. Removeu-se uma alíquota antes e depois da adição do estresse para contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs), em meio PYE. Os resultados mostraram que conforme o aumento da concentração de peróxido de hidrogênio a perda da viabilidade celular é maior nos mutantes *regA* e *regB* comparado com a NA1000 (**Figura 16**). A sensibilidade a peróxido de hidrogênio também foi observada no mutante *roxS/roxR* (FERNÁNDEZ-PIÑAR et al., 2008). RoxS/RoxR pertencem a família de proteínas RegA/RegB em *Pseudomonas aeruginosa*. Como RoxS/RoxR são regulados pelo estado redox da célula, essa sensibilidade provavelmente foi observada devido a H_2O_2 provocar alterações no estado redox. Considerando as barras de erro dos mutantes *regA* e *regB* na **Figura 16**, pode-se afirmar que os dois mutantes apresentam uma perda de viabilidade celular similar quando o agente peróxido de hidrogênio é adicionado no meio, indicando que a histidina quinase *regB* e o regulador de resposta *regA* possivelmente atuam na mesma via regulatória. Adicionalmente, pode-se especular que *cspC* também possa atuar na mesma via, já que a sensibilidade a peróxido de hidrogênio também foi observada na linhagem MM26.

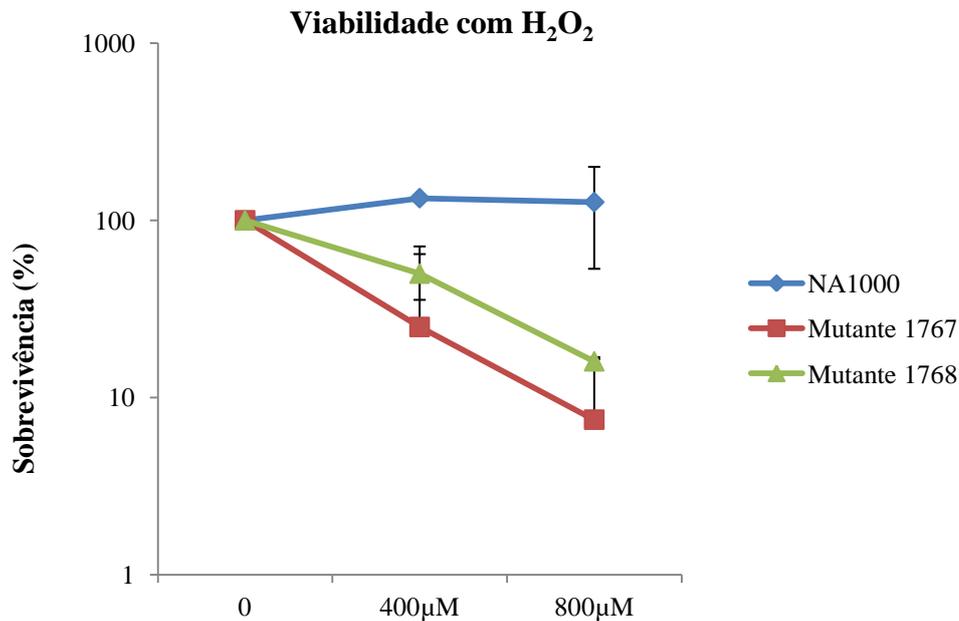


Figura 16. Sobrevivência relativa das linhagens NA1000 e nas linhagens mutantes *regA* e *regB* (Δ CC1767 e Δ CC1768, respectivamente) em meio PYE contendo H₂O₂. A sobrevivência relativa foi determinada como sendo a porcentagem da razão entre o número de UFCs obtido e o número de UFCs inicial. Os valores representam a média de medidas de no mínimo duas replicatas técnicas cada.

Para investigar se RegA regula diretamente a expressão de *cspC* realizamos um ensaio de alteração de mobilidade eletroforética (EMSA), onde é possível observar se ocorre ou não a interação DNA-proteína. Para isso, foi obtida uma proteína RegA recombinante através de clonagem da região codificadora de *regA* no vetor de expressão pProEX-HTa. Esse vetor possui um promotor de *E. coli* que é induzido por IPTG e permite a expressão de RegA como uma proteína de fusão contendo uma cauda de seis histidinas, o próprio vetor codifica esta cauda que é utilizada para posterior purificação. Foi possível obter RegA purificada como pode ser observado na **Figura 17**. Entretanto, além da banda da proteína RegA, algumas bandas menores aparecem abaixo desta proteína, estas bandas menores podem ser devido a degradação da proteína RegA ou devido a presença de outras proteínas no processo de purificação, porém, como RegA aparece em grandes quantidades, utilizamos a purificação do extrato da canaleta 7 para realizar o ensaio de EMSA usando diferentes concentrações da proteína His-RegA com a região promotora de *cspC*. Não foi observado mudança de mobilidade eletroforética em nenhuma das canaletas. Logo, não foi possível observar a ligação da proteína reguladora RegA à possível região ativadora de *cspC* (**Figura 18**) nas condições testadas. Isso indica que, apesar de todos os dados que levaram a sugerir que RegA

regula *cspC*, principalmente o fato de a sequência da região ativadora de *cspC* ser muito semelhante a sequência de ligação predita da família de proteínas RegA, a proteína codificada pelo gene CC1767 provavelmente não regula diretamente a expressão do gene *cspC*.

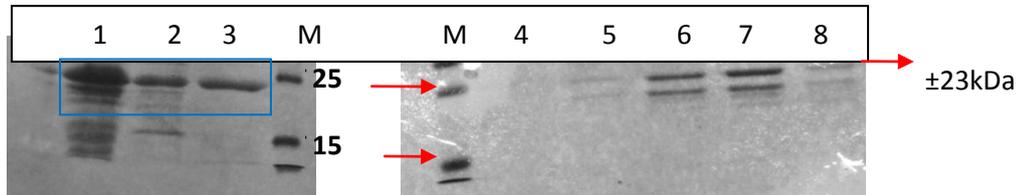


Figura 17. Indução e purificação da proteína RegA em *E. coli* DH5 α . Em 1 extrato de cultura superexpressando RegA com IPTG. A caixa azul indica as bandas correspondentes a RegA. A canaleta 2 mostra a fração solúvel obtida a partir da sonicação das culturas, e na canaleta 3 a fração insolúvel. Nas canaletas de 4 a 8, os passos de purificação de RegA por cromatografia de afinidade em resina de níquel, com 500, 400, 300, 200 e 100 mM de imidazol, respectivamente. M indica o marcador de peso molecular.

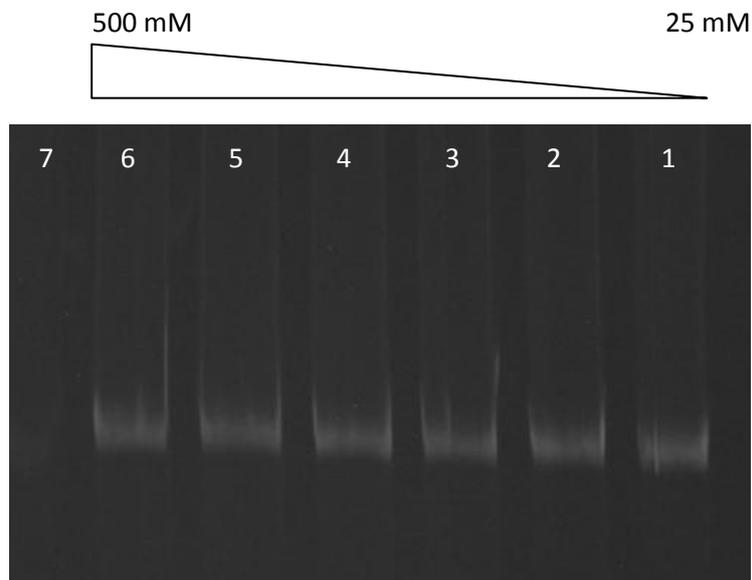


Figura 18. Ensaio de alteração de mobilidade eletroforética. Ensaio de ligação da proteína recombinante His-RegA com a região promotora de *cspC*, contendo a possível região ativadora. A região promotora de *cspC* foi incubada ou não com concentrações crescentes da proteína RegA purificada. Nas canaletas de 1 a 6 mostram a adição crescente da proteína RegA purificada 25, 50, 100, 250 e 500 mM da proteína RegA purificada, respectivamente e a última canaleta (6) sem adição de proteína.

Com intuito de analisar a expressão do gene *cspC* no mutante *regA* realizamos ensaios de RT-PCR quantitativo das linhagens NA1000 e $\Delta regA$ na fase log ($DO_{600} = 0,5$) e com 24 horas de crescimento. Os resultados mostram que na ausência do gene *regA* ocorre um aumento da expressão do gene *cspC* (**Figura 19**), e esse fato pode ser devido ao desbalanço redox que pode gerar estresse oxidativo provavelmente causado pela falta de *regA* na célula. Como já foi observado que *cspC* está envolvido na regulação de algumas enzimas da respiração e de combate ao estresse oxidativo através de ensaios de microarranjos de DNA, e o mutante *cspC* é sensível a peróxido de hidrogênio e paraquat, *cspC* de alguma forma poderia estar sendo mais expresso para auxiliar na proteção contra o estresse oxidativo. Outra hipótese seria que está ocorrendo uma regulação indireta, onde *regA* regula positivamente algum repressor do gene *cspC* e conseqüentemente a falta de *regA* permite que a expressão de *cspC* aumente.

Adicionalmente, verificamos se a expressão da proteína CspC também aumenta através de um ensaio de Western *blotting* com o soro anti-CspC. A condição utilizada foi crescimento de 48 horas, já que a proteína CspC é mais expressa nesta fase. Entretanto, a banda correspondente à CspC na linhagem NA1000 (**Figura 20**) não foi possível visualizar nesta foto. Mesmo com essa ressalva, foi observado um aumento da expressão da proteína CspC no mutante *regA* comparado com a linhagem selvagem, NA1000. Esse dado confirma que RegA não ativa a transcrição de *cspC* e sugere a hipótese de que pode haver uma regulação negativa indireta de RegA sobre *cspC*.

Expressão de *cspC* em $\Delta regA$

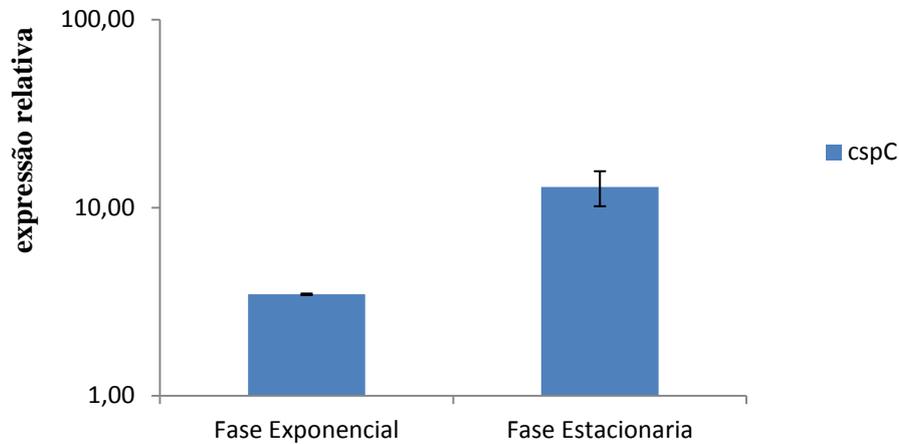


Figura 19. Efeito de *regA* sobre *cspC* na fase exponencial e na fase estacionária. São mostrados os resultados de análises por RT-PCR quantitativo realizadas para confirmar a regulação do sistema RegA sobre *cspC*. O RNA total foi extraído de culturas da linhagem NA1000, mutante *regA* na fase log ($DO_{600} = 0,5$) e com 24 horas de crescimento. Os valores correspondem às vezes de indução no mutante *regA* comparada com a linhagem selvagem, NA1000. Os valores representam a média de medidas com dois experimentos realizados independentemente. Os resultados foram normalizados usando os genes (CC0005) como controle endógeno, que foi constitutivamente expresso nas amostras analisadas. As barras pretas indicam o desvio padrão.



Figura 20. Western blotting com soro anti-CspC nas linhagens NA1000 e mutante *regA*. Culturas das linhagens NA1000 e $\Delta regA$ em fase estacionária (48 horas de crescimento) tiveram suas proteínas totais extraídas e aplicadas em gel de poliacrilamida-SDS 12%. Após a transferência destas para filtro de nitrocelulose, foi feito um ensaio de *immunoblot* com soro anti-CspC (1:1000) para reconhecimento da banda de ~18 kDa, correspondente à CspC.

Parte 3 – Estudo da expressão gênica global na ausência de *cspC*

4.4 Identificação genes com a expressão afetada no mutante *cspC* através de ensaios de microarranjos de DNA

O mutante *cspC* apresenta uma severa perda de viabilidade na fase estacionária, indicando que CspC possui um importante papel nessa fase (BALHESTEROS, 2010). A fim de identificar os genes cuja expressão é afetada no mutante *cspC* foram realizados ensaios de microarranjos de DNA com o mutante *cspC* e com a linhagem NA1000 nas fases exponencial e estacionária. Nesses ensaios, cDNAs das linhagens NA1000 e MM26 foram sintetizados a partir de seus RNAs totais extraídos de diferentes amostras biológicas (três réplicas) de cada linhagem e isolados na fase exponencial (DO₆₀₀ entre 0,4 a 0,5) e na fase estacionária (24 horas, DO₆₀₀ entre 1,2 a 1,3). Os cDNAs sintetizados foram usados para uma hibridização competitiva em uma lâmina customizada para *Caulobacter* que contem oligonucleotídeos cobrindo uma região em torno do início de tradução (-300 até +200 do início de tradução +1) de cada gene de *Caulobacter crescentus*. Considerou-se gene induzido aquele cuja expressão se encontra aumentada ou diminuída em duas vezes e meia ou mais na relação mutante/parental ou estacionária/exponencial no mínimo em três dos quatro últimos oligonucleotídeos nas três replicatas biológicas.

Um numero muito menor de genes foram diferencialmente expressos na fase exponencial, 11 genes (**Tabelas 7 e 8**) comparando com a fase estacionária, 60 genes (**Tabelas 9 e 10**), confirmando que CspC apresenta um papel predominante nesta ultima fase. Para identificar genes que tiveram a expressão alterada no mutante *cspC* e são induzidos na fase estacionária, os dados de ensaios de microarranjos de DNA do mutante *cspC* x linhagem parental (NA1000) na fase estacionária foram comparados a um terceiro ensaio de microarranjos de DNA, a qual compara a expressão de genes durante as fases exponencial e estacionária na linhagem NA1000 (dados da Dra. Carolina A.P.T. da Silva) (Santos et al., 2015).

A **Tabela 7** mostra os genes agrupados por função que foram menos expressos no mutante *cspC* na fase exponencial comparados a linhagem selvagem. Entre os genes menos expressos estão o gene que codifica para a citocromo oxidase *bd*, o gene da malato desidrogenase (*mdh*) e o gene que codifica a toxina *parE-1*, e três genes que codificam para proteínas hipotéticas. A citocromo oxidase *bd* apresenta alta afinidade por O₂ e é importante em condições com baixos níveis de oxigênio, já que apresenta 100x mais afinidade por O₂ comparado a outras citocromo oxidase (HALLIWELL; GUTTERUDGE, 2007). A toxina

ParE-1 pertence ao sistema toxina/antitoxina (RelE/ParE) e a superexpressão de seu gene inibe a divisão celular e reduz a capacidade de *C. crescentus* formar colônias (FIEBIG et al., 2010). O gene *mdh* codifica a malato desidrogenase, envolvida no ciclo do glioxilato. Entre os genes menos expressos na fase exponencial no mutante *cspC*, os genes *mdh* e CC2625 também tiveram sua expressão diminuída na fase estacionária (**Tabela 9**).

Os genes que se mostraram mais expressos no mutante *cspC* na fase exponencial estão mostrados na **Tabela 8**. Estes genes estão envolvidos principalmente na síntese de aminoácidos, especificamente na síntese de lisina, fenilalanina, tirosina e triptofano: aminotransferase LL-diaminopimelato (CC1382) e 3-desoxi-7-fosfo-heptulonato sintase (CC1397). Comparando os dois ensaios de microarranjos de DNA (da fase estacionária e da fase exponencial) apenas o gene CC1871 teve sua expressão aumentada nas duas fases (**Tabelas 8 e 10**).

A ausência de *cspC* na fase estacionária afetou a transcrição de 60 genes na fase estacionária, dos quais 15 genes são substancialmente afetados (>5 vezes) em comparação com a linhagem parental NA1000 (**Tabelas 9 e 10**). Baseando-se no aumento de indução de *cspC* na fase estacionária, já era esperado que a falta de *cspC* tivesse um efeito maior na fase estacionária em relação a fase exponencial. Interessantemente, de 37 genes que foram menos expressos no mutante *cspC*, 24 foram mais expressos na fase estacionária (comparado com dados dos ensaios de microarranjos de DNA fase exponencial x fase estacionária na linhagem parental NA1000) e 20 foram mais expressos na carência de carbono (comparado com os dados de BRITOS et al., 2011) e 14 foram diferentemente expressos nas três condições. Entre os 23 genes mais expressos no mutante *cspC*, 8 genes foram mais expressos na carência de carbono (comparado com os dados de BRITOS et al., 2011). Os resultados apontam certa correlação entre os genes menos expressos no mutante *cspC*, e os induzidos na fase estacionária e na carência de carbono, porém, não é observado o mesmo perfil no conjunto de genes mais expressos no mutante *cspC*.

A discussão sobre os genes identificados em cada situação e sua relevância será apresentada mais adiante.

Tabela 7. Genes menos expressos no mutante *cspC* na fase exponencial.

Gene CB15	Gene NA1000	Produto	($\Delta cspC/WT$) ^a
Cadeia respiratória			
CC_0763	CCNA_00801	Citocromo bd-tipo quinol oxidase, subunidade II	0,38
Sistema toxina-antitoxina			
CC_0873	CCNA_00916	Toxina parE-1	0.25
Metabolismo de Carboidrato			
CC_3655	CCNA_03770	Malato desidrogenase	0.22
Proteínas hipotéticas			
CC_2280	CCNA_02363	Proteína hipotética	0.33
CC_2645	CCNA_02728	Proteína hipotética	0.32
CC_3115	CCNA_03214	Proteína hipotética	0.26

Foram considerados apenas genes no qual apresentaram no mínimo duas vezes de alteração transcricional. Os valores representam a média de medidas com três replicatas biológicas. ^{a)} Vezes de indução comparada com a linhagem selvagem (NA1000).

Tabela 8. Genes mais expressos no mutante *cspC* na fase exponencial.

Gene CB15	Gene NA1000	Produto	($\Delta cspC/WT$) ^a
CC_1382	CCNA_01446	LL-diaminopimelato aminotransferase	4.37
CC_1396	CCNA_01462	Lactato 2-monooxigenase	7.80
CC_1397	CCNA_01463	3-desoxi-7-fosfoheptulonato sintase	10.70
CC_1870	CCNA_01946	Tirosil-tRNA sintetase	9.85
CC_1871	CCNA_01947	Tioredoxina peroxidase	3.99

Foram considerados apenas genes no qual apresentaram no mínimo duas vezes de alteração transcricional. Os valores representam a média de medidas com três replicatas biológicas. ^{a)} Vezes de indução comparada com a linhagem selvagem (NA1000).

Tabela 9. Genes menos expressos no mutante *cspC* na fase estacionária.

Gene CB15	Gene NA1000	Produto	($\Delta cspC$ / WT) ^a	(WT _{stat} /WT _{exp}) ^b	Mais expresso na carência de carbono ^c
Metabolismo de carboidrato					
CC_1764	CCNA_01841	Isocitrato liase	0.11	71.6 ^d	Sim
CC_1765	CCNA_01843	Malato sintase	0.10	88.7 ^d	Sim
CC_3655	CCNA_03770	Malato desidrogenase	0.06	2.1	Não
CC_3580	CCNA_03695	Aldeído desidrogenase	0.25	82.4 ^d	Sim
CC_3581	CCNA_03696	Acetil-CoA sintetase	0.25	20.0 ^d	Não
Metabolismo de amino ácidos					
CC_0167	CCNA_00166	Provável transglutaminase, similar a cisteína proteinase	0.20	2.2	Sim
CC_2533	CCNA_02616	4-hidroxifenilpiruvato dioxigenase	0.36	1.2	Não
Transporte					
CC_0579	CCNA_00615	Receptor dependente de TonB	0.22	8.1 ^d	Não
Motilidade					
CC_0793	CCNA_00835	Flagellina, FljN	0.17	0.7	Não
CC_1460	CCNA_01527	Flagellina, FljL	0.33	0.2 ^d	Não
CC_1461	CCNA_01528	Flagellina, FljK	0.28	0.9	Sim
CC_2948	CCNA_03043	Pilina tipo IV, PilA	0.25	0.8	Não
CC_3025	CCNA_03120	Proteína quimiotática, CheW	0.14	1.4	Sim
Resposta a estresse oxidativo					
CC_1777	CCNA_01855	Superóxido dismutase Mn	0.35	1.3	Não
Sistemas toxina-antitoxina					
CC_2513	CCNA_02598	Toxina relE ₂	0.39	10.1 ^d	Sim
CC_2880	CCNA_02974	Toxina relE ₃	0.39	14.1 ^d	Não

Transdução e transcrição de sinal

CC_0903	CCNA_00948	Proteína inibidora de CtrA, SciP	0.31	1.0	Sim
---------	------------	-------------------------------------	------	-----	-----

Tabela 9 - continuação**Proteínas com categoria não definidas**

CC_0451	CCNA_00483	Hidrolase dependente de Zn, Família de glioxilase II	0.33	0.5	Não
CC_0557	CCNA_00592	Superfamília de ferritina ^{b)}	0.34	2.7	Sim
CC_0679	CCNA_00718	Proteína de infecção abortiva ^{b)}	0.30	2.1	Sim
CC_0707	CCNA_00744	Endonuclease	0.28	4.5 ^{d)}	Sim
CC_1343	CCNA_01405	Proteína contendo domínio GIY-YIG ^{b)}	0.32	16.9 ^{d)}	Sim
CC_2696	CCNA_02779	Proteína ligadora a peptioglicicano, da família LysM ^{b)}	0.35	6.6 ^{d)}	Não
CC_2869	CCNA_02962	Da Família HicB, participa no dobramento da RNase H ^{b)}	0.30	11.9 ^{d)}	Sim
CC_3153	CCNA_03255	Família de proteína PemK ^{b)}	0.34	4.5 ^{d)}	Sim
CC_3582	CCNA_03697	Proteína ligadora, contendo domínio SRPBCC ^{b)}	0.25	14.5 ^{d)}	Não

Proteínas Hipotéticas

CC_0559	CCNA_00594	Proteína hipotética	0.14	10.6 ^{d)}	Sim
CC_0681	Não anotado		0.05	4.4 ^{d)}	Não
CC_0682	Não anotado		0.19	6.4 ^{d)}	Não
CC_0781	CCNA_00822	Proteína hipotética	0.10	13.2 ^{d)}	Sim
CC_0997	Não anotado		0.31	22.5 ^{d)}	Não
CC_1392	CCNA_01458	Proteína hipotética	0.34	9.3 ^{d)}	Não
CC_2184	Não anotado		0.18	12.4 ^{d)}	Sim
CC_2348	CCNA_02433	Proteína hipotética	0.26	6.6 ^{d)}	Sim
CC_2645	CCNA_02728	Proteína hipotética	0.26	38.1 ^{d)}	Sim
CC_3207	CCNA_03313	Proteína hipotética	0.33	38.7 ^{d)}	Sim
CC_3654	CCNA_03769	Proteína hipotética	0.23	5.8 ^{d)}	Não

Foram considerados apenas genes no qual apresentaram no mínimo duas vezes de alteração transcricional. Os valores representam a média de medidas com três replicatas biológicas. ^{a)} Vezes de indução comparada com a linhagem selvagem (NA1000). ^{b)} Descrição dos domínios de genes que codificam para proteínas hipotéticas e apresentam anotação no KEGG

Tabela 10. Genes mais expressos no mutante *cspC* na fase estacionária

Gene CB15	Gene NA1000	Produto	($\Delta cspC/WT$) ^a	(WTstat/ WTexp) ^b	Menos expresso na carência de carbono
Metabolismo de enxofre					
CC_0286	CCNA_00288	Componente periplasmática, sistema de transporte ABC de sulfato	4.43	2.7 ^d	Sim
CC_1119	CCNA_01177	Sulfito redutase (NADPH), subunidade beta	5.22	2.0	Sim
CC_1482	CCNA_01549	Bifuncional: Sulfato adenililtransferase subunidade 1/Adenililsulfato quinase	8.94	0.9	Sim
CC_1483	CCNA_01550	Sulfato adenililtransferase, subunidade 2	5.36	2.1	Sim
Transporte					
CC_1666	CCNA_01738	Receptor dependente deTonB	5.41	3.2 ^d	Não
CC_1991	CCNA_02070	Translocase subunidade SecD	2.62	0.2 ^d	Sim
CC_2664	CCNA_02747	Proteína ligadora de substrato de transportador ABC	6.75	1.1	Sim
Cadeia respiratória					
CC_1401	CCNA_01467	Citocromo <i>cbb</i> ₃ oxidase subunidade I <i>ccoN</i>	3.25	1.8	Não
CC_1402	CCNA_01468	Citocromo <i>cbb</i> ₃ oxidase, citocromo c subunidade <i>ccoO</i>	3.91	2.2	Não
CC_1403	CCNA_01469	citocromo <i>cbb</i> ₃ oxidase, subunidade <i>ccoQ</i>	3.00	2.2	Não
Metabolismo de aminoácidos					

CC_0050	CCNA_00048	S-adenosilmetionina sintetase	3.57	0.5	Não
---------	------------	-------------------------------	------	-----	-----

Tabela 10 - continuação

CC_0482	CCNA_00515	S-adenosil -homocisteína hidrolase	5.57	0.7	Sim
CC_0581	CCNA_00617	Arginina N-succiniltransferase, cadeia beta	4.63	4.8 ^d	Não
CC_1397	CCNA_01463	3-desoxi-7-fosfoheptulonato sintase	3.65	3.2 ^d	Não

Transdução de sinal

CC_0285	CCNA_00287	Histidinaquinase, fotosensor, LovK	4.44	1.7	Não
---------	------------	------------------------------------	------	-----	-----

Síntese de proteínas

CC_0464	CCNA_00496	Treonil -tRNA sintetase	4.91	0.5	Sim
CC_1870	CCNA_01946	Tirosil-tRNA sintetase	3.09	1.1	Não

Proteases

CC_0878	CCNA_00922	Clp protease dependente de ATP. Ligadora de ATP subunidade ClpB	3.14	1.5	Não
CC_1960	CCNA_02037	Endopeptidase dependente de ATP, Lon	2.93	1.8	Não

Metabolismo de cofatores

CC_2912	CCNA_03006	Quinolinato sintetase A	4.75	0.9	Não
---------	------------	-------------------------	------	-----	-----

Proteínas hipotéticas

CC_0287	CCNA_00289	Proteína hipotética	5.62	1.7	Sim
CC_2624	Não anotado	Proteína hipotética	2.94	2.8	Não
CC_2699	CCNA_02782	Proteína hipotética	4.41	2.0	Não

Foram considerados apenas genes no qual apresentaram no mínimo duas vezes de alteração transcricional. Os valores representam a média de medidas com três replicatas biológicas. ^{a)} Vezes de indução comparada com a linhagem selvagem (NA1000).

4.5 Validação dos ensaios de microarranjos de DNA de *cspC*

Para confirmar os dados gerados nos ensaios de microarranjos de DNA, selecionamos oito genes que tiveram a expressão significativamente alterada na fase estacionária para serem validados por qRT-PCR. A expressão dos genes foi avaliada nas linhagens, mutante *cspC* portando o pMR20 sem o inserto, mutante *cspC* complementada com pMR20-*cspC* e na linhagem NA1000 (pMR20) sem o inserto. Os resultados confirmam que CspC é necessária para manter os níveis normais de expressão destes genes nesta fase (**Figura 21**). Uma grande diferença entre às vezes de expressão é observada quando comparamos os resultados dos ensaios de microarranjos de DNA e os de qRT-PCR na maioria dos genes analisados. Como a técnica de qRT-PCR é muito mais sensível comparada aos ensaios de microarranjos de DNA, pode ser que a discrepância observada seja ocasionada por esse fator.

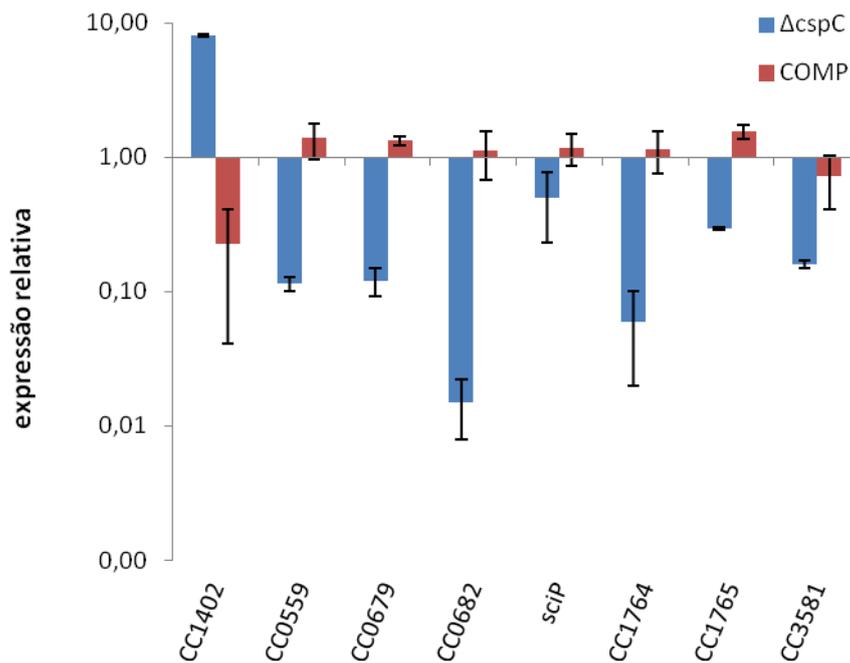


Figura 21: Efeito de *cspC* sobre a expressão dos genes selecionados a partir da análise de transcriptoma na fase estacionária. São mostrados os resultados de análises por RT-PCR quantitativo realizadas para confirmar os dados dos ensaios de microarranjos de DNA. O RNA total foi extraído de culturas da linhagem NA1000 pMR20, mutante *cspC* (MM26 pMR20) e a linhagem complementada, MM26 (pMR20-*PcspC*) com 24 horas de crescimento. Os valores mostrados correspondem em MUT C, MM26 (pMR20) comparado com NA1000 (pMR20) e em COMP, MM26 (pMR20-*cspC*) comparado com NA1000 (pMR20). Os valores representam a média de medidas com dois experimentos realizados independentemente. Os resultados foram normalizados usando o gene (CC0088) como controle endógeno, que foi constitutivamente expresso nas amostras analisadas. As barras pretas indicam o desvio padrão.

4.6 Análise dos resultados

4.6.1 Genes menos expressos no mutante *cspC* na fase estacionária

Grande parte do conjunto de genes que tiveram a expressão reduzida no mutante *cspC* na fase estacionária estão envolvidos com o metabolismo de aminoácidos e carboidratos, quimiotaxia e motilidade, transdução de sinais e transcrição e muitos genes codificam proteínas hipotéticas (**Tabela 9**). Comparando os nossos dados de ensaios de microarranjos de DNA com o estudo de transcriptoma em carência de carbono realizados por Britos et al. 2011, verificamos que seis dos onze genes que codificam proteínas hipotéticas identificados como menos expressos no mutante *cspC* na fase estacionária, também são induzidos na carência de carbono. Entre eles, dois genes (CC3207 e CC2348) são induzidos mais de 20X na carência de carbono (BRITOS et al., 2011).

O operon composto por duas enzimas, Acetil-CoA sintetase (CC3581) e aldeído desidrogenase (*aldB*), codifica enzimas que convertem acetaldeído, gerado via metabolismo de fontes alternativas de carbono, em Acetil-CoA. Outros três genes importantes para o metabolismo de Acetil-CoA, isocitrato liase (*aceA*), malato sintetase (*aceB*) e a malato desidrogenase (*mdh*) também foram menos expressos no mutante *cspC* na fase estacionária (**Figura 22**).

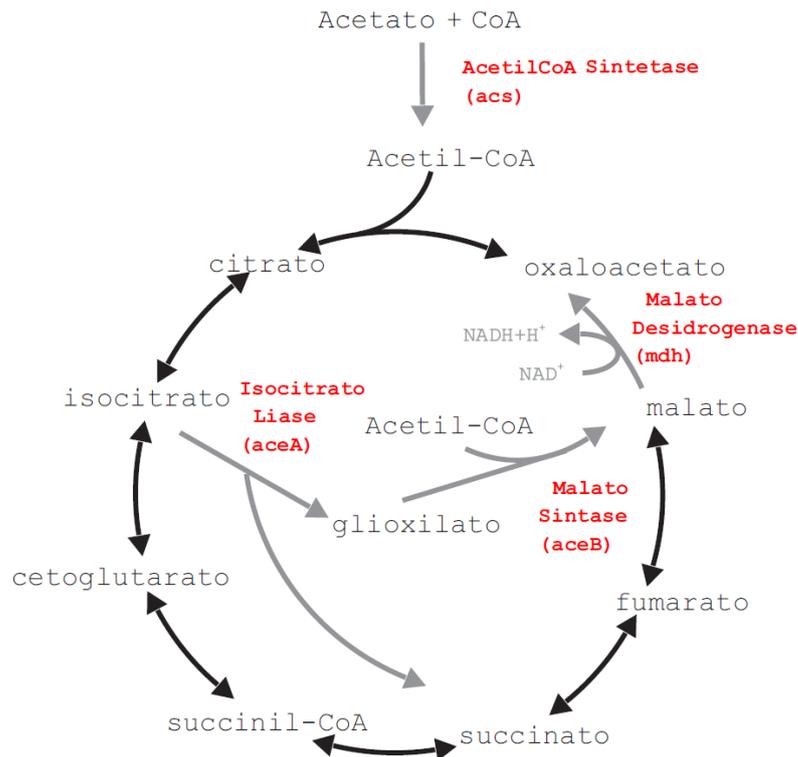


Figura 22: Esquema representativo do ciclo do glioxilato. Em vermelho, os genes e seus produtos que foram reprimidos no mutante *cspC*, a qual será explicado no decorrer do texto.

Fonte: Adaptado de Santos et al. (2015).

Superoxido dismutases (SODs) são enzimas antioxidantes responsáveis por catalisar a decomposição de superóxidos, e três tipos diferentes foram descritas, MnSOD (SodA), FeSOD (SodB) e CuZnSOD (SodC). *sodB* aparece como menos expresso nos ensaios de microarranjos de DNA do mutante *cspC* na fase estacionária, porém, ficou abaixo do nosso corte. Como já sabíamos que o mutante *cspC* apresenta uma sensibilidade por alguns tipos de agentes oxidantes, consideramos interessante avaliar a expressão de *sodB* no mutante *cspC*. A atividade do promotor de *sodB* à frente do gene repórter *lacZ* foi determinada através de ensaios de atividade de β -galactosidase na linhagem NA1000 e no mutante *cspC* após 24 horas de crescimento. Como pode se observar na **Figura 23** a expressão de *sodB* foi bem diminuída na ausência de *cspC*, o que poderia explicar a sensibilidade que o mutante *cspC* apresenta a paraquat (SANTOS, 2011). Outro gene que já foi associado ao estresse oxidativo em *C. crescentus*, RelE₃ foi identificado como menos expresso no mutante *cspC* em fase estacionária (FIEBIG et al., 2010). *C. crescentus* possui oito famílias de parálogos de sistemas toxina/antitoxina (RelE/ParE). A análise da transcrição destes operons aponta que eles são regulados diferentemente e independentemente em condições diferentes de estresses (FIEBIG

et al., 2010). Além de RelE₃ (CC2880), o gene da toxina RelE₂ (CC2513) também teve a expressão reduzida nos ensaios de microarranjos de DNA no mutante *cspC* na fase estacionária.

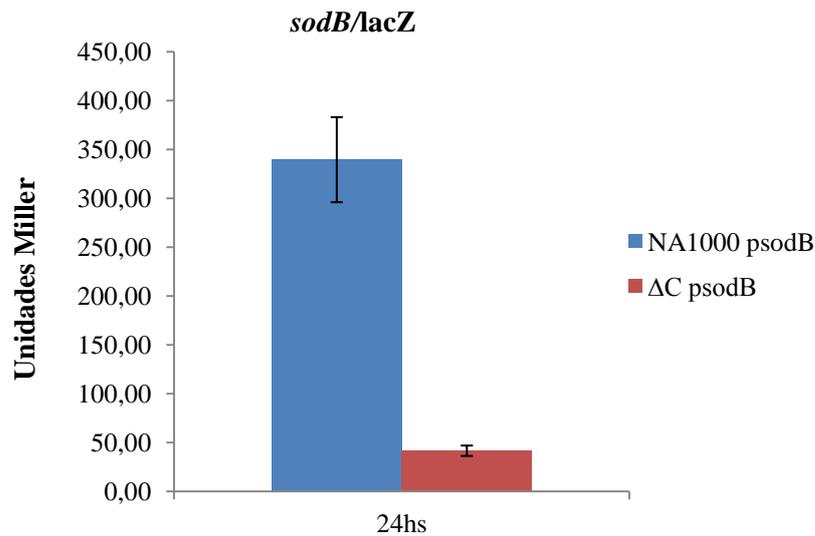


Figura 23. Efeito de *cspC* sobre a expressão de *sodB*. Culturas de NA1000 e do mutante *cspC* contendo o plasmídeo pRKlacZ290 com o promotor *sodB* foram incubadas em meio PYE/tetraciclina por 24hs. A expressão foi avaliada por ensaios de β-galactosidase. Os valores representam a média de medidas com duas replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam o desvio padrão.

A ORF CC0679 codifica para uma proteína anotada como hipotética, mas que possui dois domínios: um de citocromo c e outro de quinol oxidase. Faz-se a ressalva de que, apesar desta proteína hipotética apresentar domínios citocromo c e de quinol oxidase, esta não apareceu no trabalho que descreve o regulon dos principais reguladores de flutuações de oxigênio de Crosson et al. 2005.

CtrA é um regulador global do ciclo celular e é responsável por regular cerca de 100 genes em *C. crescentus*, incluindo muitos genes envolvidos na motilidade. CtrA é ativo em células móveis, capaz de se ligar à origem de replicação de *C. crescentus* (Cori) e silenciar o início da replicação (QUON et al., 1998). SciP, uma pequena proteína contendo 93 aminoácidos, foi identificada a partir de uma varredura através de análises de bioinformática feita para identificar genes coorientados, colocalizados ou coexpressos com *ctrA*, e foi caracterizada como uma proteína essencial em *Caulobacter crescentus* (GORA et al., 2010). SciP é uma proteína que reprime a transcrição de genes da fase pré-divisional tardia e células

móveis que foram ativados por CtrA e regula também CtrA, sendo que genes reprimidos por CtrA não foram afetados pela deleção ou superexpressão de *sciP* (GORA et al., 2010). Neste trabalho também foi descrito que a degradação de SciP ocorre na transição entre células móveis para células sésseis e apenas é encontrado em células móveis.

Visto a essencialidade de *sciP* para *Caulobacter crescentus*, selecionamos este gene como um dos principais genes a ser validado dos ensaios de microarranjos de DNA e as análises de RT-PCR quantitativo revelaram que a expressão deste gene no mutante *cspC* diminuiu cerca de duas vezes, corroborando os resultados dos ensaios de microarranjos de DNA da fase estacionária (**Tabela 9**). Entretanto, poucos genes envolvidos na montagem flagelar (CC0793, CC1460-01, CC2948) e quimiotaxia (CC3025) foram menos expressos no mutante *cspC*. Alguns destes genes (CC3025, CC146) também foram induzidos na carência de carbono (BRITOS et al., 2011). Gorbatyuk e Marczynski, (2005) observaram que CtrA é reprimida na fase estacionária, e poderia-se supor que SciP pode também reprimir CtrA durante a fase estacionária. Entretanto, os níveis do mRNA de *ctrA* não foram afetados nos ensaios de microarranjos de DNA do mutante *cspC*, e apenas três genes (*pilA*, *fliL* e CC0681) que pertence ao regulon de SciP (TAN et al., 2010) foram menos expressos no mutante *cspC* comparando com a linhagem NA1000. *fliL* e CC0681 não pertencem ao regulon de CtrA, porém, a região promotora destes genes apresenta o motivo de ligação de SciP, sugerindo que SciP participa diretamente da regulação deles.

O gene (CC0682) que apresentou menor expressão no mutante *cspC* na fase estacionária (**Tabela 9**), sendo estes níveis de expressão confirmado por ensaios de RT-PCR quantitativo (**Figura 21**), codifica um RNA de 1,1 kb contendo as ORFs putativas CC0681 e CC0682. Este longo RNA já havia sido estudado por Landt et al., 2008, e pelo nosso grupo. O gene CC0682 também aparece na relação dos genes menos expressos nos ensaios de microarranjos de DNA da fase exponencial. Através de ensaios de Northern *blotting* o Dr. Jose F. da Silva Neto confirmou a presença de um RNA policistrônico contendo dois possíveis RNAs regulatórios alternados com duas ORFs: CC0682-*sRNA1*-CC0681-*sRNA2*, e que este transcrito maior parece ser processado e, a partir dele, acumulam-se sRNA1 e sRNA2. Ele também verificou que este operon é induzido em limitação de ferro e positivamente regulado por Fur (DA SILVA NETO et al., 2013). No meu Mestrado foi realizado um ensaio de atividade de β -galactosidase na fase exponencial e estacionária para verificar se *cspC* é regulado por Fur e outro ensaio para avaliar se *cspC* é induzido na carência de ferro e não foi observada nenhuma alteração significativa nesses ensaios, indicando que *cspC* não responde a variações de ferro e que não ocorre regulação de *cspC* por Fur

(SANTOS, 2011). Interessantemente, as ORFs destas duas proteínas hipotéticas também aparecem nos ensaios de microarranjos de DNA de *fixK*, um regulador global da transcrição de terminal oxidases, como menos expressos no mutante $\Delta fixK$ (CROSSON et al., 2005).

Um fato que nos chamou a atenção nos ensaios de microarranjos de DNA do mutante *cspC* na fase estacionária foi que a ORF CC0781, que codifica para uma proteína hipotética, exibiu um dos níveis mais baixos de expressão (10x) (**Tabela 10**). Esta ORF faz parte do regulon de resposta SOS em *C. crescentus* (ROCHA, 2011) e, além dele, os genes *relE₃* e *dnaE* (este último não entrou no nosso critério de seleção utilizado para ser considerado menos expresso) que também fazem parte do regulon SOS (ROCHA et al., 2008) e também são menos expressos no mutante *cspC* na fase estacionária. A resposta SOS, que é regulada pelo repressor LexA e a enzima RecA, é uma via conservada, essencial para a reparação do DNA e de reinicialização das forquilhas de replicação paralisadas ou recolhidas. Geralmente, consiste de proteínas envolvidas na reparação do DNA, como excinucleases, helicases, e recombinases, ou proteínas envolvida na síntese translesão, como DNA polimerases translesão (Revisto em VAN DER ABEE, 2011). A resposta SOS é tipicamente induzida por estresses e agentes que causam danos ao DNA ou interrompem forquilhas de replicação, resultante de exposição de ssDNA (Revisto em VAN DER ABEE, 2011). Através de varredura de biblioteca de clones mutados pela inserção de transposon, Italiani e Marques (2003) identificaram alguns mutantes de *C. crescentus* que apresentam falhas na adaptação à fase estacionária, e os genes interrompidos estão envolvidos em recombinação e reparo de DNA e no metabolismo de aminoácidos, sugerindo que estes dois sistemas são importantes para a manutenção da viabilidade durante a fase estacionária. Pode-se especular que estes genes do regulon de resposta SOS possam ser ativados por *cspC* para auxiliar na adaptação da fase estacionária. Hottes et al. (2004) comparou o perfil transcricional durante o crescimento em meio mínimo (M2) e meio rico (PYE) em *C. crescentus* por análises de microarranjos de DNA. Em uma destas análises eles observaram a expressão de genes regulados no ciclo celular descritos no estudo de Laub et al., 2000, e a ORF CC0781 foi menos expressa no meio PYE comparado a meio mínimo. Segundo os autores, a maioria dos genes que foram menos expressos em PYE está relacionada com biossínteses.

Inicialmente, os genes CC0557 e CC0559 codificando proteínas hipotéticas foram selecionados para serem validados devido a apresentarem níveis similares de expressão nos ensaios de microarranjos de DNA do mutante *cspC* na fase estacionária, consistente com a ideia de que seja um provável operon e apareceram também nos ensaios de micrarranjos dos genes *sigT*, *lovK/lovR* (FOREMAN et al., 2012). Para isso, o qRT-PCR foi realizado apenas

com o gene CC0559, já que os dois formam um provável operon, e a expressão deste gene foi validada (**Figura 21**), mas sua função representa um campo aberto para estudos.

Um sigma equivalente ao σ^S de *E. coli* ainda não foi encontrado em α -proteobactérias, porém SigT e SigU recentemente foram demonstrados serem importantes para a resposta geral a estresses em *C. crescentus* (ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2007; LOURENÇO et al., 2011). SigT é ativo sob diversas condições de estresse como: estresse osmótico, exposição a cromo, crescimento em meio mínimo e durante a entrada na fase estacionária, e SigU também contribui, mas de uma forma mais restrita, para a ativação da expressão de genes relacionados à resposta geral a estresses (LOURENÇO et al., 2011). Apesar da expressão de *sigU* ter sido menor em dois de três ensaios de microarranjos de DNA do mutante *cspC* na fase estacionária, este gene não atingiu os nossos critérios utilizados para ser considerado diferencialmente expresso. Entretanto, para confirmar se *sigU* é menos expresso no mutante *cspC* foram realizados ensaios de atividade de beta-galactosidase na fase estacionária e os resultados apontam uma diminuição da expressão de *sigU* no mutante *cspC* na fase estacionária mas não na fase exponencial (**Figura 24**). O interessante é que *sigT* não apareceu nestes ensaios de microarranjos de DNA do mutante *cspC* e também não foi diferencialmente expresso nos ensaios de atividade de beta-galactosidase e todo o regulon de SigU está dentro do regulon de SigT. A falta de ligação entre SigT e CspC indica que a expressão de *sigU* é afetada por CspC de maneira independente de SigT. Um outro ensaio utilizando microarranjos de DNA, em que *sigU* aparece com expressão alterada e *sigT* não, são os de *fixJ* e *ftrA*, onde foram menos expressos nos mutantes $\Delta fixJ$ e $\Delta ftrA$ (CROSSON et al., 2005). FtrA é um fator de transcrição envolvido na regulação de um conjunto de genes do metabolismo de carbono e aminoácidos em carência de oxigênio e FixJ faz parte um sistema de dois componentes que regula genes que controlam a respiração aeróbica em *C. crescentus* (CROSSON et al., 2005). Em conjunto, os nossos resultados obtidos mostram que *cspC* afeta a expressão de *sigU* e esta regulação pode ocorrer de forma direta ou indiretamente.

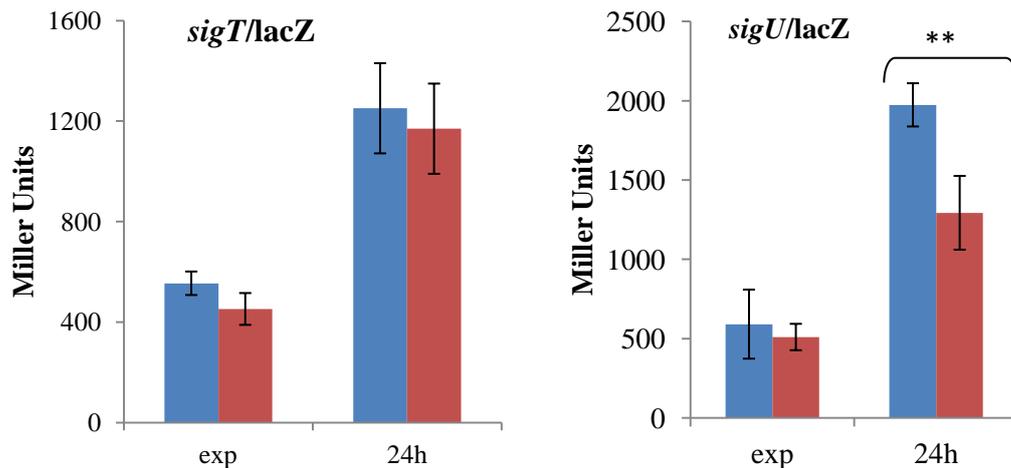


Figura 24: Expressão de *sigT* e *sigU* no mutante *cspC*. Culturas de NA1000 e do mutante *cspC* contendo o plasmídeo pRKlacZ290 com o promotor de *sigT* ou *sigU* foram incubadas em meio PYE/tetraciclina pelos tempos indicados. A expressão foi avaliada por ensaios de β -galactosidase. Os valores representam a média de medidas com três replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam o desvio padrão. A significância foi assegurada usando o teste ANOVA e teste de Tukey; $p < 0.01$ (**).

4.6.2 Genes mais expressos no mutante *cspC* na fase estacionária

Os genes mais expressos no mutante *cspC* na fase estacionária participam em diversas vias metabólicas, como nos metabolismos de aminoácidos e enxofre, transporte, síntese de proteínas e metabolismo de energia (**Tabela 10**). Interessantemente, genes que codificam componentes da via assimilação de enxofre foram mais expressos no mutante *cspC* na fase estacionária, incluindo enzimas que incorporam sulfato, oriundo de enxofre, em cisteína: sulfato-adenil-transferase/sulfato-adenil-quinase (CC1482/CC1483), uma proteína periplasmática ligadora de sulfato que possivelmente entrega sulfato ao sistema de transporte do tipo ABC (CC0286) e uma sulfato redutase (CC1119) (**Figura 25**). Dois genes que codificam enzimas da biossíntese de metionina também foram mais expressos: adenosilmetionina sintetase (CC0050) e S-adenosil homocisteína hidrolase (CC0482). Todos esses genes foram menos expressos em carência de carbono (BRITOS et al., 2011). A indução de genes do metabolismo de enxofre no mutante *cspC* indica que está ocorrendo um aumento na captação de sulfato e provavelmente sendo direcionado para a via de biossíntese de metionina. Trabalhos anteriores têm mostrado que este efeito é resultado da carência de metionina em células tratadas com acetato e a retomada de crescimento pode ocorrer com a adição de metionina exógena (ROE et al., 2002). Além disso, já foi mostrado que a adição de metionina no meio de cultura induz a expressão de *cspA* em *E. coli*, e foi proposto que este

efeito provavelmente é devido a escassez de isoleucina provocada pelo fato da homocisteína perturbar a biossíntese de aminoácidos (FRASER et al., 2006). Neste trabalho foi proposto que a parada ribossomal gerada pela escassez de aminoácidos, resultaria em um sinal para a indução de *cspA*. Em *C. crescentus*, a fase estacionária causada pela escassez de aminoácidos pode conduzir à mesma condição, desencadeando a expressão de *cspC*.

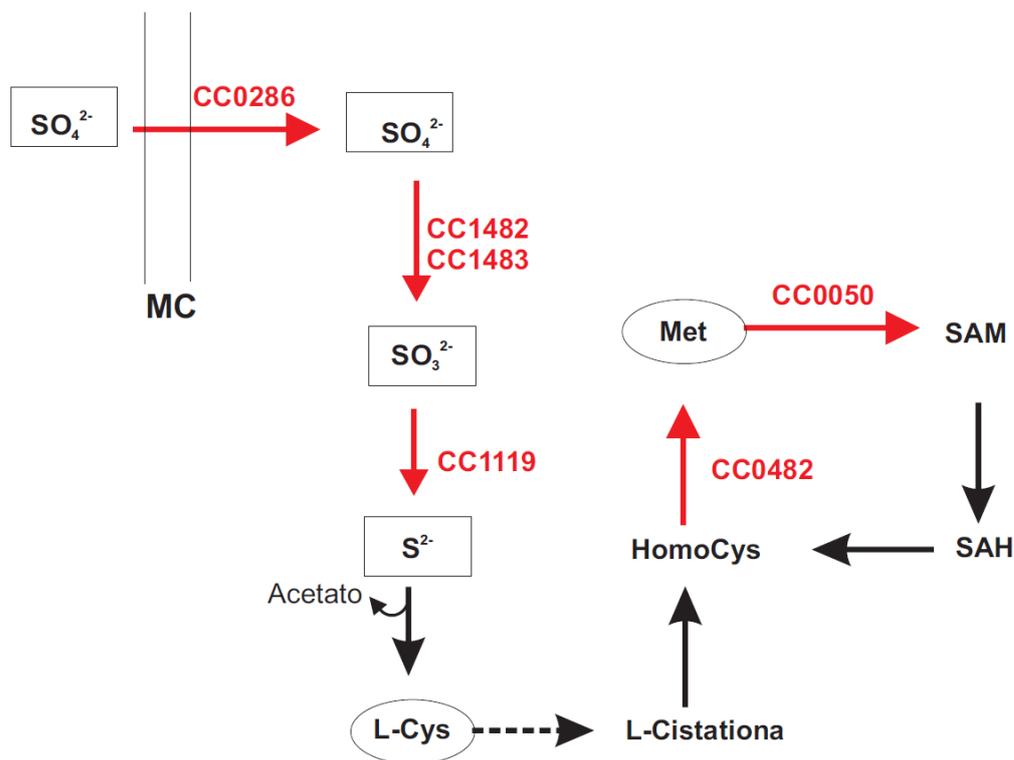


Figura 25. Representação esquemática das vias de assimilação e redução de sulfato e de biossíntese de metionina. Genes com a expressão aumentada no mutante *cspC* estão destacados em vermelho; CM, membrana citoplasmática; SAM, S-adenosil metionina; SAH, S-adenosil homocisteína.

Fonte: Adaptado de Santos et al. (2015).

Em bactérias, domínios LOV frequentemente estão associados a histidina quinases que controlam diversos processos celulares através de estímulos intra ou extracelulares. A luz visível pode agir como um sinal regulatório para a expressão de *lovK* e *lovR*, que apresentam um papel na adesão de *C. crescentus* a superfícies bióticas e abióticas (PURCELL et al., 2007). Foreman et al., 2012 descreveu um sistema de regulação da resposta geral a estresses que associa o sistema de dois componentes já descrito, PhyK/PhyR com LovK/LovR, onde PhyR/PhyK funcionam como reguladores positivos e LovR/LovK como reguladores

negativos da resposta geral a estresses. *lovK* apareceu nos nossos ensaios de microarranjos de DNA e foi validado por RT-PCR quantitativo como mais expresso no mutante *cspC* na fase estacionária, sugerindo que *cspC* estaria de alguma forma reprimindo sua expressão. Foreman et al., 2012 descreveram o regulon de *lovK/lovR*, e assim comparamos este regulon com a relação de genes identificados nos microarranjos de DNA de *cspC*. Há poucos genes em comum nos dois ensaios, mas levando em consideração que foram feitos em fase de crescimento diferentes e aquele ensaio não apresenta apenas genes regulados por *lovK*, é possível que a discrepância observada seja ocasionada pelas abordagens distintas. Outros dados importantes são que LovK funciona como um sensor do potencial redox do citoplasma e um sensor de luz (PURCELL et al., 2010).

Três genes envolvidos na respiração, codificando subunidades da oxidase *cbb₃* da cadeia de transporte de elétrons (CC1401-03), mostram um aumento da expressão significativo no mutante *cspC* na fase estacionária (**Tabela 10**). O complexo *cbb₃* possui alta afinidade por oxigênio e apresenta um papel importante em condições de baixas concentrações de O₂. A diminuição do fluxo da cadeia de transporte de elétrons na fase estacionária pode ser um mecanismo de defesa para proteger contra a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) gerado durante o transporte de elétrons, como também para prevenir o consumo de reservas endógenas (NYSTRÖM, 2004). Algumas terminal-oxidases já foram associadas à resposta ao estresse oxidativo (LINDQVIST et al., 2000).

Em *Rhodobacter sphaeroides*, a terminal oxidase *cbb₃* foi associada ao controle da atividade de PrrB, uma histidina quinase da família de RegB, envolvida no controle do estado redox da célula (OH JI, KO; KAPLAN, 2000). Os autores propuseram que em condições aeróbicas, a oxidase *cbb₃* funciona como um sensor de O₂ transduzindo um sinal inibitório para PrrB, evitando assim a expressão de genes relacionados à fotossíntese. Com base no aumento da expressão de genes da cadeia respiratória, de *lovK*, e do gene da superóxido dismutase SodA no mutante *cspC*, pode-se formular a hipótese de que a célula possa estar em estresse oxidativo na fase estacionária. É interessante que através de ensaios de atividade de beta-galactosidase com uma fusão do promotor do gene *dps* ao gene *lacZ*, também foi observado um aumento da expressão de *dps* no mutante *cspC* (SANTOS, 2011). Em *E. coli*, *dps* faz parte do regulon de OxyR e auxilia na proteção do DNA contra peróxidos (ALTUVIA et al., 1994) e ensaios preliminares em *C. crescentus* feitos pelo nosso grupo, apontam a Dps como sendo importante para a resposta a peróxido de hidrogênio (RODRIGUES, 2012).

4.6.3 O efeito de *cspC* na estabilidade de mRNAs

Há registros na literatura de várias formas de regulação feitas por proteínas de choque frio. Por exemplo, CspA pode se ligar a RNA e ssDNA e esta proteína é conhecida por desestabilizar estruturas secundárias de RNA (GRAUMANN; MARAHIEL, 1997; JIANG; HOU; INOUE, 1997; JONES; INOUE, 1994). A proteína associada ao nucleóide, H-NS, que é induzida em choque-frio se liga preferencialmente a dsDNA e está associada à regulação do choque frio (ATLUNG; INGMER 1997; DERSCH et al., 1994). CspA, a principal CSP de resposta ao choque frio em *E. coli*, reconhece uma porção da região promotora de *hns* agindo como ativador transcricional (HORN et al., 2007; LA TEANA et al., 1991). Além disso, CspA e CspE foram descritas como antiterminadoras da transcrição em *E. coli* (BAE et al., 2000).

Inicialmente, para entender de que forma *cspC* atua sobre seus alvos, realizamos um ensaio de medida da meia vida do mRNA do gene CC0682 para averiguar a hipótese de CspC estabilizar o mRNA deste gene. Este gene foi escolhido devido a sua alta expressão tanto na fase exponencial como na fase estacionária e também por seus níveis de expressão serem muito baixos no mutante (**Tabela 9**). Primeiramente culturas de células de NA1000 (pMR20), do mutante *cspC* MM26 (pMR20) e da linhagem complementada MM26 (pMR20-*cspC*) na DO₆₀₀ igual a 0,5 foram coletadas e divididas em cinco alíquotas. Foram adicionados 20 µg/ml de rifampicina, de modo que a transcrição fosse interrompida, e o RNA total foi extraído em vários tempos após a adição (0', 3', 6', 9' e 12 minutos). Posteriormente, o RNA total destas células foi convertido a cDNA e este foi utilizado em uma reação de qRT-PCR com os oligonucleotídeos do gene do mRNA a ser estudado. A **Figura 26** mostra que o decaimento do mRNA do gene CC0682 foi mais rápido no mutante *cspC* comparado àquele na linhagem selvagem e a linhagem complementada. Este resultado indica que CspC pode estabilizar o mRNA do gene CC0682 e com base nesse dado, o decaimento de mRNA de outros genes também foram analisados.

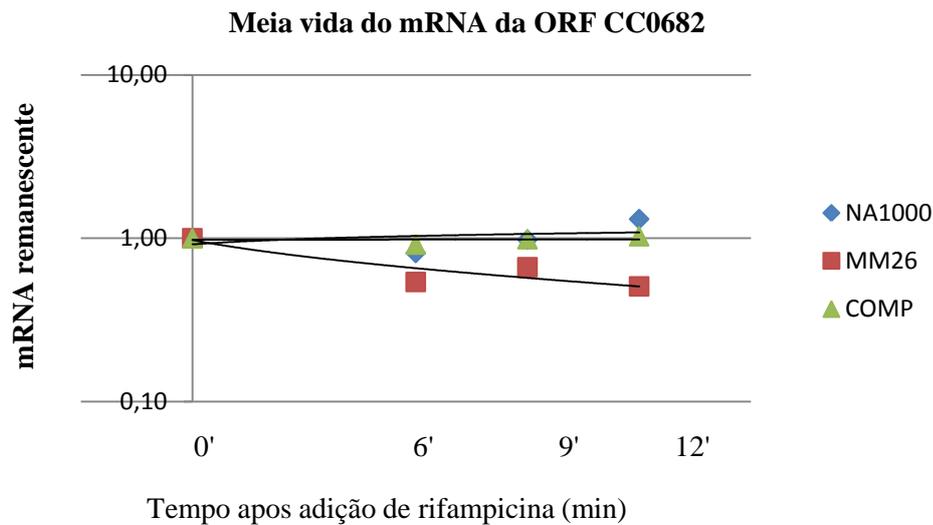


Figura 26: Ensaio de determinação da meia-vida do mRNA da ORF CC0682. Culturas de células de NA1000 (pMR20), MM26 (pMR20) e da linhagem complementa MM26 (pMR20-*cspC*) foram incubadas em meio PYE até 24 horas. No ponto 0' a rifampicina não foi adicionada, e os pontos 6', 9', 12' correspondem aos tempos após a adição do antibiótico. As concentrações relativas de mRNA da ORF CC0682 foram obtidas normalizando cada ponto em relação ao ponto imediatamente antes da adição da rifampicina.

CtrA é degradada pela protease ClpXP, porém, quando está ligada a dsDNA contendo o seu próprio sítio de ligação, CtrA não pode mais ser degradada. Com base nestes dados Cantin, 2012 estudou o envolvimento de outros fatores endógenos na degradação de CtrA, entre eles a proteína SicP. CtrA interage com SciP, o que provoca aumento da formação do complexo CtrA-DNA e, assim SciP pode aumentar a estabilização de CtrA na presença de DNA. Diferente de CtrA, SciP pode ser degradada por Lon mas não por ClpXP. Além disso, foi verificado que o complexo CtrA-DNA-SciP protege SciP da degradação por Lon (CANTIN, 2012). Em geral, a degradação de proteínas em procariotos ocorre através de uma superfamília de proteínas AAA⁺ (ATPases associadas com várias atividades celulares) como exemplo, ClpAP, ClpXP, ClpYQ, FtsH e Lon, que são proteases dependentes de ATP (Revisto em TRUSCOTT et al., 2011). Células que não apresentam ClpAP ou ClpXP funcional durante períodos prolongados de fase estacionária apresentam uma morte acelerada, indicando uma importante função na fase estacionária (Revisto em LLORENS et al., 2010). Lon e ClpB pertencem ao regulon de choque de calor de bactérias e além do envolvimento no redobramento ou degradação de proteínas com dobramento incorreto, participa também do controle pós-transcricional de proteínas regulatórias por meio de degradação destas (TSILIBARIS et al., 2006; VAN MELDEREN; AERSTEN, 2009). Em *C. crescentus*, mutantes *lon* apresentam anomalias na divisão celular e parecem ser incapaz de controlar o

início da replicação do DNA. Lon nesta bactéria controla os níveis de CcrM, uma DNA metiltransferase responsável por metilar o cromossomo de células sésseis e assim o ciclo celular pode ser completado (STEPHENS et al., 1996).

Nos ensaios de microarranjos de DNA de *cspC*, tanto *sciP* como *lon* e *clpB* aparecem com os níveis de expressão alterados na fase estacionária (**Tabelas 9 e 10**), sendo que a expressão de *sciP* diminuiu cerca de 4 vezes no mutante *cspC*. Para investigar se além do controle pós-traducional que SciP possui via Lon, CspC também pode estar envolvido de alguma forma na regulação de *sciP* realizamos um ensaio para avaliar a meia vida de mRNA de *sciP* na fase estacionária. O decaimento do mRNA deste gene também foi mais rápido no mutante comparado a linhagem selvagem e linhagem complementada (**Figura 27**), sendo assim, pode-se especular que essa seja a maneira como CspC está alterando a expressão de alguns dos outros genes que tiveram a sua expressão alterada.

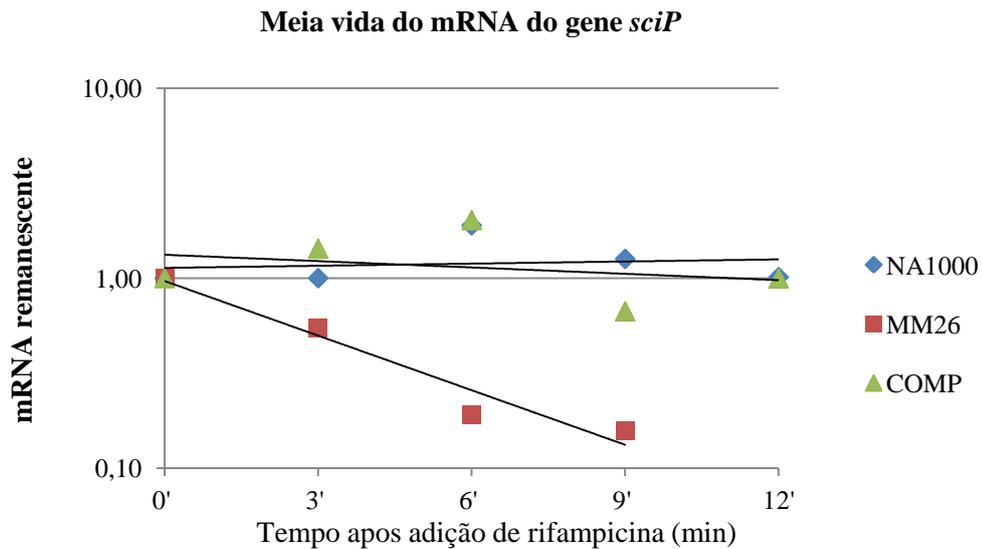


Figura 27. Ensaio de determinação da meia-vida do mRNA de *sciP*. Culturas de células de NA1000 pMR20, MM26 pMR20 e da linhagem complementada MM26 (pMR20-*cspC*) foram incubadas em meio PYE até 24 horas. No ponto 0' a rifampicina não foi adicionada, e os pontos 3', 9' e 12' correspondem aos tempos após a adição de rifampicina. As concentrações relativas de mRNA de *sciP* foram obtidas normalizando cada ponto em relação ao ponto imediatamente antes da adição de rifampicina.

Os dados de microarranjos de DNA mostram que duas enzimas chaves do ciclo do glioxilato, isocitrato liase (*aceA*) e malato sintetase (*aceB*) e duas outras enzimas da mesma via, malato desidrogenase (*mdh*) e acetil-CoA sintetase (*acs*), foram menos expressas no mutante *cspC* na fase estacionária (**Figura 22**). Três destes genes são altamente induzidos na fase estacionária, como foi observado através de ensaios de microarranjos de DNA: *aceA*, 71,6x; *aceB*, 88,7x; e *acs*, 20x (**Tabela 9**) indicando que o ciclo do glioxilato é importante durante esta fase. Em *C. crescentus* NA1000 *aceA* está em operon com a ORF CCNA01842 que codifica uma proteína hipotética, mas estes dois genes não são co-transcritos com o gene a jusante, *aceB* (dados não mostrados). Para avaliar se CspC pode afetar a estabilidade dos mRNAs dos genes do ciclo do glioxilato, a taxa de decaimento do mRNA de *aceA* foi medida nas linhagens NA1000 (pMR20), no mutante *cspC* MM26 (pMR20) e na linhagem complementada MM26 (pMR20-*cspC*) (**Figura 28**). Os ensaios de decaimento mostraram que o mRNA de *aceA* decai mais rapidamente no mutante *cspC* comparado à linhagem parental NA1000 e à linhagem complementada. Uma hipótese seria que CspC pode estabilizar o mRNA de *aceA*, e a ligação de *cspC* a este mRNA preveniria o acesso de RNases, porém, a possibilidade deste efeito ser indireto, por exemplo, mediado por um sRNA, não pode ser descartada. O ensaio também foi feito para o gene *aceB*, porém, os resultados não mostraram

o mesmo efeito no mutante *cspC* (**Figura 29**), indicando que os níveis de menor expressão destes dois genes no mutante *cspC* pode ser provocado por mecanismos diferentes ou devido a algum problema técnico com as condições e ou método utilizado.

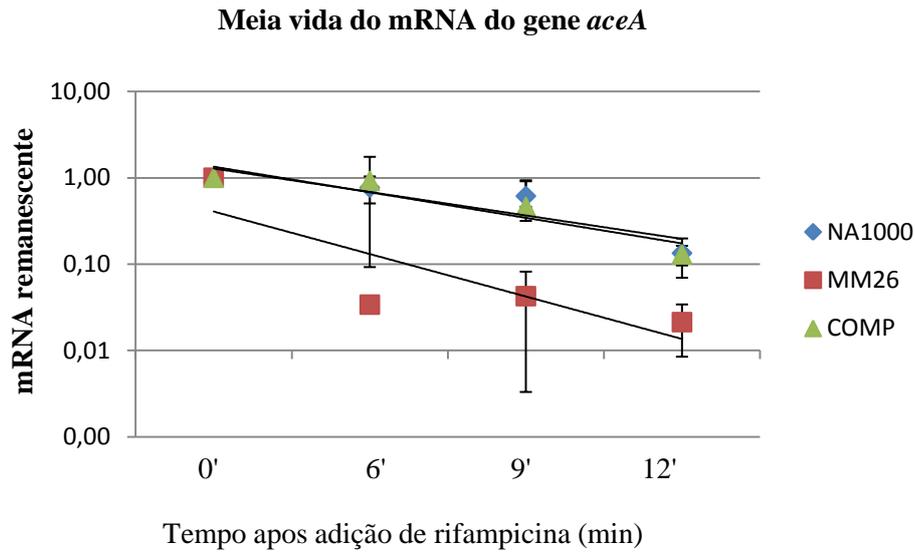


Figura 28. Ensaio de determinação da meia-vida do mRNA de *aceA*. Culturas de células de NA1000 pMR20, MM26 pMR20 e da linhagem complementa MM26 (pMR20-*cspC*) foram incubadas em meio PYE até 24 horas. No ponto 0' a rifampicina não foi adicionada, e os pontos 6', 9', 12' correspondem aos tempos após a adição do antibiótico. As concentrações relativas de mRNA de *aceA* foram obtidas normalizando cada ponto em relação ao ponto imediatamente antes da adição da rifampicina. As barras pretas indicam o desvio padrão. Os valores representam a média de medidas de duas replicatas biológicas.

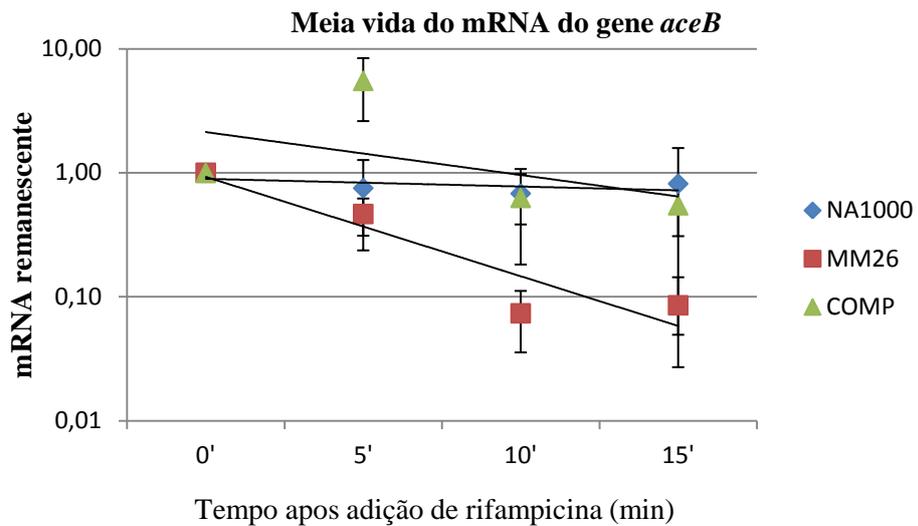
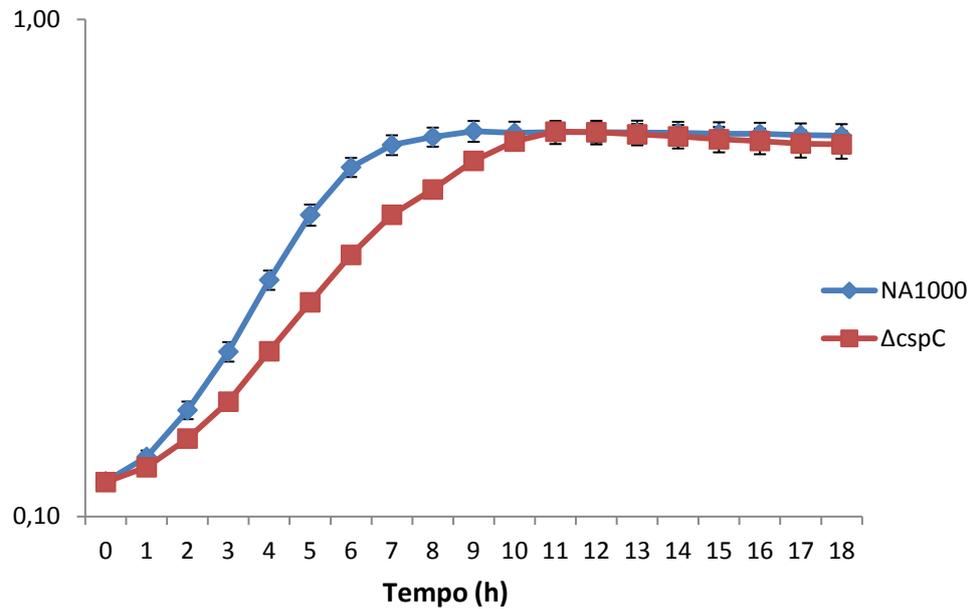


Figura 29. Ensaio de determinação da meia-vida do mRNA de *aceB*. Culturas de células de NA1000 pMR20, MM26 pMR20 e da linhagem complementa MM26 (pMR20-*cspC*) foram incubadas em meio PYE até 24 horas. No ponto 0' a rifampicina não foi adicionada, e os pontos 5', 10' e 15' correspondem aos tempos após a adição de rifampicina. As concentrações relativas de mRNA de *aceB* foram obtidas normalizando cada ponto em relação ao ponto imediatamente antes da adição de rifampicina. As barras pretas indicam o desvio padrão. Os valores representam a média de medidas de duas replicatas biológicas.

Para confirmar a importância de *cspC* para o funcionamento do ciclo do glioxilato, o mutante *cspC* e a linhagem parental NA1000 foram cultivados em meio mínimo M2 contendo apenas acetato como fonte de carbono. O crescimento foi monitorado durante cinco dias e o consumo de acetato foi quantificado (**Figura 30**). Embora a linhagem NA1000 apresente um atraso no crescimento com uma fase lag de 48 horas, esta linhagem foi capaz de atingir a fase estacionária e consumir todo o acetato disponível no meio. Em contrapartida, nenhum crescimento e consumo de acetato foi observado no mutante *cspC*, indicando que esta linhagem é incapaz de crescer nessas condições.

(A)



(B)

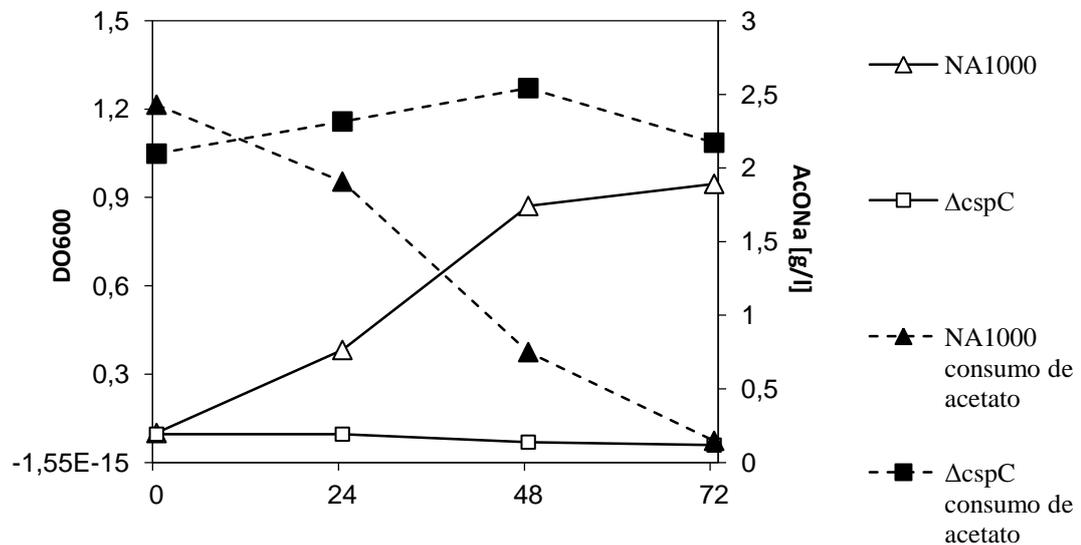


Figura 30. Crescimento e consumo de acetato nas linhagens NA1000 e mutante *cspC*. Culturas das linhagens NA1000 (triângulos brancos) e mutante *cspC* (quadrados brancos) foram cultivadas em M2G (0,2% de glicose), lavadas com M2 sais e inoculadas em meio M2G (A) ou M2 com substituição de glicose por acetato de sódio a 0,2% (B). O crescimento celular foi monitorizado por medição da DO₆₀₀. O consumo de acetato (NA1000: triângulos preenchidos; *cspC*: quadrados preenchidos) foi determinado em cada ponto de tempo.

As similaridades encontradas entre os três ensaios de microarranjos de DNA (carência de carbono, exponencial x estacionária e mutante *cspC* x NA1000 na fase estacionária) fortemente sugerem que *cspC* apresenta um importante papel na resposta a carência nutricional na fase estacionária. A modulação dos níveis do mRNA de *aceA* feita por CspC revelou um mecanismo molecular que pode ser relevante em outras bactérias. Em *E. coli*, quando há escassez de glicose na fase estacionária, o acetato deixa de ser excretado e começa a ser utilizado. Esta conversão é catalisada pela enzima Acetil-CoA sintetase, que converte acetato em Acetil-CoA, mas em algumas bactérias, como *Corynebacterium glutamicum* o consumo de acetato independe do consumo de outras fontes de carbono. A *C. glutamicum* é uma bactéria gram-positiva, presente no solo e não patogênica. Maeda e Masaaki (2012) propuseram que nesta bactéria, a RNase E/G está envolvida na adaptação à mudança de fonte de carbono, de glicose para acetato, via degradação do mRNA de *aceA* que codifica a isocitrato liase. Comparando o padrão de expressão de proteínas em acetato, entre as linhagem selvagem e o mutante $\Delta rneG$, os autores observaram um aumento da produção da proteína isocitrato liase de cerca de 2,3 vezes e um consumo de acetato mais rápido em $\Delta rneG$. Ensaio de atividade de β -galactosidase e 3' RACE revelaram que neste mutante a estabilidade do mRNA de *aceA* é dependente da região 3'UTR. Estruturas secundárias foram encontradas nesta região, sugerindo um possível mecanismo de degradação do mRNA de *aceA* em *C. glutamicum* (MAEDA; MASAAKI, 2012).

O interessante é que, assim como o trabalho de Marda e Masaaki (2012), também encontramos nas regiões 3'UTR dos mRNAs dos genes *aceB* (CC1765) e *cspC*, duas sequências que formam estruturas secundárias que são separadas por regiões ricas em AT (**Figura 31**), mas a degradação por RNases ainda não foi determinada. Em *E. coli*, ácidos graxos de cadeia longa podem servir como fonte de carbono para células em carência nutricional (NYSTRÖM, 2004). O mau funcionamento da via do ciclo do glioxilato pode ser uma das razões para a perda de viabilidade do mutante *cspC* na fase estacionária, momento em que fontes alternativas de carbono podem ser necessárias. As condições de crescimento da fase estacionária são semelhantes ao ambiente natural em que as bactérias vivem. Uma plausível explicação à ativação do ciclo do glioxilato na fase estacionária é que *C. crescentus* pode utilizar acetato ou outros ácidos como fonte alternativa de carbono oriunda do produto de fermentação de outras bactérias que se encontram no mesmo ambiente.

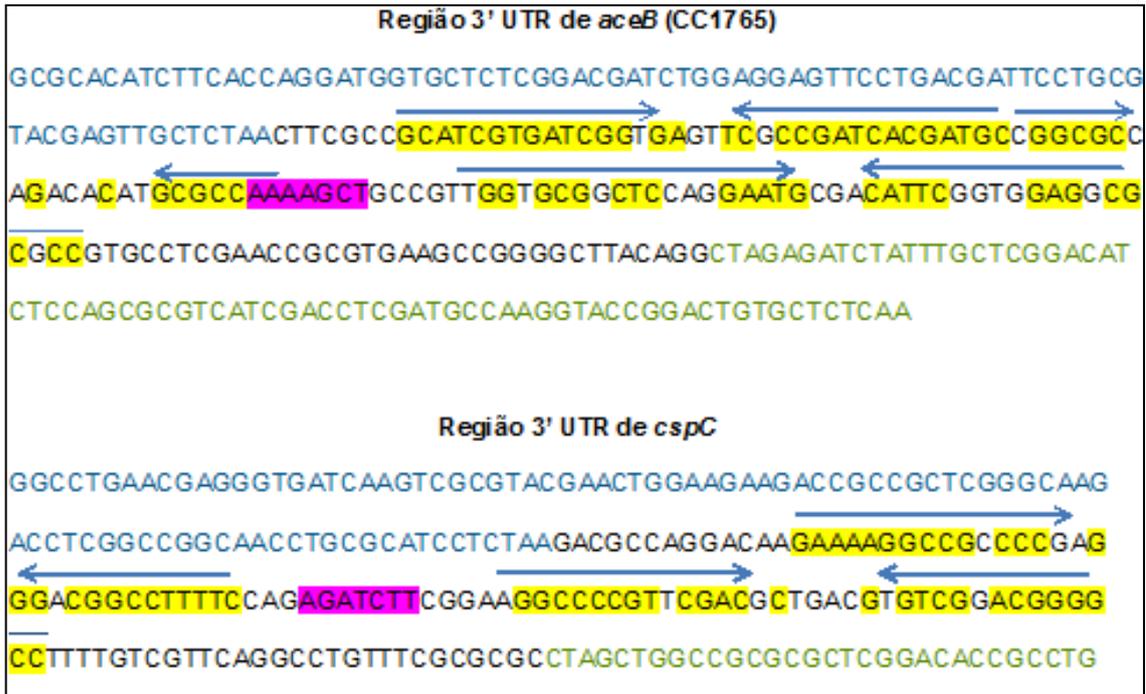


Figura 31: Possíveis regiões de ligação de CspC. As setas e os nucleotídeos sombreados em amarelo indicam a sequência de formação das alças das estruturas secundárias. Os nucleotídeos sombreados em roxo, as regiões ricas em AT. Em azul as regiões codificantes, em verde o gene vizinho transcrito na região oposta e em preto as regiões intergênicas.

5 CONCLUSÕES

- Nenhuma das construções testadas complementam totalmente os fenótipos de sensibilidade a H_2O_2 e as alterações de morfologia que o mutante *cspC* apresenta, indicando que CspC em *Caulobacter crescentus* necessita de ambos os domínios para exercer sua função biológica na resposta a estresse oxidativo e para restaurar a morfologia da célula.
- As mutações pontuais nos dois domínios proporcionam fenótipos mais severos que a falta de *cspC*, sendo possível especular que a expressão de uma proteína CspC inativa pode ser mais prejudicial para a célula que a própria falta de CspC.
- Nenhuma proteína de choque frio (CSP) de *C. crescentus* é capaz de complementar o fenótipo de sensibilidade ao choque frio de *E. coli* BX04. Entretanto, os domínios de choque frio de CspC de *C. crescentus* individualmente são capazes de complementar este fenótipo.
- Os mutantes *regA* e *regB* apresentam queda na viabilidade na presença de H_2O_2 .
- RegA não é o regulador direto de *cspC*, já que a expressão do gene *cspC* e também da proteína CspC são aumentadas no mutante *regA*.
- A expressão de vários genes foi reduzida na ausência de CspC, ressaltando o gene essencial *sciP*, *sigU*, genes que codificam enzimas do ciclo do glioxilato e de resposta a estresse oxidativo.
- Genes envolvidos na assimilação de sulfato e biossíntese de metionina tiveram a expressão aumentada na ausência de CspC na fase estacionária.
- A diminuição da expressão dos genes *sciP*, *aceA* e CC0682, no mutante *cspC* pode ser devida a queda na meia vida do mRNA, sugerindo que a principal regulação deste gene é através de estabilização de RNA.
- A essencialidade de *cspC* para a sobrevivência na fase estacionária pode ser resultante de seu papel na regulação do ciclo do glioxilato.

REFERÊNCIAS¹

ATLUNG, T.; INGMER, H. H-NS: a modulator of environmentally regulated gene expression. **Mol. Microbiol.**, v. 24, n. 1, p. 7-17, 1997.

ALVAREZ-MARTINEZ, C. E.; BALDINI, R. L.; GOMES, S. L. A *Caulobacter crescentus* extracytoplasmatic function sigma factor mediating the response to oxidative stress in stationary phase. **J. Bacteriol.**, v. 188, n. 5, p. 1835-1846, 2006.

ALVAREZ-MARTINEZ, C. E.; LOURENÇO, R. F; BALDINI, R.L.; LAUB, M.T.; GOMES S.L. The ECF sigma factor σ_T is involved in osmotic and oxidative stress response in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 66, p. 1240-1255, 2007.

ALTUVIA, S.; ALMIRON, M.; HUISMAN, G.; KOLTER, R.; STORZ, G. The dps promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and σ_s in stationary phase. **Mol. Microbiol.**, v. 13, n. 2, p. 265-272, 1994.

AMICK, J. D.; BRUN, Y. V. Anatomy of a bacterial cell cycle. **Gen. Biol.**, v. 2, n. 7, p. 1020.1–1020.4, 2001.

AUSMEES, N.; JACOBS-WAGNER, C. Spatial and temporal control of differentiation and cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 225-247, 2003.

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

BAE, W.; XIA, B.; INOUE, M.; SEVERINOV, K. *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 97, n. 14, p. 7784-7789, 2000.

BALHESTEROS, H. **Análise do papel do gene cspC de *Caulobacter crescentus* e de sua regulação**. 2009. 126 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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. Microbiol.**, v. 192, n. 9, p. 747-758, 2010.

BATTESTI, A.; MAJDALANI, N.; GOTTESMAN, S. The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 65, p. 189-213, 2011.

¹De acordo com:

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

BORISOV, V. B.; FORTE, E.; DAVLETSHIN, A.; MASTRONICOLA, D.; SARTI, P.; GIUFFRÈ, A. Cytochrome bd oxidase from *Escherichia coli* displays high catalase activity: an additional defense against oxidative stress. **FEBS Lett.**, v. 587, n. 14, p. 2214-2218, 2013.

BRITOS, L.; ABELIUK, E.; TAVERNER, T.; LIPTON, M.; MCADAMS, H.; SHAPIRO, L. Regulatory response to carbon starvation in *Caulobacter crescentus*. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18179, 2011.

BROWN, E. C.; JACKSON, R. J. All five cold-shock domains of UNR (upstream of N-ras) are required for stimulation of human rhinovirus RNA translation. **J. Gen. Virol.**, v. 85, p. 2279–2287, 2004.

BOUSSADIA, O.; AMIOT, F.; CASES, S.; TRIQUENEAUX, G.; JACQUEMIN-SABLON, H.; DAUTRY, F. Transcription of *unr* (upstream of N-ras) down-modulates N-ras expression in vivo. **FEBS Lett.**, v. 420, p. 20–24, 1997.

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

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 reports**, v. 43, n. 1, p. 1-8, 2009.

CHIANG, S. M.; SCHELLHORN, H. E.; Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 525, n. 2, p. 161-169, 2012.

CHATTERJEE, D. K.; BOURQUIN, A. W. Metabolism of aromatic compounds by *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 169, n. 5, p. 1993-1996, 1987.

CHIANG, S. M.; SCHELLHORN, H. E.; Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 525, n. 2, p. 161-9, 2012.

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

CHUBUKOV, V.; SAUER, U. Environmental dependence of stationary-phase metabolism in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 80, n. 9, p. 2901-2909, 2014.

CANTIN, A. M. **Proteolytic regulation of CtrA, the master regulator of cell cycle in *Caulobacter Crescentus***. 2012. Masters of Science - Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Massachusetts Amherst, U.S.A., 2012.

COHEN-OR, I.; SHENHAR, Y.; BIRAN, D.; RON, Z. E. CspC regulates rpoS transcript levels and complements hfq deletions. **Res. Microbiol.**, v. 161, p. 694-700, 2010.

COLLIER, J. Regulation of chromosomal replication in *Caulobacter crescentus*. **Plasmid**, v. 67, n. 2, p. 76-87, 2012

COMOLLI, J. C.; DONOHUE, T. J. *Pseudomonas aeruginosa* RoxR, a response regulator related to *Rhodobacter sphaeroides* PrrA, activates expression of the cyanide-insensitive terminal oxidase. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 755–768, 2002.

COSSEAU, C.; BATUT, J. Genomics of the ccoNOQP encoded cbb3oxidase complex in bacteria. **Arch. Microbiol.**, v.181, p. 89–96, 2004.

CROSSON, S.; MCGRATH, P. T.; STEPHENS, C.; MCADAMS, H. H.; SHAPIRO, L. Conserved modular design of an oxygen sensory signaling network with species-specific output. **PNAS**, v. 102, n. 22, p. 8018–8023, 2005.

DA 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.

DE MENDOZA, D.; KLAGES U. A.; CRONAN, J. E. Thermal regulation of membrane fluidity in *Escherichia coli*. Effects of overproduction of beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase I. **J. Biol. Chem.**, v. 258, p. 2098-3101, 1983.

DERSCHE, P.; KNEIP, S.; BREMER, E. The nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is required for the efficient adaptation of *Escherichia coli* K-12 to a cold environment. **Mol. Gen. Genet.**, v. 245, p. 255-259. 1994.

DONG, T.; SCHELLHORN H. E. Control of RpoS in global gene expression of *Escherichia coli* in minimal media. **Mol. Genet. Genomics**, v. 281, n. 1, p. 19-33, 2009.

DUNN, M. F.; RAMI, J. A.; HERNA, I. Major roles of isocitrate lyase and malate synthase in bacterial and fungal pathogenesis, **Microbiology**, v. 155, n. 10, p. 3166–3175, 2009.

ELSEN, S.; SWEM, L. R.; SWEM, D. L.; BAUER, C. E. RegB/RegA, a Highly Conserved Redox-Responding Global Two-Component Regulatory System **Microbiology and Molecular Biology**, v. 68, n. 2 p. 263–279, 2004.

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

EMMERICH, R.; STREHLER, P.; HENNECKE, H.; FISCHER. H. M. An imperfect inverted repeat is critical for DNA binding of the response regulator RegR of *Bradyrhizobium japonicum*. **Nucleic Acids Res.**, v. 28, n. 21, p. 4166-4171, 2000.

ENGLAND, J. C.; PERCHUK, B. S.; LAUB, M. T.; GOBER, J. W. Global regulation of gene expression and cell differentiation in *Caulobacter crescentus* in response to nutrient availability. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 3, p. 819-833, 2010.

ERASO, J. M.; KAPLAN, S. *prpA*, a putative response regulator involved in oxygen regulation of photosynthesis gene expression in *Rhodobacter sphaeroides*. **J. Bacteriol.**, v. 176, n. 1, p. 32-43, 1994.

ETTEMA, T. J.; ANDERSSON, S. G. The alpha-proteobacteria: the Darwin finches of the bacterial world. **Biol. Lett.**, v. 23, n. 3, p. 429-432, 2009.

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

FERBER, D. M.; KHAMBATY, F.; ELY, B. Utilization of histidine by *Caulobacter crescentus*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 134, n. 8, p. 2149-2154, 1988.

FERNÁNDEZ-PIÑAR, R.; RAMOS, J. L.; RODRÍGUEZ-HERVA, J. J.; ESPINOSA-URGEL, M. A two-component regulatory system integrates redox state and population density sensing in *Pseudomonas putida*. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 23, p.7666-7674, 2008.

FIEBIG, A.; ROJAS, C. M. C.; SIEGAL-GASKINS, D.; CROSSON, S. Interaction specificity, toxicity, and regulation of a paralogous set of ParE/RelE-family toxin-antitoxin systems. **Mol. Microbiol.**, v.77, n.1, p. 236–251, 2010.

FOREMAN, R.; FIEBIG, A.; CROSSON, S. The LovK-LovR Two-Component System is a Regulator of the General Stress Pathway in *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 194, n.12, 3038-3049, 2012.

FRASER, K. R.; TUIITE, N. L.; BHAGWAT, A.; O'BYRNE, C. P. Global effects of homocysteine on transcription in *Escherichia coli*: induction of the gene for the major cold-shock protein CspA. **Microbiology**, v. 152, n. 8, p. 2221–2231, 2009.

GOLDMAN, B. S.; GABBERT, K. K.; KRANZ, R. G. The temperature-sensitive growth and survival phenotypes of *Escherichia coli* *cydDC* and *cydAB* strains are due to deficiencies in cytochrome *bd* and are corrected by exogenous catalase and reducing agents. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 21, p. 6348–6351, 1996.

GORA, K. G., et al. A cell-type-specific protein-protein interaction modulates transcriptional activity of a master regulator in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Cell.**, v. 39, p. 455 - 467, 2010.

GRAUMANN, P. L.; WENDRICH, T. M.; WEBER, M. H.; SCHRODER, K.; MARAHIEL, M. A. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. **Mol. Microbiol.**, v. 25, n. 4, p. 741-756, 1997.

GRAUMANN, P. L.; MARAHIEL, M. A. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. **Trends Biochem. Sci.**, v. 23, p. 286-290, 1998.

_____. Cold shock proteins CspB and CspC are major stationary-phase induced proteins in *Bacillus subtilis*. **Arch. Microbiol.**, v. 171, n. 2, p. 135-138, 1999.

GREEN, J.; PAGET, M. S. Bacterial redox sensors. **Nature Microbiology**, v. 2, n. 12, p. 954-966, 2004.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. **Free radicals in biology and medicine**. New York: Oxford University Press, 2007.

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

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.

HOTTES, A. K.; MEEWAN, M.; YANG, D.; ARANA, N.; ROMERO, P.; MCADAMS, H. H.; STEPHENS, C. Transcriptional profiling of *Caulobacter crescentus* during growth on complex and minimal media. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 5, p. 1448-1461, 2004.

INOUE, M. Multipurpose expression cloning vehicles in *Escherichia coli*. In: _____. **Experimental manipulation of gene expression**. New York, NY: Academic Press, 1983, 315 p.

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

IUCHI, S.; MATSUDA, Z.; FUJIWARA, T.; LIN, E. C. The *arcB* gene of *Escherichia coli* encodes a sensor-regulator protein for anaerobic repression of the *arc* modulon. **Mol. Microbiol.**, v. 4, n. 5, p. 715-727, 1990.

JIANG, W.; HOU, Y.; INOUE, M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 1, p. 196-202, 1997.

JONES, P. G.; INOUE, M. The cold-shock response--a hot topic. **Mol. Microbiol.**, v. 11, n. 5, p. 811-818, 1994.

JONES, P. G.; INOUE, M. RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response. **Mol. Microbiol.**, v. 21, n. 6, p. 1207-1218, 1996.

KIM, Y.; WANG, X.; ZHANG, X. S.; GRIGORIU, S.; PAGE, R.; PETI, W.; WOOD, K. T. *Escherichia coli* toxin/antitoxin pair MqsR/MqsA regulate toxin CspD. **Environ. Microbiol.**, v. 12, n. 5, p. 1105-1121, 2010.

KOLTER, R.; SIEGELE, D. A.; TORMO, A. The stationary phase of the bacterial life cycle. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 47, p. 855-874, 1993.

KORNBERG, H. L.; KREBS, H. A. Synthesis of cell constituents from C2-units by a modified tricarboxylic acid cycle. **Nature**, v.179 n. 4568, p. 988–991, 1957.

LA TEANA, A.; BRANDI, A.; FALCONI, M.; SPURIO, R.; PON, C. L.; GUALERZI, C. O. Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 88, n. 23, p. 10907-10911, 1991.

LANDSMAN, D. RNP-1, an RNA-binding motif is conserved in the DNA-binding cold shock domain. **Nucleic Acids Res.**, v. 20, n. 11, p. 2861-2864, 1992.

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

LANG, E. A. S. **Caracterização dos genes que codificam proteínas com domínios de choque frio em *Caulobacter crescentus***. 2005. 107 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

LANGKLOTZ, S.; NARBERHAUS, F. The *Escherichia coli* replication inhibitor CspD is subject to growth-regulated degradation by the Lon protease. **Mol. Microbiol.**, v. 80, n. 5, p. 1313-1325, 2011.

LAUB, M. T.; MCADAMS, H. H.; FELDBLYUM, T.; FRASER, C. M.; SHAPIRO, L. Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. **Science**, v. 290 n. 5499, p. 2144-2148, 2000.

LAUB, M. T.; CHEN, S. L.; SHAPIRO, L.; MCADAMS H. H. Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 99, n. 7, p. 4632-4637, 2002.

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

LASKER, K.; SCHRADER, J. M.; MEN, Y.; MARSHIK, T.; DILL, D. L.; MCADAMS, H. H.; SHAPIRO, L. CauloBrowser: a systems biology resource for *Caulobacter crescentus*. **Nucleic Acids Res.**, v. 4, n. 44, p. 640-645, 2016.

LESLIE, D. J.; HEINEN, C.; SCHRAMM, F. D.; THÜRING, M.; AAKRE, C. D.; MURRAY, S. M.; LAUB, M. T.; JONAS, K. Nutritional Control of DNA Replication

Initiation through the Proteolysis and Regulated Translation of DnaA. **PLoS Genet.**, v. 11, n. 7, p. 1-25, 2015.

LEWIS, K. Persister cells, dormancy and infectious disease. **Nat. Rev. Microbiol.**, n. 5, v. 1, p. 48-56, 2007.

LINDQVIST, A.; MEMBRILLO-HERNÁNDEZ, J.; POOLE, R. K.; COOK, G. M. Roles of respiratory oxidases in protecting *Escherichia coli* K12 from oxidative stress. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 78, n. 1, p. 23–31, 2000.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2(-\Delta\Delta C(T))$. **Method. Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LLORENS, J. M. N.; TORMO, A. E.; GARCIA, E. E. M. Stationary phase in gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol.**, v. 34, p. 476-496, 2010.

LIU, M. Y.; YANG, H.; ROMEO T. The product of the pleiotropic *Escherichia coli* gene *csrA* modulates glycogen biosynthesis via effects on mRNA stability. **J. Bacteriol.**, v. 177, n. 10, p. 2663-2672, 1995.

LIU, X.; PEÑA SANDOVAL, G. R.; WANNER, B. L.; JUNG, W. S.; GEORGELLIS, D.; KWON, O. Evidence against the physiological role of acetyl phosphate in the phosphorylation of the ArcA response regulator in *Escherichia coli*. **J. Microbiol.**, v. 47, n. 5, p. 657-662, 2009.

LOURENÇO, R. F.; GOMES, S. L. The transcriptional response to cadmium, organic hydroperoxide, singlet oxygen and UV-A mediated by the sigmaE-ChrR system in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 72, n. 5, p. 1159-1170, 2009.

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

LUSHCHAK, V. I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.**, v. 153, n. 2, p. 175-190, 2010.

LYABIN, D. N.; ELISEEVA, I. A.; OVCHINNIKOV, L. P. YB-1 protein: functions and regulation. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 5, p. 95-110, 2014.

MAEDA, T.; WACHI, M. 3' Untranslated region-dependent degradation of the *aceA* mRNA, encoding the glyoxylate cycle enzyme isocitrate lyase, by RNase E/G in *Corynebacterium glutamicum*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.78, n. 24, p. 8753–8761, 2012.

MANSILLA, M. C.; DE MENDOZA, D. The *Bacillus subtilis* desaturase: a model to understand phospholipid modification and temperature sensing. **Arch. Microbiol.**, v. 183, p. 229-235. 2005.

MATSUMOTO, K.; WOLFFE, A. P. Gene regulation by Y-box proteins: coupling control of transcription and translation. **Trends. Cell. Biol.**, v. 8, n. 8, p. 318-323, 1998.

MAZZON, R. **Estudo de genes de *Caulobacter crescentus* importantes para a sobrevivência em baixas temperaturas.** 2011. 152 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MAZZON, R. R.; LANG, E. A.; SILVA, C. A.; 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.

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

MITROPHANOV, A. Y.; GROISMAN, E. A. Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. **Genes Dev.**, v. 22, n. 19, p. 2601–2611, 2008

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

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

NAKAMINAMI, K.; KARLSON, D. T.; IMAI, R. Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 27, n. 26, p. 10122-7, 2006.

NOGUEIRA, T.; SPRINGER, M. Post-transcriptional control by global regulators of gene expression in bacteria. **Curr. Opin. Microbiol. Apr.**, v. 3, n. 2, p. 154-158, 2000.

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

O'CONNELL, M.; HENRY, S.; SHAPIRO, L. Fatty acid degradation in *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 168, n. 1, p. 49-54, 1986.

OH, J. I.; KAPLAN, S. Redox signaling: globalization of gene expression. **EMBO J.**, v. 19, n. 16, p. 4237–4247, 2000.

PATEL, S.; FLETCHER, B.; SCOTT, D. C.; ELY, B. Genome sequence and phenotypic characterization of *Caulobacter segnis*. **Curr. Microbiol.**, v. 70, n. 3, p. 355-363, 2015.

PHADTARE, S.; INOUE, M. Role of CspC and CspE in regulation of expression of RpoS and UspA, the stress response proteins in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 4, p. 1205-1214, 2001.

PHADTARE, S.; INOUE, M.; SEVERINOV, K. The nucleic acid melting activity of *Escherichia coli* CspE is critical for transcription antitermination and cold acclimation of cells. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 9, p. 7239-7245, 2002.

PRESLEY, G. N.; PAYEA, M. J.; HURST, L. R.; EGAN, A. E.; MARTIN, B. S.; PERIYANNAN G. R. Extracellular gluco-oligosaccharide degradation by *Caulobacter crescentus*. **Microbiology**, v. 160, n. 3, p. 635-645, 2014.

POINDEXTER, J. S. Biological Properties and Classification of the *Caulobacter* Group. **Bacteriol. Rev.**, v. 28, p. 231-295, 1964.

POMPOSIELLO, P. J.; DEMPLE, B. Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. **Cell**, v. 19, n. 3, 2001.

PREVIATO, M. **Estuda da regulação de genes envolvidos na resposta a estresse oxidativo em *Caulobacter crescentus***. 2014. 134 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

PURCELL, E. B.; MCDONALD, C. A.; PALFEY, B. A.; CROSSON, S. An analysis of the solution structure and signaling mechanism of LovK, a sensor histidine kinase integrating light and redox signals. **Biochemistry**, v. 49, n. 31, p. 6761-6770, 2010.

QUON, K. C.; YANG, B.; DOMIAN, I. J.; SHAPIRO, L.; MARCZYNSKI, G. T. Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n. 1, p. 120-125, 1998.

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

ROCHA, R. P.; MIRANDA, A. C. P.; 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.

ROCHA, R. P. **A resposta SOS de *Caulobacter crescentus* e relações dos mecanismos de reparo com progressão do ciclo celular**. 2011. 169 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

RODRIGUES, M. **Estudo do papel de duas ferritinas no metabolismo de *Caulobacter crescentus***. 2012. 128 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

ROE, A. J.; O'BYRNE, C.; MCLAGGAN, D.; BOOTH, I. R. Inhibition of *Escherichia coli* growth by acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. **Microbiology**, v. 148, n. 7, p. 2215–2222, 2002.

ROMEO, T. Global regulation by the small RNA-binding protein CsrA and the non-coding RNA molecule CsrB. **Mol. Microbiol.**, v. 29, n. 6, p. 1321-1330, 1998.

ROMEO, T.; GONG, M.; LIU, M. Y.; BRUN-ZINKERNAGEL, A. M. Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size, and surface properties. **J. Bacteriol.**, v. 175, n. 15, p. 4744-4755, 1993.

ROMEO, T.; VAKULSKAS, C. A.; BABITZKE, P. Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems. **Environ. Microbiol.**, v. 15, n. 2, p. 313-324, 2013.

SANTOS, J. S. **Identificação de fatores de transcrição e sinais celulares que regulam a expressão do gene *cspC* em *Caulobacter crescentus***. 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SANTOS, J. S.; DA SILVA, C. A.; BALHESTEROS, H.; LOURENÇO, R. F.; MARQUES, M. V. CspC regulates the expression of the glyoxylate cycle genes at stationary phase in *Caulobacter*. **BMC Genomics**, v. 27, n. 16, p. 1-14, 2015.

SCHELLHORN, H. E.; AUDIA, J. P.; WEI, L. I.; CHANG, L. Identification of conserved, RpoS-dependent stationary-phase genes of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 23, p. 6283-6291, 1998.

SCHRODER, K.; GRAUMANN, P.; SCHNUCHEL, A.; HOLAK, T. A.; MARAHIEL, M. A. Mutational analysis of the putative nucleic acid-binding surface of the cold-shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of single-stranded DNA containing the Y-box motif. **Mol. Microbiol.**, v. 16, n. 4, p. 699-708, 1995.

SHAIKH, A. S.; TANG, Y. J.; MUKHOPADHYAY, A.; MARTÍN, H. G.; GIN, J.; BENKE, P. I.; KEASLING, J. D. Study of stationary phase metabolism via isotopomer analysis of amino acids from an isolated protein. **Biotechnol. Prog.**, v. 26, n. 1, p. 52-56, 2010.

SIEGELE, D. A.; KOLTER R. Isolation and characterization of an *Escherichia coli* mutant defective in resuming growth after starvation. **Genes Dev.**, v. 7, p. 2629–2640, 1993.

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

SILVA, C. A. P. T.; BALHESTEROS, H; MAZZON, R.R.; MARQUES, M. V. SpdR, a response regulator required for stationary phase induction of *Caulobacter crescentus* cspD. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 22, p. 5991-6000, 2010.

SHIN, S.; SONG, S. G.; LEE, D. S.; PAN, J. G.; PARK, C. Involvement of *iclR* and *rpoS* in the induction of *acs*, the gene for acetyl coenzyme A synthetase of *Escherichia coli* K-12. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 146, p. 103-108, 1997.

SINENSKY, M. Homeoviscous adaptation--a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 71, n. 2, p. 522-525, 1974.

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

SKERKER, M. J.; PRASOL, S. M.; PERCHUK, S. B.; BIONDI, G. E.; LAUB, M. T. Two component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. **PloS Biol.**, v. 3, p. 1770-1788, 2005.

STEPHENS, C.; REISENAUER, A.; WRIGHT, R.; SHAPIRO, L. A cell cycle-regulated bacterial DNA methyltransferase is essential for viability. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, p. 1210-1214, 1996.

STEINMAN, H. M; FAREED, F.; WEINSTEIN, L. Catalase-peroxidase of *Caulobacter crescentus*: function and role in stationary-phase survival. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 21, p. 6831-6836, 1997.

STORZ, G.; TARTAGLIA, L.A. OxyR: a regulator of antioxidant genes. **J. Nutr.**, v. 122, p. 627-630, 1992. Suppl. 3. Review.

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

SUNNARBORG, A.; KLUMPP, D.; CHUNG, T.; LAPORTE, D. C. Regulation of the Glyoxylate Bypass Operon: Cloning and Characterization of *iclR*. **J. Bacteriology**, v. 172, n. 5, p. 2642-2649, 1990.

SWEM, L. R. et al. The RegB/RegA two-component regulatory system controls synthesis of photosynthesis and respiratory electron transfer components in *Rhodobacter capsulatus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 309, n. 1, p. 121-138, 2001.

TAN, M. H.; KOZDON, J. B.; SHEN, X.; SHAPIRO, L.; MCADAMS, H. H. An essential transcription factor, SciP, enhances robustness of *Caulobacter cell* cycle regulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 107, n. 44, p. 18985-18990, 2010.

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.

TRIQUENEAUX, G.; VELTEN, M.; FRANZON, P.; et al. RNA binding specificity of Unr, a protein with five cold shock domains. **Nucleic Acids Res.**, v. 27, p.1926–34, 1999.

TRUSCOTT, K. N.; BEZAWORK-GELETA, A.; DOUGAN, D. A. Unfolded protein responses in bacteria and mitochondria: a central role for the ClpXP machine. **Wiley Periodicals**, v. 63, n.11, p. 955-963, 2011.

TSILIBARIS, V.; MAENHAUT-MICHEL, G.; VAN MELDEREN, L. Biological roles of the Lon ATP-dependent protease. **Res. Microbiol.**, v. 157, n. 8, p. 701-713, 2006.

UTTURKAR, S. M.; BOLLMANN, A.; BRZOSKA, R. M.; KLINGEMAN, D. M.; EPSTEIN, S. E.; PALUMBO, A. V.; BROWN, S. D. Draft Genome Sequence for *Caulobacter sp.* Strain OR37, a Bacterium Tolerant to Heavy Metals. **Genome Announc.**, v. 27, n. 3, p. 1-2, 2013.

UNDEN, G.; BONGAERTS, J. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1320, n. 3, p. 217–234, 1997.

UTSUMI, R. Bacterial signal transduction: networks and drug targets **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 631, p. 133-138, 2008.

VAN DER VEEN, S.; ABEE, T. Bacteria SOS response: a food safety perspective. **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 22, n. 2, p. 136-142, 2011.

VAN MELDEREN, L.; AERTSEN, A. Regulation and quality control by Lon-dependent proteolysis. **Res. Microbiol.**, v. 160, n. 9, p. 645-651, 2009.

WEBER, H.; POLEN, T.; HEUVELING, J.; WENDISCH, V. F.; HENGGE, R. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 5, p. 1591-1603, 2005.

WEI, B.; SHIN, S.; LAPORTE, D.; WOLFE, A. J.; ROMEO, T. Global regulatory mutations in *csrA* and *rpoS* cause severe central carbon stress in *Escherichia coli* in the presence of acetate. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 6, p. 1632-1640, 2000.

WORTINGER, M.; QUARDOKUS, E.; BRUN Y. Morphological adaptation and inhibition of cell division during stationary phase in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 40, p. 963-973., 1998.

XIA, B.; KE, H.; INOUE, M. Acquisition of cold sensitivity by quadruple deletion of the *cspA* family and its suppression by PNPase S1 domain in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 40, n. 1, p. 179-188, 2001.

YAMANAKA, K.; MITANI, T.; OGURA, T.; NIKI, H.; HIRAGA, S. Cloning, sequencing, and characterization of multicopy suppressors of a *mukB* mutation in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 13, n. 2, p. 301-312, 1994.

YAMANAKA, K.; FANG, L.; INOUE, M. The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. **Mol. Microbiol.**, v. 27, n. 2, p. 247-255, 1998.

YAMANAKA, K.; ZHENG, W.; CROOKE, E.; WANG, Y. H.; INOUE, M. CspD, a novel DNA replication inhibitor induced during the stationary phase in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 39, n. 6, p. 1572-1584, 2001.

ZHENG, J.; YATES, S. P.; JIA, Z. Structural and mechanistic insights into the bifunctional enzyme isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase AceK. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 367, n. 1602, p. 2656–2668, 2012.