

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

## 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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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*.

## 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](http://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  $\alpha$ -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<sup>-1</sup> na superfície da água para 0.5 mg L<sup>-1</sup> no fundo do oceano. Esses valores são extremamente baixos comparados à disponibilidade dos meios ricos produzidos em laboratório (10 g L<sup>-1</sup>). 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 (ROMEO; 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).

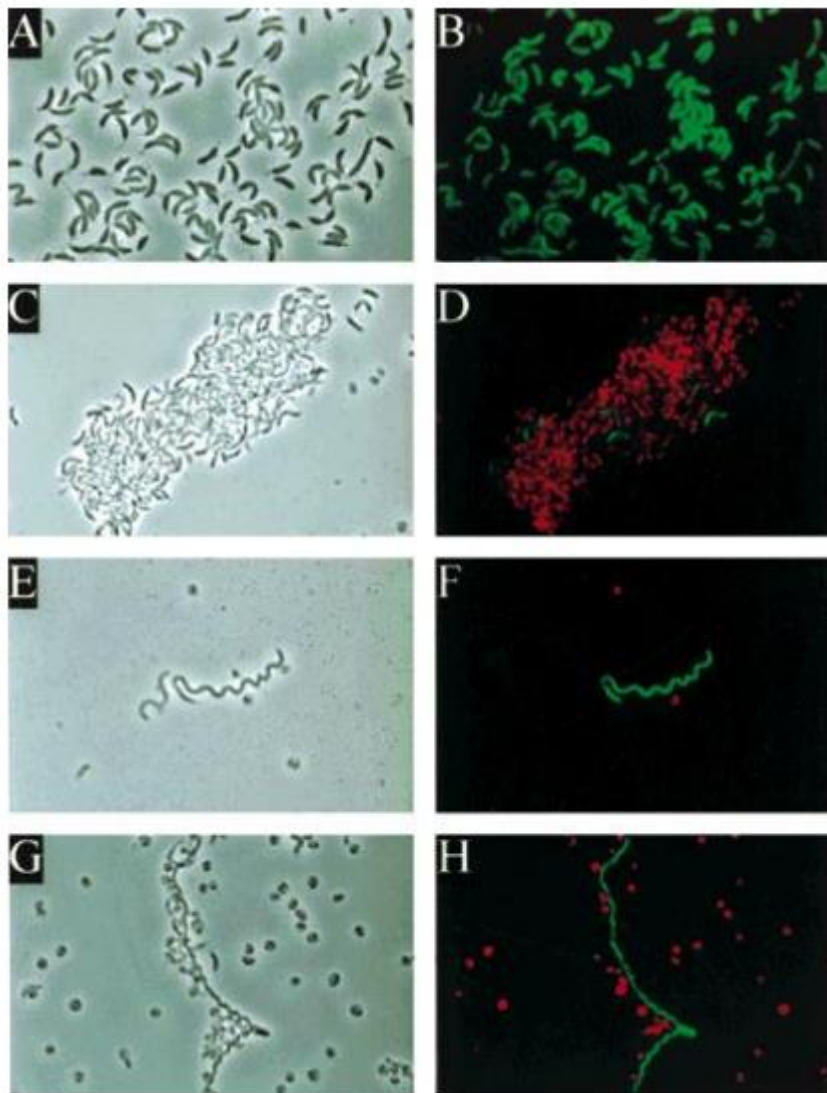
Para a célula poder utilizar o acetato ou outras fontes de carbono como ácidos graxos, em bactérias é necessária a ativação do ciclo do glioxilato. Neste ciclo, compostos de dois a três carbonos podem ser utilizados para a síntese de glicose (KORNBERG, 1957). Duas enzimas essenciais, isocitrato liase 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 ressuspensas 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 xilanasas, 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 (revisto 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 (revisto 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub>, 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 O<sub>2</sub>, podendo assim ser utilizado (revisto em HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

O complexo citocromo *c* oxidase (*cbb<sub>3</sub>*), que catalisa a redução de O<sub>2</sub> a água, é codificado pelo operon *ccoNOQP* e possui alta afinidade por O<sub>2</sub>, conseqüentemente é utilizado em condições de baixa concentração de O<sub>2</sub>. 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 *c<sub>2</sub>* 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 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 O<sub>2</sub>. Em baixas concentrações de O<sub>2</sub> FixK reprime os operons codificando a terminal oxidase *cytaa3* (CC3402-3407) e a terminal oxidase *cytbo3* (CC1767-1773) que possuem baixa afinidade a O<sub>2</sub>, 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 O<sub>2</sub>, 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

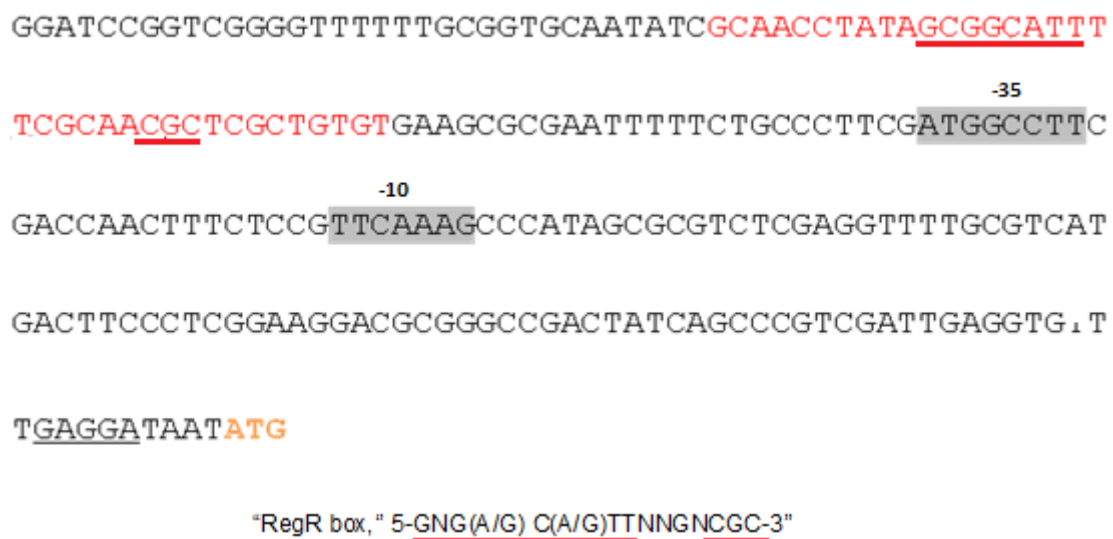
metabolismo fermentativo. Já em condições de crescimento aeróbio, ArcB é ativado por oxidação de seus sítios ativos redox (dois resíduos de cisteína) e desfosforila ArcA (IUCHI et al., 1990). Assim como a terminal oxidase *bd*, a falta do regulador de resposta ArcA provoca sensibilidade a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 O<sub>2</sub> 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 *cbb<sub>3</sub>* 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

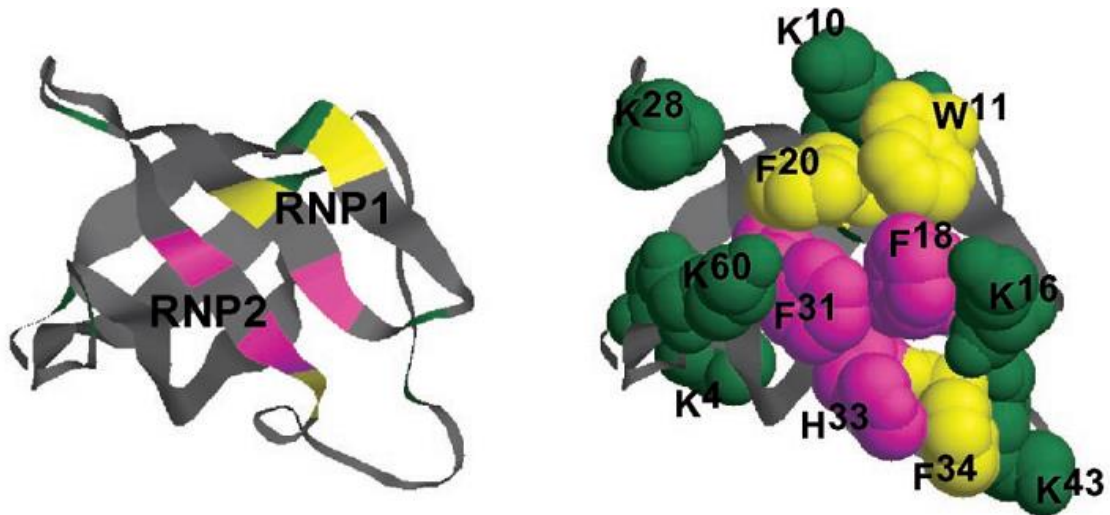
No choque frio ocorre uma mudança drástica na fisiologia da célula, provocando diminuição da fluidez da membrana devido à mudança de um arranjo desordenado para um ordenado das cadeias de ácidos graxos (DE MENDOZA et al., 1983; SINENSKY, 1974). Para retomar a fluidez da membrana, as bactérias aumentam 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 Alfabroteobactérias, 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  $\beta$ -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<sub>bs</sub> (SCHRÖDER et al., 1995) e essenciais para a atividade antiterminadora de transcrição CspE<sub>ec</sub> (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 Trp<sup>11</sup>, Phe<sup>18</sup>, e Phe<sup>20</sup> e o RNP2 Phe<sup>31</sup>, His<sup>33</sup>, e Phe<sup>34</sup> correspondem aos resíduos de CspE: Trp<sup>10</sup>, Phe<sup>17</sup>, Phe<sup>19</sup>, Phe<sup>30</sup>, His<sup>32</sup>, e Phe<sup>33</sup>, 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 CONCLUSÕES

- Nenhuma das construções testadas complementam totalmente os fenótipos de sensibilidade a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
- 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.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

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  $\sigma_T$  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  $\sigma_s$  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.

<sup>1</sup>De 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.

DERSCH, 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.; STAHELIN, 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.