

RICARDO RUIZ MAZZON

ESTUDO DE GENES DE *Caulobacter crescentus*  
IMPORTANTES PARA A SOBREVIVÊNCIA EM BAIXAS  
TEMPERATURAS

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.

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Profa. Dra. Marilis do Valle Marques

Versão corrigida.

Versão original encontra-se arquivada no serviço de comunicação do Instituto de Ciências Biomédicas

São Paulo  
2011

## RESUMO

MAZZON, R. 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.

A caracterização da resposta de *Caulobacter crescentus* a baixas temperaturas foi realizada. Esta bactéria mostrou ser um organismo psicrotolerante e de alta resistência ao congelamento, sendo esta última característica resultante de múltiplos fatores. *Caulobacter crescentus* possui quatro genes codificantes para CSPs, sendo *cspA* e *cspB* induzidos em baixas temperaturas e *cspB*, *cspC* e *cspD* em fase estacionária. A ausência de *cspA* e *cspB* ou *cspA* e *cspC* simultaneamente confere pronunciada deficiência de crescimento em baixas temperaturas. *cspA* e *cspB* não são autorregulados e são regulados pós-transcricionalmente por estabilização de seu mensageiro e traducionalmente durante o choque-frio. A expressão do gene *cspB* sofre influência de CspC em fase exponencial de crescimento e durante o choque-frio, e por CspC, SpdR e SpoT durante a fase estacionária. A ausência de CspC ou CspC e CspD simultaneamente compromete a adaptação à fase estacionária neste organismo promovendo inclusive alterações morfológicas. Nenhuma das CSPs de *C. crescentus* é capaz de complementar o fenótipo de *E. coli* BX04 por expressão heteróloga, embora todas apresentem atividade antiterminadora que, nestas proteínas, não depende dos mesmos resíduos de aminoácidos que CspE de *Escherichia coli*.

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

## ABSTRACT

MAZZON, R. R. **Study of *Caulobacter crescentus* genes important to low temperature survival.** 2011. 152 p. Ph. D. thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Characterization of *Caulobacter crescentus* cold response was performed. This bacterium is cold resistant as a psicrotolerant strain and showed remarkable freezing resistance, which may be a result of multiple traits. *C. crescentus* has four CSP encoding genes, being *cspA* and *cspB* cold-induced and *cspB*, *cspC* and *cspD* stationary phase-induced. The absence of both *cspA* and *cspB* or both *cspA* and *cspC* led to growth deficiency under low temperature incubation. *cspA* and *cspB* are not self-regulated and are post-transcriptionally regulated by mRNA stabilization and also translationally regulated during cold-shock. The *cspB* gene expression is affected by CspC at exponential growth phase and by CspC, SpdR and SpoT at stationary phase. The absence of CspC, or CspC and CspD simultaneously, affects stationary phase fitness of this organism, also promoting morphological alterations. None of the *C. crescentus*' CSPs were able to restore the phenotype of *E. coli* BX04 strain by heterologous expression. Although all of them have shown to be transcription antiterminators, this ability is not dependent on the same critical aminoacids displayed by CspE from *E. coli*.

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

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 *Caulobacter crescentus*

Desde a descoberta por Antoni van Leeuwenhoe em 1683, as bactérias se tornaram um excelente objeto de estudos científicos. Louis Pasteur e Robert Koch foram os primeiros cientistas a descrever o papel das bactérias como organismos causadores de doenças, sendo que os estudos envolvendo ecologia microbiana e biologia de bactérias não patogênicas foram relegados durante muitos anos.

A partir do sequenciamento dos genomas, foi possível a formação de uma visão global dos mecanismos regulatórios e suas interações, presentes nos organismos. Este grande volume de conhecimento gerado resulta da disponibilidade de metodologias de biologia molecular, principalmente as de abordagem em larga escala, unidas a informação gerada pelo sequenciamento dos genomas.

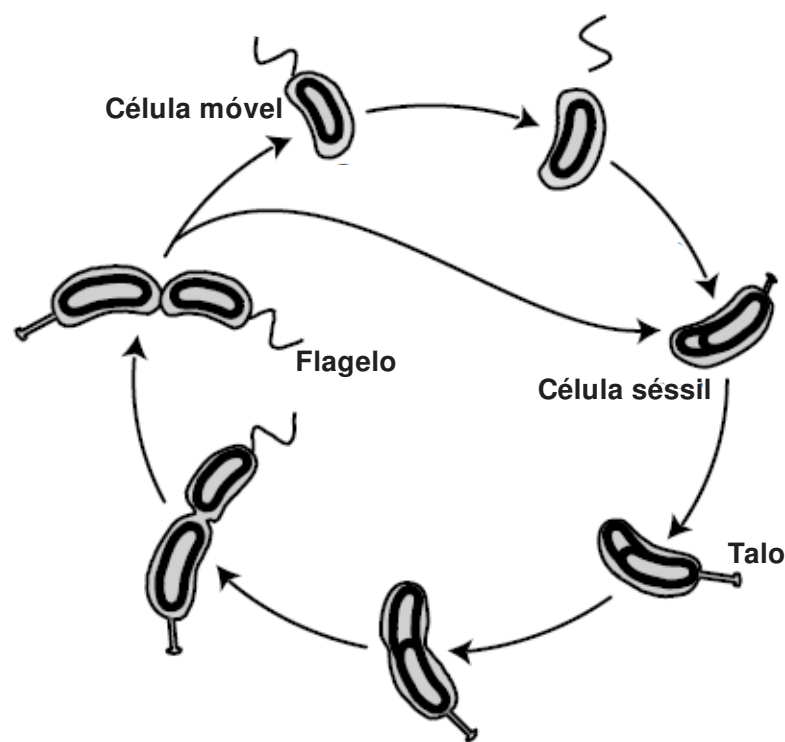
Muitos microrganismos como *B. subtilis*, *Streptomyces coelicolor* e *C. crescentus*, dentre outros, têm se mostrado importantes modelos experimentais tornando-se alvos de estudos aprofundados por apresentarem processos biológicos complexos, como a diferenciação celular, esporulação e formação de biofilmes, envolvendo diversos e interligados mecanismos de regulação gênica (FIGGE e GOBER, 2003).

Em geral, processos importantes como replicação do DNA seguido pela partição cromossomal, divisão celular e outros envolvidos no ciclo celular, apresentam um fino balanço regulatório e de organização espacial e temporal bem estabelecida. A bactéria *Caulobacter crescentus*, que teve seu genoma completamente sequenciado, apresenta um ciclo celular que culmina na formação de células morfológica e fisiologicamente distintas. Desta maneira, *C. crescentus* tem sido utilizada como um importante sistema-modelo para o estudo de mecanismos moleculares envolvidos na progressão do ciclo celular e formação da assimetria das células durante o processo (LAUB; SHAPIRO; MCADAMS, 2007; NIERMAN et al., 2001; SKERKER e LAUB; 2004).

*Caulobacter crescentus* é uma bactéria Gram-negativa não patogênica e de vida livre, oligotrófica e amplamente difundida entre ambientes aquáticos e muitos tipos de solo. Este gênero tem sido encontrado em corpos d'água que congelam completamente (ABYZOV et al., 2001; HOSOI-TANABE et al., 2010; POINDEXTER, 1981).

As células de *Caulobacter* apresentam-se predominantemente na forma planctônica móvel que contém um flagelo simples e diversos pili em um dos polos da célula; ou então na forma sésil, que se encontra associada aos substratos através de um talo, localizado no polo anteriormente ocupado pelo flagelo. Na extremidade deste talo existe um polissacarídeo adesivo chamada de *holdfast* (CURTIS e BRUN, 2010).

O ciclo celular mostra-se essencialmente como apresentado na figura 1. No decorrer do ciclo, células talo alongam o corpo celular tornando-se células pré-divisionais. Um flagelo é sintetizado no polo oposto ao do talo e, assim que a citocinese ocorre, os pili são então sintetizados. Portanto, ao final da divisão celular a célula pré-divisional dá origem a duas células morfologicamente distintas. Mais tarde, as células móveis irão se diferenciar em células talo e iniciar o ciclo celular novamente. Na diferenciação, o flagelo é ejetado para o meio extracelular, enquanto os pili são retraídos e o aparato quimiotático degradado. No mesmo polo onde se encontrava anteriormente o flagelo, um novo talo é sintetizado. As células móveis são incapazes de replicar seu DNA, estando em fase pré-sintética (G1), enquanto as células talo estão em fase de síntese (S). No estágio mais tardio da fase pré-divisional a célula se torna incapaz de replicar o DNA e, portanto, encontra-se em uma fase pós-sintética (G2). As células talo representam o estágio final da diferenciação celular, uma vez que a desdiferenciação de célula talo para célula móvel nunca foi observada (CURTIS e BRUN, 2010).



**Figura 1. Ciclo celular de *Caulobacter crescentus*.** No decorrer do ciclo celular a célula sésil que possui um talo, replica o DNA e no polo oposto sintetiza um flagelo. Esta célula alongada é chamada pré-divisional. Após a citocinese, duas células distintas morfológica e fisiologicamente são geradas. A célula talo é capaz de reiniciar o ciclo imediatamente replicando seu DNA. No momento da diferenciação da célula flagelada em célula talo, esta ejeta o flagelo e retrai os pili.  
FONTE: Modificado de Goley et al. (2007).

O ciclo celular culmina com a duplicação da célula e este processo inclui a replicação do DNA e a posterior separação dos cromossomos, estabelecimento do plano de divisão e a citocinese propriamente dita. Todos estes processos são coordenados por uma série de vias regulatórias de modo que alças de regulação ativam ou reprimem cada um dos processos, não permitindo a sua ocorrência fora do intervalo de tempo apropriado dentro do ciclo de diferenciação (CURTIS e BRUN, 2010). Muitos desses sistemas que direcionam e coordenam processos participantes do ciclo celular são realizados por sistemas de dois componentes (JENAL, 2000; LAUB; SHAPIRO; MCADAMS, 2007).

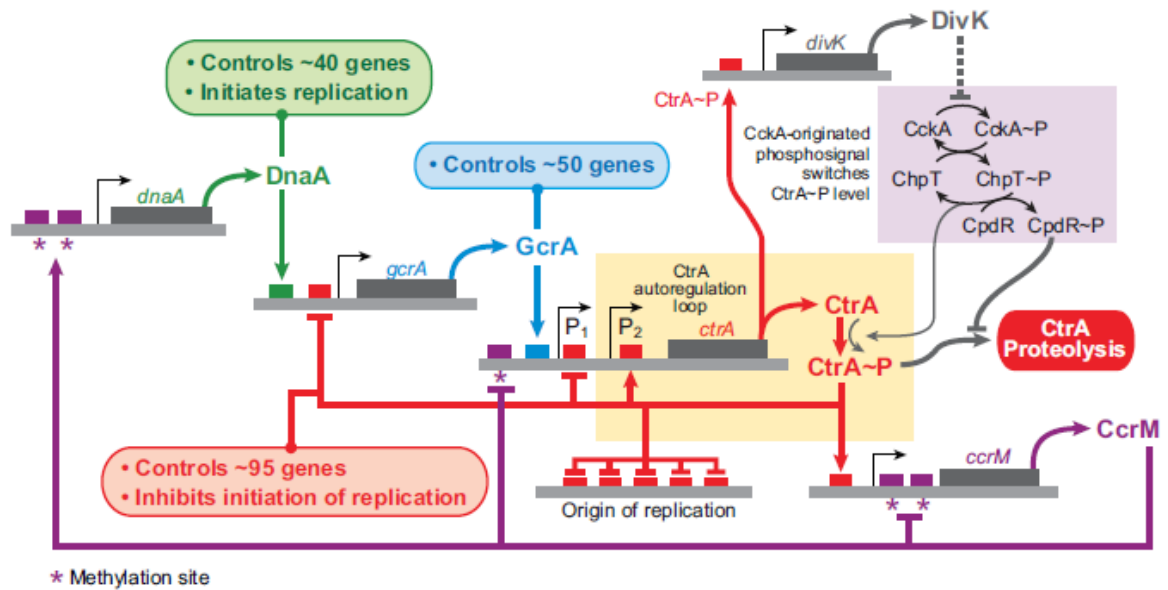
Em *Escherichia coli*, a replicação do DNA é realizada em ciclos concomitantes de modo a facilitar o rápido crescimento, o que não acontece em *C. crescentus* que regula o início da replicação de modo a haver apenas um ciclo de replicação cromossomal por evento de divisão celular (MARCZYNSKI, 1999).

O ciclo celular em *Caulobacter* possui um sistema central de regulação que depende de reguladores globais (Fig. 2A) como CtrA, GcrA, DnaA e CcrM que, agindo conjuntamente, controlam a expressão de mais de 200 genes (COLLIER; MURRAY; SHAPIRO, 2006; HOLTZENDORFF et al., 2004; HOTTES; SHAPIRO; MCADAMS, 2005; LAUB et al., 2002).

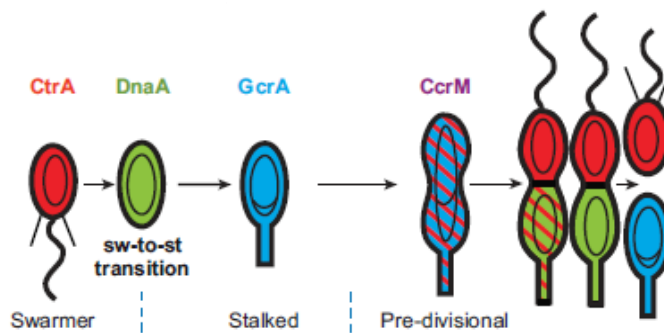
A arquitetura geral do sistema de regulação do ciclo celular inclui mecanismos epigenéticos de regulação, sensores e transdução de sinal que proporcionam regulação via alças de retroalimentação a fim de sincronizar o processo com a replicação do cromossomo e citocinese celular. A síntese dessas quatro proteínas, bem como a estabilidade de CrtA, GcrA e DnaA são ativamente controladas ao longo do ciclo (LAUB; SHAPIRO; MCADAMS, 2007).

CrtA, um dos quatro reguladores globais envolvidos no ciclo celular, é um regulador de resposta membro de um sistema de dois componentes. CtrA está presente nas células móveis (Fig. 2B), na qual permanece ligado à origem de replicação impedindo o início da replicação do cromossomo, além de reprimir a transcrição de *gcrA* (HOLTZENDORFF et al., 2004; QUON et al., 1998). CtrA em seu estado fosforilado foi descrito como regulando cerca de 50 operons com 95 genes no total. No momento da diferenciação celular da célula móvel para a célula talo, CtrA em seu estado ativo fosforilado é degradado por proteólise permitindo o início da replicação do cromossomo (INIESTA et al., 2006; LAUB et al., 2002; MCGRATH et al., 2006). Neste momento, DnaA recém-sintetizada, inicia o processo de replicação do DNA ao mesmo tempo em que ativa a transcrição de *gcrA* (COLLIER; MURRAY; SHAPIRO, 2006; GARNERONE et al., 1999). Durante a carência nutricional a degradação de DnaA é acelerada, retardando o processo de replicação do DNA e conseqüentemente o ciclo celular (GORBATYUK e MARCZYNSKI, 2005).

A



B



**Figura 2. Ilustração esquemática da regulação do ciclo celular em *C. crescentus*.** (A) Neste esquema estão representados os mecanismos regulatórios que envolvem os quatro principais reguladores globais que controlam as fases de diferenciação existentes durante o ciclo celular de *C. crescentus*. Estes mecanismos envolvem ativação transcricional, proteólise, controles epigenéticos e cascatas de fosforilação. (B) Neste esquema está representada a abundância de cada um dos quatro reguladores globais em diferentes estágios da diferenciação celular de *Caulobacter crescentus*.  
 FONTE: Laub et al. (2007).



GcrA ativa diretamente a transcrição de *ctrA* através de seu promotor P1. Assim que a forma fosforilada de CtrA começa a se acumular, o promotor P2 de *ctrA* é ativado por autoregulação positiva aumentando rapidamente os níveis de CtrA fosforilado e, então o promotor P1 é reprimido. Se esta alça de retroalimentação não for interrompida, os níveis de CtrA fosforilado permanecem altos (HOLTZENDORFF et al., 2004; REISENAUER; QUON; SHAPIRO, 1999).

A fosforilação de ChpT depende da transferência do grupamento fosfato de CckA. A fosforilação de CtrA é inibida quando esta transferência de fosfato de CckA para ChpT não ocorre, culminando com a depleção de CtrA fosforilado por proteólise e conseqüente início da replicação do DNA. A diferenciação de célula móvel para célula talo ocorre quando a transferência de fosfato da quinase CckA é eliminada, quando então CtrA para de ser fosforilada e as formas fosforiladas permanecem sendo degradadas. A replicação do cromossomo pode ser iniciada quando a forma fosforilada de CtrA é eliminada na célula talo (BIONDI et al., 2006; INIESTA et al., 2006; JACOBS et al., 1999; JUDD et al., 2005).

O controle epigenético via metilação do DNA pela metiltransferase CcrM é fundamental no controle regulatório de genes cuja expressão dependa do estado de metilação de seus promotores. A transcrição de *ccrM* é ativada por CtrA fosforilada. O promotor P1 de CtrA, responsável por sua síntese *de novo*, é ativado diretamente por GcrA apenas quando se encontra hemimetilado, após a passagem da forquilha de replicação pelo gene *ctrA*. Ao fim da replicação, CcrM é brevemente sintetizado metilando novamente o genoma, sendo então inativado (BERDIS et al., 1998; REISENAUER; QUON; SHAPIRO, 1999; REISENAUER e SHAPIRO, 2002; QUON; MARCZYNSKI; SHAPIRO, 1996).

Um elemento crítico na regulação do ciclo celular de *C. crescentus* é a ligação entre a expressão de *dnaA* e a replicação do cromossomo. O gene *dnaA* localiza-se perto da origem de replicação e seu promotor contém dois sítios de metilação. A síntese de DnaA é coordenada com sua funcionalidade por um mecanismo epigenético que depende da metilação de seu promotor (COLLIER; MCADAMS; SHAPIRO, 2007). A localização deste gene próximo à origem de replicação também controla as concentrações de DnaA na célula, uma vez que a transcrição deste gene é eficiente quando seu promotor está totalmente metilado imediatamente antes do início da replicação e ineficiente quando hemimetilado após a passagem da forquilha de replicação (LAUB; SHAPIRO; MCADAMS, 2007).

*Caulobacter crescentus* foi a primeira alfa-proteobactéria a ter o genoma completamente sequenciado, o que a tornou base para a exploração da biologia

desse grupo de bactérias. Seu genoma possui cerca de 4 Mb apresentando um conteúdo GC de 67% e um cromossomo único e circular, codificando 3.767 genes dentre os quais inúmeros genes possivelmente relacionados à resposta a estresses (NIERMAN et al., 2001). Dos 16 genes codificantes para fatores sigma, *rpoD*, *rpoN* e *rpoH* foram estudados por Brun e Shapiro (1992), Malakooti et al. (1995) e Wu e Newton (1997). Os demais fatores sigma são pertencentes à classe de sigmas de função extracitoplasmática (ECF), que tipicamente regulam genes em resposta à estímulos extracitoplasmáticos (NIERMAN et al., 2001). Dentre os 13 sigmas do tipo ECF foram caracterizados os fatores  $\sigma^E$  em resposta a estresse oxidativo gerado por cádmio, hidroperóxido orgânico, oxigênio singlete,  $\sigma^T$  e  $\sigma^U$  em resposta a estresses osmótico e oxidativo e  $\sigma^F$  em resposta a estresse oxidativo em fase estacionária (ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2007; ALVAREZ-MARTINEZ; BALDINI; GOMES, 2006; LOURENÇO e GOMES, 2009).

Há evidências de que a temperatura possa interferir com a progressão do ciclo celular. Susin et al. (2006) demonstraram que células de *C. crescentus* submetidas à choque térmico interrompem o ciclo celular permanecendo em fase pré-divisional.

O conhecimento a respeito da resposta ao choque frio em *Caulobacter* e sua influência no ciclo celular ainda precisam ser mais bem investigados. A resposta a esse estresse foi inicialmente estudada por Lang e Marques (2004) e recentemente novos estudos deste grupo de pesquisa encontram-se em andamento.

## **1.2 Respostas adaptativas à baixa temperatura**

Os organismos de vida livre tem que lidar constantemente com alterações ambientais e desafios à sua adaptabilidade, dentre os quais os mais comuns são limitação de nutrientes, as mudanças de osmolaridade e de temperatura. As respostas aos diversos estresses requerem um fino balanço na expressão de conjuntos de genes específicos (KLINKERT e NARBERHAUS, 2009).

Para que as células possam responder adequadamente a cada perturbação, é necessário que haja estruturas responsáveis pela detecção das mesmas. As estruturas envolvidas na percepção das alterações de temperatura são chamadas termosensoras (KLINKERT e NARBERHAUS, 2009). Mudanças de temperatura são sinais sentidos e processados pela maquinaria bioquímica da célula bacteriana de

modo a permitir a melhor adaptação e sobrevivência destes microrganismos (HURME e REHN, 1998).

A queda de temperatura é uma perturbação que causa problemas fisiológicos completamente diferentes dos demais estresses, sendo os principais obstáculos a redução da atividade enzimática da maquinaria celular, diminuição da fluidez de membrana e estabilização de estruturas secundárias que podem comprometer a tradução (ERMOLENKO e MAKHATADZE, 2002).

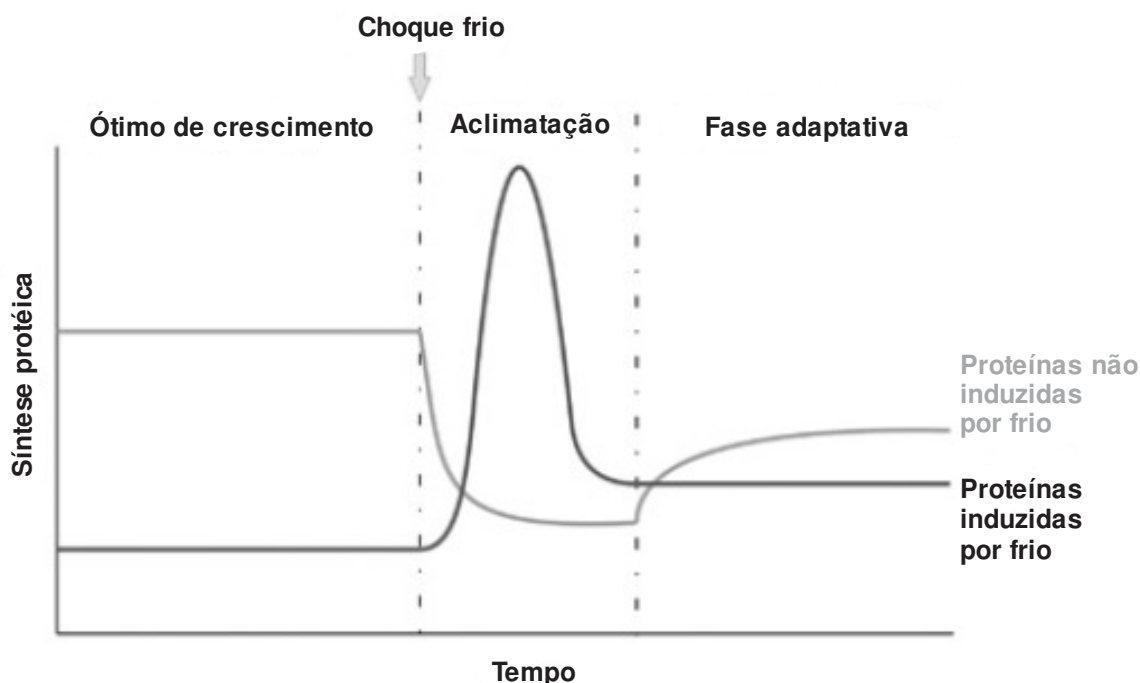
O choque frio afeta a fisiologia celular ao diminuir a fluidez de membrana, o que compromete funções associadas à esta estrutura como, por exemplo, transporte e secreção, ao retardar ou impedir o dobramento de algumas proteínas e ainda, ao provocar a estabilização de estruturas secundárias nos RNA e DNA, diminuindo a eficiência de processos vitais como a transcrição e tradução (SCHUMANN, 2009).

A temperatura é um dos parâmetros ambientais mais críticos, sendo capaz de determinar os limites fisiológicos para uma ampla gama de atividades microbianas e, a habilidade em lidar com este parâmetro é de vital importância para os organismos. A velocidade das reações químicas está diretamente relacionada com a temperatura do meio em que o organismo se encontra. Algumas espécies estão adaptadas a pequenos intervalos de temperatura de incubação, gerando classificações de acordo com esses intervalos, podendo ser essencialmente psicrófilas, mesófilas, termófilas ou hipertermófilas (NARBERHAUS; WALDMINGHAUS; CHOWDHURY, 2006).

Foram descritas duas formas distintas de resposta a baixas temperaturas, que foram denominadas *Low Temperature Response* (LTR) e *Cold Shock Response* (CSR). A LTR trata-se de uma resposta a temperaturas absolutas, com expressão dos genes em altos níveis pelo tempo em que durar o estresse (SCHUMANN, 2009). Encontram-se nessa classe de respostas genes relacionados à síntese e funcionalidade de membrana e genes envolvidos no metabolismo celular, dentre outros (PHADTARE e INOUYE, 2004). A CSR, por sua vez, trata-se de uma resposta à rápida queda de temperatura que independe de um valor absoluto de temperatura, mas que é proporcional a diferença entre a temperatura ótima e a temperatura do estresse. A resposta CSR é desativada por alças de retroalimentação negativas, que ocorrem quando a células se tornam adaptadas à situação de estresse. Os mais relevantes grupos de genes regulados via CSR são chaperonas e helicases de RNA e proteínas associadas ao nucleóide (PHADTARE, 2004; PHADTARE e INOUYE, 2004).

A queda brusca de temperatura vivenciada na resposta CSR causa parada transitória no crescimento celular de muitas espécies. Um exemplo disso acontece quando células de *E. coli* são transferidas de 37 °C para 15 °C, causando parada no crescimento e repressão da síntese de diversas proteínas. Cerca de 2 horas após o choque frio as células retomam a tradução das proteínas e, durante a fase de aclimação, a síntese de cerca de 15 peptídeos encontra-se bastante aumentada. Estas proteínas foram chamadas de proteínas de choque frio codificadas por genes de choque frio (WEBER e MARAHIEL, 2003).

Na resposta a incubação em baixas temperaturas em *E. coli* foram definidas três fases nas quais os processos metabólicos e de síntese proteica diferem (Fig. 3). Culturas advindas da temperatura ótima de crescimento são submetidas a queda brusca de temperatura. Esta etapa é chamada de choque frio e compreende o exato momento da mudança brusca de temperatura. Após o choque frio, as culturas entram em uma fase de reposta chamada aclimação. Durante este estágio as proteínas induzidas pelo choque frio são fortemente expressas, enquanto as demais proteínas sofrem, em geral, uma forte e transitória repressão. Após a fase de aclimação, as células entram na chamada fase adaptativa, na qual a célula torna-se adaptada à nova situação reprimindo a expressão dos genes de choque frio (total ou parcialmente) e retomando a síntese das demais proteínas, agora a uma taxa inferior a da apresentada em temperatura ótima, também com velocidade de crescimento reduzida (HORN et al., 2007).



**Figura 3. Esquema representativo do perfil de expressão de proteínas influenciado pelo choque frio em *Escherichia coli*.** Culturas advindas de incubação a temperatura ótima de crescimento, ao serem submetidas a uma mudança brusca de temperatura de incubação alteram seu perfil de expressão de proteínas. No momento da queda de temperatura, chamada de choque-frio a síntese proteica é drasticamente reduzida. A partir de então, começam a ser sintetizadas proteínas que são responsáveis pela adaptação de toda a maquinaria metabólica à nova situação. Esta fase chamada de aclimação é seguida por uma fase denominada fase adaptativa, na qual a síntese das proteínas induzidas em baixa temperatura é levemente reduzida e a síntese global de proteínas novamente elevada, atingindo um novo patamar de expressão.  
FONTE: Modificado de Horn et al. (2007).

### 1.2.1 Grau de enovelamento do DNA

O grau de enovelamento do DNA é um dos muitos parâmetros afetados pela alteração de temperatura. O DNA de todas as bactérias mesofílicas é negativamente superenovelado. O choque térmico produz o desenovelamento de plasmídeos em *E. coli* e *B. subtilis*, processo mediado por uma girase e topoisomerase I. O estado superenovelado, no entanto, é restaurado após 10 minutos da ocorrência do choque térmico, graças a ação de uma girase em colaboração com a proteína associada ao

nucleóide HU e a chaperona DnaK (KATAOKA et al., 1996; LOPEZ-GARCIA e FORTERRE, 2000).

A topologia do nucleóide durante o choque frio não tem sido tão extensivamente estudado quanto durante o choque térmico. O relaxamento de plasmídeos ocorre de maneira transitória durante o choque frio, sendo que o estado superenovelado também é restaurado pela ação conjunta de uma DNA girase e a proteína HU. Os dados obtidos até o momento indicam que a topologia do DNA em bactérias mesofílicas e termofílicas age como um sensor de estresse para choques por calor ou frio (KATAOKA et al., 1996; MIZUSHIMA et al., 1997).

Mudanças estruturais em posições específicas do DNA já foram descritas como envolvidas na regulação de genes em resposta à mudanças de temperatura. A presença de regiões ricas em AT e com curvatura do DNA influenciam a afinidade da RNA polimerase pelos promotores. Além dessa curvatura controlando o acesso da RNA polimerase aos promotores, outras conformações do DNA também podem impedir a transcrição indiretamente pela ligação de proteínas chamadas silenciadoras, que modulam a estruturação das alças de DNA (KATAYAMA et al., 2001; NICKERSON e ACHBERBER, 1995; PROSSEDA et al., 2004; TUPPER et al., 1994).

Um exemplo desses silenciadores é a proteína associada ao nucleóide H-NS, de 136 aminoácidos. Em Enterobactérias esta proteína afeta a expressão de uma ampla gama de genes não relacionados funcionalmente, desde genes *housekeeping* até mesmo genes de virulência. Ela possui preferência de ligação por regiões ricas em AT e sua afinidade por essas sequências varia fortemente de acordo com a temperatura. H-NS sofre indução após o choque-frio e, controla cerca de 69% dos genes de resposta a baixas temperaturas em *E. coli*, além de ser um regulador comum de genes envolvidos na captação de ferro, resposta a estresses gerais e formação de biofilme (ATLUNG e INGMER, 1997; FALCONI et al., 1998; WHITE-ZIEGLER e DAVIS, 2009).

Recentemente foram descobertos novos mecanismos de regulação de genes dependentes de baixa temperatura através da ação de pequenos RNAs. Neste sistema, um pequeno RNA de menos de 90 bases de comprimento chamado DsrA regula a tradução de dois reguladores transcricionais globais, H-NS e RpoS. Este pequeno RNA inibe a tradução de H-NS, além de diminuir a meia vida de seu mensageiro e também estimular a tradução de RpoS (LEASE E BELFORT, 2000; WASSARMAN, 2002). É possível que pequenos RNAs estejam envolvidos na

regulação de outras proteínas induzidas em baixas temperaturas, como por exemplo, as CSPs.

### 1.2.2 Estruturas secundárias nos RNAs

Muitas moléculas de RNA passam por rápidas reestruturações essenciais para seu normal funcionamento. Estas estruturas podem ser necessárias e resultantes de pareamento intramolecular ou com outros RNAs, ou ainda, ser resultado de estruturações indesejadas que comprometem a funcionalidade da molécula necessitando serem corrigidas. A manutenção destes rearranjos em baixas temperaturas em velocidades compatíveis com as necessidades celulares mostra-se um dos maiores desafios para a adaptabilidade das células nesta condição. Em baixas temperaturas, é energeticamente favorável que estruturas que antes eram resultantes de pareamentos de poucas bases tornem-se longos grampos de estrutura secundária. Desta maneira, estruturas pouco estáveis a temperatura ambiente tornam-se extremamente estáveis em baixas temperaturas, dificultando a degradação dos mensageiros e aumentando suas meia-vidas. Esses rearranjos das estruturas dos RNAs são realizados por proteínas especializadas como helicases e principalmente chaperonas de RNA (KONKEL e TYLLY, 2000; SCHUMANN, 2009).

Uma estratégia necessária na adaptação ao frio é a degradação de mRNAs estruturados. O decaimento de muitos mRNAs é iniciado primeiramente por clivagem endonucleotídica mediada por RNase E ou RNase III (APIRION, 1973; EHRESTSMANN; CARPOUSIS; KRISCH, 1992). Esta clivagem é seguida por degradação exonucleotídica na extremidade 3' do transcrito. Duas são as enzimas envolvidas no processo: a Polinucleotídeo fosforilase (PNPase) e a RNase II. Geralmente, a degradação ocorre na extremidade 5' em direção a extremidade 3', o que é surpreendente, porque os procariotos não possuem ribonucleases que atuem nesse sentido. Esse direcionamento na degradação dos mensageiros pode ser devido à especificidade da RNase E, que aparentemente requer uma extremidade 5' livre para proceder com a primeira clivagem endonucleotídica. O fragmento liberado a montante é clivado por exoribonucleases e o RNA remanescente com uma nova extremidade 5' é novamente clivado por outra RNase E. Estas clivagens endonucleotídicas processivas seguidas por clivagem exonucleotídica da extremidade 3' para 5' explicam a polarização do processo de degradação como um todo ocorrendo de 5' para 3', e as observações de que estruturas localizadas nas regiões 5' estabilizam o mensageiro corroboram essa hipótese. Também já foi

demonstrado que as estruturas secundárias na extremidade 3' impedem a ação de exoribonucleases (GRUNBERG-MANAGO, 1999).

As enzimas descritas como envolvidas na degradação de mRNA em *E. coli*, com exceção das RNase II e III, estão localizadas em complexos proteicos (GRUNBERG-MANAGO, 1999; MICZAK; SRIVASTAVA; APIRION, 1991). A principal estrutura envolvida na degradação de RNAs estruturados em *E. coli* foi chamada de degradossomo e é composta de uma RNase E, uma PNPase, uma helicase de RNA da família DEAD/DEAH dependente de ATP (normalmente RhlB) e uma enzima glicolítica, a enolase. Algumas proteínas como GroEL e DnaK também já foram descritas como associadas ao complexo (CARPOUSIS, 2007; MICZAK et al., 1996).

*Escherichia coli* possui cinco genes codificantes para helicases de RNA desta família anotados em seu genoma que foram chamadas de SrmB, CsdA (eventualmente referida como DeaD), DbpA, RhlB e RhlE e que possuem atividade de RNA helicase dependente de ATP (IOST E DREYFUS, 2006). Membros desta família já foram descritos como envolvidos em degradação de mRNA e montagem de ribossomos (AWANO et al., 2007; IOST E DREYFUS, 1994; JAIN, 2008; PEIL; VIRUMÄE; REMME, 2008; PRUD'HOMME-GENEREUX et al., 2004; PY et al., 1996). Dentre as cinco helicases nenhuma se mostrou essencial a 37 °C, porém, mutantes de CsdA e SrmB apresentam fenótipo de sensibilidade a baixas temperaturas, sendo que CsdA é induzida após o choque frio (JONES et al., 1996).

Há evidências de que o degradossomo de RNA seja modificado durante o choque-frio. Neste caso, a helicase CsdA, que é induzida em baixas temperaturas, se associaria ao degradossomo substituindo RhlB. Sabe-se, no entanto, que a região de interação de CsdA e RhlB com a RNase E não é a mesma e, que *in vitro*, à região a qual se associa CsdA também se associam RhlE e SrmB de maneira não seletiva, sugerindo que também RhlE e SrmB, além, de CsdA, possam substituir RhlB (KHEMICI et al., 2004; LIOU et al., 2002; PRUD'HOMME-GENEREUX et al., 2004; PY et al., 1996).

### 1.2.3 Fluidez de membrana

O envelope celular é o primeiro compartimento celular a entrar em contato com agentes estressantes do meio externo. A queda de temperatura e também o choque por calor alteram as propriedades físicas das membranas de maneira drástica. Estas alterações têm que ser compensadas rapidamente de modo a garantir a integridade da membrana e a manutenção de suas funcionalidades



(GUSCHINA e HARWOOD, 2006). Sendo assim, as membranas também são consideradas termosensores de adaptação, capazes de transduzir o sinal via proteínas integrais de membrana. Proteínas sensoras histidina quinases aparentemente constituem os candidatos mais prováveis na sequência da cadeia de transdução do sinal.

Segundo Mansilla et al. (2004) o controle da homeostase da membrana lipídica após alterações de temperatura está relacionada a atividade de proteínas sensoras histidina quinases. Com a queda de temperatura, a fluidez da membrana é mantida às custas do aumento da proporção de ácidos graxos insaturados nas membranas, resultado da síntese *de novo* de ácidos graxos insaturados direcionados à membrana e da ação de desaturases que introduzem ligações duplas em ácidos graxos pré-existentes na membrana. Outras estratégias seriam a alteração dos tipos de ácidos graxos e conteúdo proteico da membrana, além dos tipos de carotenoides sintetizados, posição e tamanho da cadeia lateral e proporção de ácido graxos cíclicos (CHINTALAPATI; KIRAN; SHIVAJI, 2004). Esta estratégia de adaptação é comumente chamada de adaptação homeoviscosa (SINENSKY, 1974). Em *B. subtilis*, o sistema de dois componentes DesKR regula a expressão do gene *des* que codifica uma desaturase específica deste tipo (AGUILAR et al., 2001). DesK, uma proteína sensora quinase, possui quatro domínios transmembrana e uma longa porção C-terminal com o domínio catalítico no citoplasma. A atividade do domínio quinase isolado não é dependente de temperatura, o que sugere que a porção embebida na membrana contenha algum elemento termosensor (ALBANESI; MANSILLA; MENDOZA, 2004; HUNGER; BECKERING, MARAHIEL, 2004).

#### 1.2.4 Eficiência traducional

VanBongelen e Neidhardt (1990) propuseram que os ribossomos pudessem atuar como termosensores na adaptação às baixas temperaturas. Em culturas de *E. coli* a queda de temperatura de 37 °C para 15 °C reduz drasticamente a quantidade de polissomos, concomitantemente com o aumento dos monossomos e partículas 70S, 50S e 30S. Isto sugere que o passo de iniciação de tradução é fortemente afetado com a queda de temperatura (WEBER e MARAHIEL, 2003). De fato, muitos estudos de proteômica com extratos de proteínas de culturas incubadas em baixas temperaturas revelam a indução de fatores traducionais ou de componentes que se associam aos ribossomos facilitando sua atividade ou biogênese nesta condição

(DAMMEL e NOLLER, 1995; JONES et al., 1996; JONES e INOUE, 1996; JONES; VANBONGELEN; NEIDHARDT, 1987).

Após a entrada em fase estacionária e choque frio, a tradução deve ser redirecionada a mensageiros de resposta a estas situações, impedindo-se então a tradução de mRNAs não específicos e reaproveitando os ribossomos, a fim otimizar os gastos energéticos. Em *E. coli* o bloqueio da tradução em ambas as situações ocorre pela ocupação dos sítios A e P pela proteína Y impedindo o posicionamento de tRNAs e mRNA no ribossomo, a associação dos fatores IF1 e IF3 e dissociação do ribossomo 70S em suas subunidades. Esta proteína possui afinidade pelo ribossomo mediada por temperatura, sendo esta menor que a apresentada por tRNA e fatores de iniciação (WILSON e NIERHAUS, 2005).

Em Giuliodori et al. (2004) foi descrito que o aparato traducional de *E. coli* traduz preferencialmente mRNAs de choque frio e em menor escala mRNAs tolerantes, cuja tradução eventualmente torna-se inibida. A preferência por tradução de mRNAs de choque frio e tolerantes é amplificada nas duas primeiras horas de exposição das células ao frio. Após o choque frio ocorre um grande desbalanço entre os níveis de fatores de iniciação e ribossomos, com níveis bastante aumentados de IF3, aparentemente o principal responsável pela grande seletividade traducional de mRNAs de choque frio e em menor escala também dos mRNAs tolerantes.

Outro fator de grande relevância para a maior eficiência da tradução de mensageiros de proteínas de choque frio diz respeito a própria estrutura secundária de seus mRNAs. Durante o choque frio, a estabilização de estruturas secundárias nos mensageiros pode deixar indisponível para os ribossomos estruturas *in cis* de regulação muito importantes, como as sequências Shine-Dalgarno. Contudo, a mudança estrutural nos mensageiros das CSPs, diferentemente dos mensageiros de proteínas não induzidas nessa condição, torna a região Shine-Dalgarno mais acessível aos ribossomos (BREAKER, 2010; GIULIODORI et al., 2010).

#### 1.2.5 Sobrevivência a congelamento

Há evidências de que o congelamento seja danoso para a maioria das células uma vez que pode provocar sérias lesões nas membranas e desnaturação do DNA e proteínas (ALUR e GRECZ, 1975). Isto ocorre porque quando a água do meio externo cristaliza antes do conteúdo celular, cria-se um fluxo osmótico de dentro para fora da célula, aumentando a concentração de soluto intracelular (FRANKS,

1995). Uma possível resposta adaptativa seria a produção de osmoprotetores como aminoácidos, betaínas, derivados de amina e ureia que são capazes de aumentar a pressão osmótica interna sem afetar proteínas de funções celulares vitais (HEERMANN e JUNG, 2004). Em *E. coli*, a superexpressão de DnaK/DnaJ e GroEL causa aumento na criotolerância, muito provavelmente pela ação desses chaperonas, que possivelmente protegem os polipeptídeos de se desnaturarem durante o congelamento (CHOW e TUNG, 1998).

O congelamento em geral diminui bastante a viabilidade das células. Há evidências de que o tamanho da célula e a permeabilidade à água sejam fatores determinantes para a viabilidade celular após o congelamento e que baixas taxas de resfriamento ou taxas de resfriamento muito altas sejam menos danosas a células. Acredita-se que a morte celular ocorra por causa de danos letais à membrana ocasionados pelo congelamento da água durante seu transporte através da mesma (DUMONT; MARECHAL; GERVAIS, 2003). Há várias maneiras dos microrganismos sobreviverem a temperaturas de congelamento. Uma delas é controlar a temperatura e o formato dos cristais de gelo que se formam em seu interior, e outra maneira é se tornar tolerante (YOKOIGAWA; MURAKAMI; KAWAI, 1995).

Tem-se percebido que algumas bactérias são capazes de desenvolver adaptações a perturbações quando são expostas a níveis moderados destas e adquirem maior tolerância quando expostas a níveis extremos das mesmas (KIM et al., 1998). Antes da queda do ótimo de temperatura para temperaturas abaixo de zero, quando incubadas em temperaturas baixas não congelantes, algumas populações de células bacterianas desenvolvem uma maior habilidade de sobrevivência e crescimento, que é denominado criotolerância. A amplitude desta adaptação está diretamente relacionada com o tempo e temperatura de pré-incubação e com a concentração inicial de células (THAMMAVONGS et al., 1996). Há dados que indicam que o choque frio tem um efeito significativo na criotolerância das células congeladas por curtos períodos, porém menores efeitos em congelamento por longos períodos (KIM et al., 1998).

Uma adaptação conhecida em *E. coli* é a síntese de trealose induzida por frio, o que aumenta significativamente a viabilidade das células a baixas temperaturas e isto parece protegê-las dos efeitos do congelamento além de outras possíveis condições letais como altas temperaturas, radicais livres e alta osmolaridade (ISRAELI; SHAFFER; LIGHTHART, 1993). Apesar de não se conhecer o exato mecanismo pelo qual a trealose confere a tolerância ao frio, presume-se que envolva a estabilização de algumas proteínas celulares e/ou membranas lipídicas (LESLIE

et al., 1994). Quando trealose é adicionada ao meio de cultura de bactérias e leveduras, esta confere um aumento da viabilidade das células durante o processo de congelamento e descongelamento (DINIZ-MENDES et al., 1999). Além da trealose, o glicerol também é um importante crioprotetor procariótico que atua mantendo a atividade de algumas enzimas *in vivo* (CSONKA, 1989).

Há também algumas bactérias que produzem proteínas anticongelantes (AFPs) que se ligam aos cristais de gelo, impedindo seu crescimento. Acredita-se que estas proteínas sejam secretadas para fora das células, e a atividade de algumas destas proteínas depende de sua interação com  $\text{Ca}^{2+}$  (GILBERT; DAVIES; LAYBOURN-PARRY, 2005).

### **1.3 Proteínas de choque-frio (CSP)**

A mais característica e amplamente estudada resposta bacteriana às baixas temperaturas é a indução de pequenas proteínas de baixo peso molecular chamadas *Cold Shock Proteins* (CSPs) (WEBER e MARAHIEL, 2003). Estas pequenas proteínas de peso molecular em torno de 7 kDa possuem um domínio conservado e bastante característico chamado *Cold Shock Domain* (CSD). Este domínio foi descrito como envolvido na ligação a ácidos nucleicos (HORN et al., 2007).

Genes codificando para proteínas de choque frio são encontrados em bactérias psicrófilas, mesófilas, termófilas e hipertermófilas e, normalmente são encontrados em múltiplas cópias de número variáveis em cada genoma (WEBER et al., 2002; WEBER e MARAHIEL, 2003; YAMANAKA; FANG; INOUE, 1998).

Estas proteínas são constituídas de cinco folhas beta dispostas antiparalelamente formando um barril beta. A interação das proteínas com ácidos nucleicos é realizada pelos motivos relativamente bem conservados RNP1 e RNP2 que apresentam pequenas variações dentre as CSPs. Na estrutura tridimensional das CSPs, os resíduos de aminoácidos básicos e aromáticos destes motivos formam uma superfície de ligação a ácidos nucleicos que podem reconhecer diferentes sequências (ERMOLENKO e MAKHATADZE, 2002; LANDSMAN, 1992; SCHRODER et al., 1995).

As mais bem estudadas CSPs são pertencentes às bactérias mesofílicas *Escherichia coli* e *Bacillus subtilis*. Em *E. coli* há nove genes codificando parálogos desta família chamados de CspA a CspI. Dentre eles, CspC é expresso constitutivamente, CspD é induzido em carência nutricional e na entrada da fase estacionária, enquanto CspA, CspB, CspE, CspG e CspI são induzidos após o

choque-frio (NAKASHIMA et al., 1996; WANG; YAMANAKA; INOUE, 1999; YAMANAKA e INOUE, 1997). Em *B. subtilis* foram identificados três parálogos desta família nomeadas CspB a CspD. As três CSPs de *Bacillus* são induzidas após o choque-frio, enquanto CspB e CspC também sofrem aumento de expressão após a entrada em fase estacionária. Também em *Caulobacter crescentus* o estudo das CSPs tem sido feito mais aprofundadamente. Esta bactéria possui em seu genoma quatro genes codificantes para proteínas desta família, nomeados CspA a CspD, sendo CspA e CspB induzidas em baixas temperaturas, enquanto CspC e CspD em fase estacionária (LANG e MARQUES, 2004). Enquanto as CSPs, normalmente, apresentam um domínio CSD e encontram-se monoméricas *in vivo*, com exceção de CspD de *E. coli* que se apresenta na forma dimérica, algumas CSPs de  $\alpha$ -proteobactérias possuem dois domínio CSD (BALHESTEROS et al., 2010; LANG e MARQUES, 2004; WEBER e MARAHIEL, 2002; WOLFFE et al., 1992).

O primeiro indício de que as CSPs pudessem regular transcricionalmente genes em resposta ao choque frio foi obtido por Derch et al. (1994) e Atlung e Ingmer (1997). Nestes trabalhos foi demonstrado que H-NS se liga preferencialmente a dsDNA e está associada a regulação Da resposta ao choque-frio. A hipótese de envolvimento das CSPs na regulação transcricional estaria apoiada na homologia destas proteínas com proteínas Y-box que conhecidamente atuam em nível transcricional (KARLSON e IMAI, 2003; MATSUMOTO e WOLFFE, 1998). O gene *hns* é fortemente induzido em baixas temperaturas, aumentando os níveis de H-NS em cerca de 4 vezes. CspA, a principal CSP de resposta à baixas temperaturas em *E. coli*, reconhece uma porção da região promotora de *hns* agindo como ativador transcricional (HORN et al., 2007; LA TEANA et al., 1991).

Em Bae et al. (2000) foi observado que a adição de CspA, CspE ou ainda, CspC de *E. coli* diminuem a terminação transcricional *in vitro* em diversos terminadores, além de diminuir os tempos de pausa de transcrição. Além disso, a superexpressão *in vivo* de CspE e CspC a 37 °C, mostrou-se capaz de induzir a transcrição de genes propostos como regulados por atenuação de transcrição. Portanto, as CSPs podem agir como antiterminadores de transcrição, e desfazer estruturas em RNAs nascentes que poderiam constituir terminadores intrínsecos ou alças terminadoras atenuadoras de transcrição.

A capacidade de desestabilização de estruturas secundárias por CspE foi descrita como sendo essencial para a atividade antiterminadora desta proteína e para a adaptação das células às baixas temperaturas. Ainda, a capacidade de desestabilização de estruturas secundárias e a atividade antiterminadora de CspE,

mas não sua habilidade de ligar-se a RNA mostram-se dependentes dos aminoácidos Phe17 do RNP1 e Phe30 e His32 do RNP2 (PHADTARE et al., 2002; PHADTARE; INOUE; SEVERINOV, 2002). Ainda, através da metodologia SELEX foi possível determinar a sequência preferencial de ligação de CspB – UUUUU, CspC – AGGGAGGGA e CspE – AAAUUU (PHADTARE e INOUE, 1999).

A maioria dos promotores de *E. coli* são constituídos de sequências consenso -10/-35 que possui elementos de cerca de 6 pares de bases posicionados cerca de 10 e 35 nucleotídeos a montante do início de transcrição. Estes elementos são reconhecidos pelo fator  $\sigma^{70}$  presente na holoenzima RNA polimerase, possibilitando a formação do complexo e iniciação da transcrição (GROSS et al., 1998). Em alguns promotores a ausência de um consenso na sequência do elemento -35 pode ser compensada por uma extensão na região -10 (KUMAR et al., 1993).

O promotor do gene *cspA* de *Escherichia coli* possui um motivo TGn constituindo um região -10 estendida que é essencial para os máximos níveis de expressão deste gene que, no entanto, tem pouca ou nenhuma importância na indução deste gene durante a queda de temperatura (PHADTARE e SEVERINOV, 2005). Ainda, a transcrição de *cspA* independe da temperatura de incubação e é fortemente dependente de uma região de alto conteúdo AT localizada à montante do elemento -35 do promotor deste gene, supostamente reconhecida pela subunidade  $\alpha$  da RNA polimerase de *E. coli* (MITTA; FANG; INOUE, 1997). Entretanto, o maior componente da indução de *cspA* durante a incubação em baixas temperaturas independe de transcrição *de novo*, mas sim da estabilização dos mRNAs presentes na célula via estruturação de sua incomum e extensa região 5' não traduzida (BAE; JONES; INOUE, 1997; JIANG; FANG; INOUE, 1996; YAMANAKA; MITTA; INOUE, 1999).

CspA de *E. coli* é expressa durante a fase exponencial de crescimento e sua expressão diminui consideravelmente em nível transcricional com a entrada em fase estacionária pela ação de H-NS. Durante o crescimento a 37 °C CspA regula negativamente sua própria expressão ao estimular a síntese de H-NS (BRANDI et al., 1999).

Nem todas as CSPs têm sua expressão diminuída em fase estacionária. Há inúmeros exemplos de genes codificantes de proteínas contendo domínios de choque-frio que são induzidas após a entrada em fase estacionária, como é o caso de CspD de *E. coli*, CspB e CspC de *B. subtilis* e CspC e CspD de *Caulobacter crescentus*, dentre outros inúmeros exemplos (GRAUMANN e MARAHIEL, 1990; KIM et al., 2007; LANG e MARQUES, 2004; YAMANAKA et al., 2001).

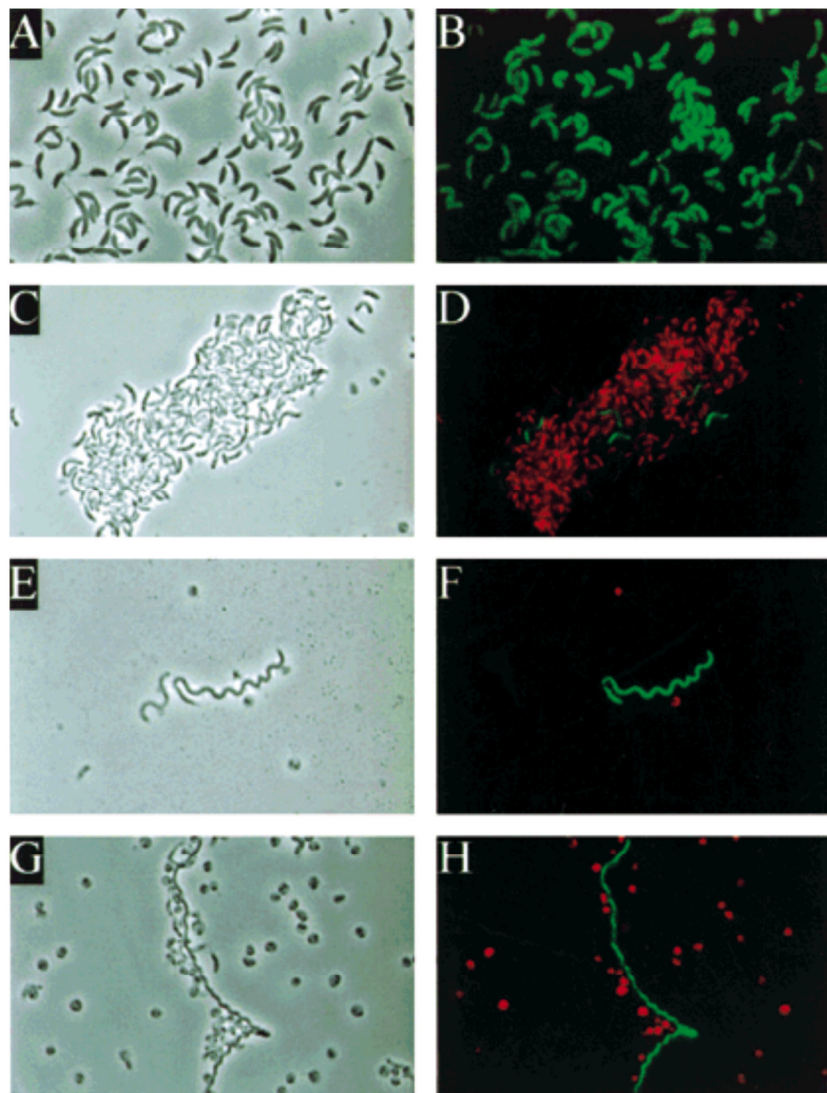
O crescimento e multiplicação bacterianos poderiam continuar ilimitadamente se não existissem condições ambientais restritivas. A depleção dos nutrientes do meio e o acúmulo de metabólitos tóxicos são os mais importantes fatores de determinam a parada de reprodução e crescimento, fazendo-as entrar na chamada fase estacionária. Durante a adaptação a esta nova condição há um desbalanço entre a síntese de várias macromoléculas, uma vez que a diminuição da expressão destas não ocorre de maneira sincronizada. Nesta fase as células não se dividem nem replicam seu cromossomo (NYSTRÖM, 2004a).

Os genes mais expressos durante a adaptação à fase estacionária são os candidatos mais prováveis a serem responsáveis pela adaptação à carência nutricional e, alguns destes genes codificam proteínas que possuem atividade específica de resposta a estresses. Conseqüentemente células em fase estacionária costumam possuir maior resistência a estresses secundários. (DUKAN e NYSTRÖM, 1999; JENKINS; SCHULTZ; MATIN, 1988; MATIN, 1991; REEVE; AMY; MATIN, 1984). Algumas bactérias ainda sofrem mudanças morfológicas mais drásticas que apenas a miniaturização da células, como é o caso de *Caulobacter crescentus*. Nesta bactéria, a resistência aos diversos estresses é acompanhada pela alongação (cerca de 30 vezes o tamanho das células em fase exponencial de crescimento) das células e aquisição de morfologia helicoidal (Fig. 4) durante a fase estacionária tardia (WORTINGER; QUARDOKUS; BRUN, 1998).

Em um trabalho de Lange e Hengge-Aronis (1991) foi demonstrado que a maior resistência aos estresses observada em *E. coli* é mediada pelo fator  $\sigma^S$ . O  $\sigma^S$  acumula-se e liga-se à RNA polimerase quando as células são submetidas a mais de 50 tipos diferentes de condições de estresse e carência nutricional (HUGHES e ANDERSSON, 1997). Outros reguladores globais muito importantes agem em conjunto com  $\sigma^S$  na adaptação à fase estacionária (NYSTRÖM, 2004a). O fator  $\sigma^S$  de *Escherichia coli* e seu correspondente em *Bacillus*, o fator  $\sigma^B$  estão ausentes em alfa-proteobactérias. Nesta família há um novo regulador global de resposta a estresses de constituição híbrida (fator sigma/domínio sensor) chamado PhyR (STARÓN e MASCHER, 2010).

Em *E. coli*, após a entrada em fase estacionária uma resposta adaptativa chamada *Stringent Response* controla a produção dos ribossomos, concomitante à redução de síntese de rRNA na carência nutricional (CASHEL et al., 1996; CHATTERJI e OJHA, 2001; STENT e BRENNER, 1961). A molécula efetora do controle *stringent* é a guanosina tetrafosfato (ppGpp), a qual se liga à subunidade  $\beta$  e  $\beta'$  da RNA polimerase diminuindo rapidamente os níveis transcripcionais

(CHATTERJI; FUJITA; ISHIHAMA, 1998; GOURSE et al., 1998; TOULOKHONOV; SHULGITA; HERNANDEZ, 2001). Esta molécula também pode agir como um regulador positivo, sendo que a expressão de um grande número de genes com promotores reconhecidos por  $\sigma^{70}$  dependem de ppGpp para a indução em fase estacionária e carência nutricional (KVINT et al., 2000; XIAO et al., 1991). Como a entrada em fase estacionária requer a limitação de nutrientes, ppGpp mostra-se um excelente candidato alternativo para a regulação de genes de adaptação à fase estacionária e carência nutricional.



**Figura 4. Microscopias de *Caulobacter crescentus* ao longo da fase estacionária de crescimento.** Na coluna da esquerda estão microscopias de contraste de fase e, na direita microscopias de fluorescência com a coloração LIVE/DEAD. A coloração verde mostra células viáveis, enquanto que as vermelhas são células mortas. (A) e (B) são microscopias de culturas em fase exponencial de crescimento, enquanto, (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 et al., 1998.



O gene *cspD* de *E. coli*, codificante para uma CSP que se liga ao nucleóide inibindo a replicação do DNA, é induzido em fase estacionária de maneira dependente de ppGpp, mas independentemente de sigma S (YAMANAKA et al., 2001). Mais recentemente foi demonstrado que a proteína CspD é regulada pós-traducionalmente pela protease Lon (LANGKLOTZ e NARBERHAUS, 2011). O bloqueio da tradução, uma adaptação energética necessária para a manutenção da viabilidade celular em condição de limitação nutricional característica da fase estacionária pode ser um fator que deflagre a expressão de proteínas CSP nesta fase (ETCHEGARAY E INOUE, 1999; GRAUMAN E MARAHIEL, 1999; WILSON e NIERHAUS, 2005). Em da Silva et al. (2010) foi demonstrado que o gene *cspD* de *C. crescentus*, induzido em fase estacionária, sofre regulação por ppGpp. Além disso, o aumento de expressão em fase estacionária é dependente do regulador de resposta SpdR, que se liga ao promotor do gene *cspD* ativando sua transcrição.

Apesar dos inúmeros estudos da regulação de genes codificantes para proteínas contendo domínio de choque frio durante o choque-frio, só mais recentemente estudos mais aprofundados de regulação em fase estacionária foram realizados. Entretanto, o papel na célula bacteriana desempenhado pelas CSPs durante a fase estacionária ainda permanece não esclarecido.

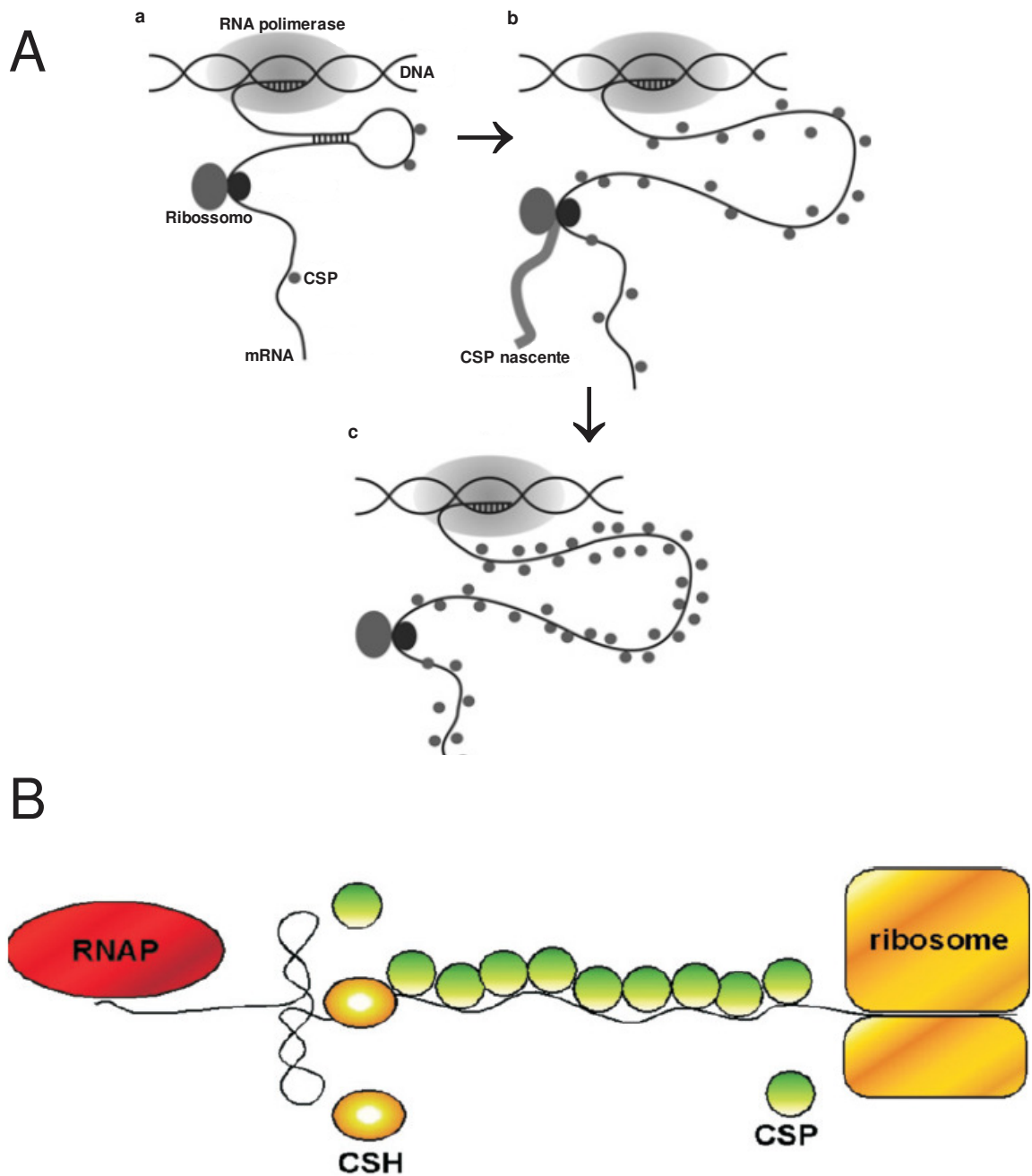
Ao contrário do que foi visto para as CSPs induzidas em fase estacionária, nas quais o aumento em nível transcricional se dá principalmente por síntese *de novo*, na resposta as baixas temperaturas o componente transcricional da indução destes genes baseia-se principalmente na estabilização dos mensageiros. Apesar do envolvimento transcricional na expressão de alguns genes, a maior contribuição das CSPs na adaptação às baixas temperaturas está em sua ação sobre os mRNAs, favorecendo a manutenção do estado linear não estruturado destes componentes celulares, inclusive atuando cooperativamente com helicases de RNA da família DEAD neste processo (Fig. 5) (HORN et al., 2007; HUNGER et al., 2006). Acredita-se que ligação destas proteínas à base do grampo de estrutura secundária do mRNA aumente o tempo de meia-vida deste mensageiros por dificultar o reconhecimento e degradação dos mesmos por RNases. Além disso, como mencionado anteriormente, a helicase de RNA CsdA aparentemente participa da degradação de mRNAs durante sua associação ao degradossomo desfazendo estruturas dos mRNAs (ERMOLENKO e MAKHATADZE, 2002; GRUNBERG-MANAGO, 1999; MICZAK et al., 1996; PRUD'HOMME-GENEREUX et al., 2004; PY et al., 1996).

Acredita-se que a grande instabilidade do mRNA de *cspA* de *E. coli* seja resultado da longa e estruturada região 5' não traduzida deste mensageiro, que

pode ser alvo de degradação por RNase III (GRUNBERG-MANAGO, 1999; MICZAK; SRIVASTAVA; APIRION, 1991). Há indícios de que CspA ligue-se a seu próprio mensageiro em baixas temperaturas impedindo a formação de estruturas secundárias e permitindo sua degradação por RNases. Na região 5' não traduzida de todos genes *csp* de *E. coli*, bem como do gene *csdA*, há uma região de 11 nucleotídeos bastante conservada chamada de *Cold Box*, na qual se acredita que CspA se ligue. (BAE; JONES; INOUE, 1997; ERMOLENKO e MAKHATADZE, 2002; JIANG; FANG; INOUE, 1996).

As proteínas contendo domínios de choque frio em bactérias estão envolvidas em processos traducionais em diferentes maneiras, sendo um aspecto muito importante a forte influência sobre a tradução de seus próprios mensageiros. A desestabilização de estruturas secundárias dos mRNA não só reduz a clivagem por RNases como também aumenta a acessibilidade do mRNA aos ribossomos, facilitando a tradução uma vez que estas estruturas podem mascarar a sequência Shine-Dalgarno, impedir a elongação da cadeia quando formadas no interior da região codificante ou ainda interferir na terminação da tradução ao mascarar o códon de terminação (WEBER e MARAHIEL, 2003).

Sendo assim, é provável que o mRNA das CSPs não se tornem apenas mais estáveis em baixas temperaturas, mas também mais eficientemente traduzidos pelos ribossomos. Foi proposto que uma sequência de 12 nucleotídeos no início da região codificante de *cspA*, *cspB*, *cspG* e *csdA* de *E. coli*, chamada *Downstream box* atue como um potencializador traducional essencial para a indução dependente de frio nestes genes. Esta sequência seria pareada com a sequência entre os nucleotídeos 1469 e 1483 do 16S RNA de modo a aumentar a afinidade dos ribossomos pelo mRNA (ETCHEGARAY e INOUE, 1999a; 1999b; MITTA; FANG; INOUE, 1997). Outra sequência, chamada *Upstream box* localizada na região 5' não traduzida de CspA, CspB, CspG e CspI próxima à sequência Shine-Dalgarno também é complementar à sequência do 16S RNA, desta vez na região compreendida entre os nucleotídeos 1023° e 1035°. A deleção desta região compromete a indução após o choque frio diminuindo consideravelmente a quantidade de CspA em *E. coli*, sendo um provável elemento *in cis* de regulação por aumento de tradução (YAMANAKA; MITTA; INOUE, 1999).



**Figura 5. Ilustração esquemática do envolvimento das proteínas CSP e helicases DEAD na resposta ao frio.** Após a queda brusca de temperatura proteínas de choque frio (A) são fortemente sintetizadas e associam-se aos mRNAs mantendo-os em conformação linear não estruturada. FONTE: Modificado de Horn et al. (2007). (B) As CSPs (em verde) podem, ainda, associar-se funcionalmente a helicases de RNA da família DEAD/DEAH (em amarelo) e cooperativamente desfazer estruturas secundárias nos mRNAs e impedir a formação de novos grampos de estrutura secundária. FONTE: Hunger et al. (2006).

## 5 CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu caracterizar a resposta ao frio em *Caulobacter crescentus*, bem como analisar a importância das proteínas contendo domínios de choque frio durante a queda de temperatura e após a entrada da fase estacionária. Os resultados em conjunto permitiram a obtenção das seguintes conclusões:

- Apesar de sua temperatura ótima de crescimento em torno de 30 °C *Caulobacter crescentus* é capaz de manter o crescimento mesmo em temperaturas baixas como 4 °C, sendo portanto, psicrotolerante.
- *C. crescentus* possui uma resistência intrínseca ao congelamento a -80 °C, mantendo altos níveis de viabilidade mesmo por longos períodos nesta condição. O congelamento a -20 °C mostra-se muito mais danoso para a manutenção da viabilidade celular.
- A resistência ao congelamento em *Caulobacter crescentus* é uma característica decorrente da fase de crescimento e resulta da atividade de ao menos três genes, que codificam para RNA e DNA helicases, além de sistemas de transporte através das membranas.
- A ausência das duas CSPs de *Caulobacter* induzidas em baixas temperaturas confere fenótipo de sensibilidade a esse estresse indicando que mesmo com o aumento de expressão de *cspC*, estas CSPs remanescentes não são capazes de compensar a ausência das primeiras.
- A ausência de *CspC*, a proteína de choque frio mais induzida em fase estacionária, confere fenótipo de sensibilidade a baixas temperaturas e retardo no crescimento mesmo em temperatura ótima de incubação.
- A ausência de quaisquer CSPs confere diminuição de resistência ao congelamento a -80 °C, mas não a -20 °C.
- A deleção das duas CSPs, normalmente induzidas em choque frio, promove aumento na expressão de *cspD* e adiantamento dos níveis máximos de *cspC*, além de impedir a queda de viabilidade característica da fase estacionária precoce de *C. crescentus* NA1000.
- A ausência de *cspC* e *cspD* não promove lise celular quando as culturas atingem a fase estacionária de crescimento, mas impede a retomada do crescimento após a queda de viabilidade que ocorre na fase estacionária precoce.

- A ausência de *cspC* e *cspD* tem como consequência a alteração da morfologia em fase estacionária, tornando algumas células filamentosas e as levando à morte.
- Além de *cspC* e *cspD*, descritas como induzidas em fase estacionária, *cspB* também apresentou indução em fase estacionária. Esta indução mostrou-se dependente de SpdR e influenciada por ppGpp e CspC.
- *cspA* e *cspB* não sofrem autorregulação até 5h de incubação em baixas temperaturas e tampouco apresentam aumento dos níveis transcricionais na ausência da outra.
- A ausência de CspC compromete seriamente os níveis de expressão de *cspB* em quaisquer condições de incubação.
- *cspA* e *cspB* são induzidas em baixas temperaturas através de mecanismos pós-transcricionais e traducionais.
- O caráter traducional da indução em baixa temperatura é predominante em *cspA* e *cspB*, sendo mais pronunciado em *cspB*.
- As quatro CSPs de *C. crescentus* agem como antiterminadores de transcrição *in vivo* quando analisadas na linhagem RL211 de *E. coli*, a superexpressão das CSPs de *Caulobacter* não conferem toxicidade para *E. coli* e não é capaz de restaurar o fenótipo deficiência de crescimento a 15 °C apresentado pela linhagem de *E. coli* BX04.
- Diferentemente do observado para *E. coli*, o resíduo de Histidina localizado no segundo domínio de ligação a ácidos nucleicos do domínio CSD não é crítico para a atividade antiterminadora das CSPs de *Caulobacter*.

REFERÊNCIAS<sup>3</sup>

ABYZOV, S. S.; MITSKEVICH, I. N.; POGLAZOVA, M. N.; BARKOV, N. I.; LIPENKOV, V. Y.; BOBIN, N. E.; KOUDRYASHOV, B. B.; PASHKEVICH, V. M.; IVANOV, M.V. Microflora in the basal strata at Antarctic ice core above the Vostok lake. **Adv. Space Res.**, v. 28, n. 4, p. 701-706, 2001.

AGUILAR, P. S.; HERNANDEZ-ARRIAGA, A. M.; CYBULSKI, L. E.; ERAZO, A. C.; D. E.; MENDOZA, D.) Molecular basis of thermosensing: a two-component signal transduction thermometer in *Bacillus subtilis*. **EMBO J.**, v. 20, p. 1681-1691, 2001.

ALBANESI, D.; MANSILLA, M. C.; DE MENDOZA, D. The membrane fluidity sensor DesK of *Bacillus subtilis* controls the signal decay of its cognate response regulator. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 2655-2663, 2004.

ALLEY, M. R.; GOMES, S. L.; ALEXANDER, W.; SHAPIRO, L. Genetic analysis of a temporally transcribed chemotaxis gene cluster in *Caulobacter crescentus*. **Genetics.**, v. 129, n. 2, p. 333-341, 1991.

ALUR, M. D.; GRECZ, N. Mechanism of injury of *Escherichia coli* by freezing and thawing. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 62, n. 2, p. 308-312, 1975.

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 responses in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 66, n. 5, p. 1240-1255, 2007.

APIRION, D. Degradation of RNA in *Escherichia coli*. A hypothesis. **Mol. Gen. Genet.**, v. 122, n. 4, p. 313-322, 1973.

ARNOLD, K.; BORDOLI, L.; KOPP, J.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. **Bioinformatics**, v. 22, n. 2, p. 195-201, 2006.

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

---

<sup>3</sup> De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- AWANO, N.; XU, C.; KE, H.; INOUE, K.; INOUE, M.; PHADTARE, S. Complementation analysis of the cold-sensitive phenotype of the *Escherichia coli* *csdA* deletion strain. **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 16, p. 5808-5815, 2007.
- BAATI, L.; FABRE-GEA, C.; AURIOL, D.; BLANC, P. J. Study of the cryotolerance of *Lactobacillus acidophilus*: effect of culture and freezing conditions on the viability and cellular protein levels. **Int. J. Food Microbiol.**, v. 59, n. 3, p. 241-247, 2000.
- BAE, W.; JONES, P. G.; INOUE, M. CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*, negatively regulates its own gene expression. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 22, p. 7081-7088, 1997.
- BAE, W.; PHADTARE, S.; SEVERINOV, K.; INOUE, M. Characterization of *Escherichia coli* *cspE*, whose product negatively regulates transcription of *cspA*, the gene for the major cold shock protein. **Mol. Microbiol.**, v. 31, n. 5, p. 1429-1441, 1999.
- 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.** 126 f. Dissertação (mestrado em Ciências) – 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.
- BATRAKOV, S. G.; NIKITIN, D. I.; SHEICHENKO, V. I.; RUZHITSKY, A. O. Unusual lipid composition of the gram-negative, freshwater, stalked bacterium *Caulobacter bacteroides* NP-105. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1347, n. 2-3, p. 127-139, 1997.
- BEAKER, R. R. RNA Switches out in the cold. **Mol. Cell**, v. 37, n. 1, p. 1-2, 2010.
- BERDIS, A.J.; LEE, I.; COWARD, J. K.; STEPHENS, C; WRIGHT, R.; SHAPIRO, L.; BENKOVIC, S. J. A cell cycle-regulated adenine DNA methyltransferase from *Caulobacter crescentus* processively methylates GANTC sites on hemimethylated DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 95, n. 6, p. 2874-2879, 1998.

BIONDI, E. G.; REISINGER, S. J.; SKERKER, J. M.; ARIF, M.; PERCHUK, B. S.; RYAN, K. R.; LAUB, M. T. Regulation of the bacterial cell cycle by an integrated genetic circuit. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 899–904, 2006.

BLATTNER, F. R.; PLUNKETT, G. 3rd, BLOCH, C. A.; PERNA, N. T.; BURLAND, V.; RILEY, M.; COLLADO-VIDES, J.; GLASNER, J. D.; RODE, C. K.; MAYHEW, G. F.; GREGOR, J.; DAVIS, N. W.; KIRKPATRICK, H. A.; GOEDEN, M. A.; ROSE, D. J.; MAU, B.; SHAO, Y. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v. 277, n. 5331, p. 1453-1474, 1997.

BRANDI, A.; SPURIO, R.; GUALERZI, C. O.; PON, C. L. Massive presence of the *Escherichia coli* major cold-shock protein CspA under non-stress conditions. **EMBO J.**, v. 18, n. 6, p. 1653-1659, 1999.

BRAZ, V. AND MARQUES, M. V. Genes involved in cadmium resistance in *Caulobacter crescentus*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 251, n. 2, p. 289-295, 2005.

BRUN, Y. V.; SHAPIRO, L. A temporally controlled sigma-factor is required for polar morphogenesis and normal cell division in *Caulobacter crescentus*. **Genes Dev.**, v. 6, n. 12A, p. 2395-2408, 1992.

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

CASHEL, M.; GENTRY, D. R.; HERNANDEZ, V. J.; VINELLA, D. The stringent response. In: NEIDHARDT, F. C. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. Washington, DC: American Society of Microbiology Press, 1996. p. 1458–1496.

CHANDA, P. K.; MONDAL, R.; SAU, K.; SAU, S. Antibiotics, arsenate and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce the promoter of *Staphylococcus aureus* *cspC* gene more strongly than cold. **J. Basic Microbiol.**, v. 49, n. 2, p. 205-211, 2009.

CHATTERJI, D.; OJHA, A. K. Revisiting the stringent response, ppGpp and starvation signaling. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 4, n. 2, p. 160–165, 2001.

CHATTERJI, D.; FUJITA, N.; ISHIHAMA, A. The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the beta-subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. **Genes Cells**, v. 3, n. 5, p. 279-287, 1998.

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



CHINTALAPATI, S.; KIRAN, M. D.; SHIVAJI, S. Role of membrane lipid fatty acids in cold adaptation. **Cell Mol. Biol.**, v. 50, n. 5, p. 631-642, 2004.

CHOW, K.C.; TUNG, W. L. Overexpression of *dnaK/dnaJ* and *groEL* confers freeze tolerance to *Escherichia coli*. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 253, n. 2, p. 502-505, 1998.

COLLIER, J.; MCADAMS, H. H.; SHAPIRO, L. A DNA methylation ratchet governs progression through a bacterial cell cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 104, n. 43, p. 17111-17116, 2007.

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

CSONKA, L. N. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. **Microbiol. Rev.**, v. 53, n. 1, p. 121-147, 1989.

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

DA SILVA, C. A.; 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.

DAMMEL, C. S.; NOLLER, H. F. Suppression of a cold-sensitive mutation in 16S rRNA by overexpression of a novel ribosome-binding factor, RbfA. **Genes Dev.**, v. 9, n. 5, p. 626-637, 1995.

DE SIERVO, A. J.; HOMOLA, A. D. Analysis of *Caulobacter crescentus* lipids. **J. Bacteriol.**, v. 143, n. 3, p. 1215-1222, 1980.

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, n. 2, p. 255-259, 1994.

DINIZ-MENDES, L.; BERNARDES, E.; DE ARAÚJO, P. S.; PANEK, A. D.; PASCHOALIN, V. M. Preservation of frozen yeast cells by trehalose. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 65, n. 5, p. 572-578, 1999.

DUKAN, S.; NYSTRÖM, T. Oxidative stress defense and deterioration of growth-arrested *Escherichia coli* cells. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 37, p. 26027-26032, 1999.

DUMONT, F.; MARECHAL, P. A.; GERVAIS, P. Influence of cooling rate on *Saccharomyces cerevisiae* destruction during freezing: unexpected viability at ultra-rapid cooling rates. **Cryobiology**, v. 46, n. 1, p. 33-42, 2003.

\_\_\_\_\_. Cell size and water permeability as determining factors for cell viability after freezing at different cooling rates. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 1, p. 268-272, 2004.

DUVAL, B. D.; MATHEW, A.; SATOLA, S. W.; SHAFER, W. M. Altered growth, pigmentation, and antimicrobial susceptibility properties of *Staphylococcus aureus* due to loss of the major cold shock gene *cspB*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, n. 6, p. 2283-2290, 2010.

EHRETSMANN, C. P.; CARPOUSIS, A. J.; KRISCH, H. M. mRNA degradation in procaryotes. **FASEB J.**, v. 6, n. 13, p. 3186-3192, 1992.

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

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

ESWARAN, J.; KORONAKIS, E.; HIGGINS, M. K.; HUGHES, C.; KORONAKIS, V. Three's company: component structure bring a closer view of tripartite drug efflux pumps. **Curr. Opin. Struct. Biol.**, v. 14, n. 6, p. 741-747, 2004.

ETCHEGARAY, J. P.; INOUYE, M. A sequence downstream of the initiation codon is essential for cold shock induction of *cspB* of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 18, p. 5852-5854, 1999a.

\_\_\_\_\_. Translational enhancement by an element downstream of the initiation codon in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 15, p. 10079-10085, 1999b.

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

FALCONI, M.; COLONNA, B.; PROSSEDA, G.; MICHELI, G.; GUALERZI, C. O. Thermoregulation of *Shigella* and *Escherichia coli* EIEC pathogenicity. A temperature-dependent structural transition of DNA modulates accessibility of *virF* promoter to transcriptional repressor H-NS. **EMBO J.**, v. 17, n. 23, p. 7033-7043, 1998.

FANG, L.; JIANG, W.; BAE, W.; INOUE, M. Promoter-independent cold-shock induction of *cspA* and its derepression at 37 degrees C by mRNA stabilization. **Mol. Microbiol.**, v. 23, n. 2, p. 355-364, 1997.

FANG, F. C.; RIMSKY, S. New insights into transcriptional regulation by H-NS. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 11, n. 2, p.113-120, 2008.

FANG, L.; XIA, B.; INOUE, M. Transcription of *cspA*, the gene for the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is negatively regulated at 37 degrees C by the 5'-untranslated region of its mRNA. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 176, n. 1, p. 39-43, 1999.

FEINBERG, A. P.; VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Anal. Biochem.**, v. 132, n. 1, p. 6-13, 1993.

FIGGE, R. M.; GOBER, J. W. Cell shape, division and development: the 2002 American Society for Microbiology (ASM) conference on prokaryotic development. **Mol. Microbiol.**, v. 47, n. 5, p. 1475-1483, 2003.

FRANKS, F. Protein destabilization at low temperatures. *Adv. Protein Chem.*, v. 46, p. 105-139, 1995.

GAO, D.; CRITSE, J. K. Mechanisms of cryoinjury in living cells. **ILAR J.**, v. 41, n. 4, p. 187-196, 2000.

GARNERONE, A. M.; CABANES, D.; FOUSSARD, M.; BOISTARD, P.; BATUT, J. Inhibition of the FixL sensor kinase by the FixT protein in *Sinorhizobium meliloti*. **J. Biol. Chem.**, v. 274, n. 45, p. 32500-32506, 1999.

GILBERT, J. A.; DAVIES, P. L.; LAYBOURN-PARRY, J. A hyperactive Ca<sup>2+</sup> - dependent antifreeze protein in an Antarctic Bacterium. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 245, n. 1, p. 67-72, 2005.

GIULIODORI, A. M.; BRANDI, A.; GIANGROSSI, M.; GUALERZI, C. O.; PON, C. L. Cold-stress-induced de novo expression of *infC* and role of IF3 in cold-shock translational bias. **RNA**, v. 13, n. 8, p. 1355-1365, 2007.

GIULIODORI, A. M.; DI PIETRO, F.; MARZI, S.; MASQUIDA, B.; WAGNER, R.; ROMBY, P.; GUALERZI, C. O.; PON, C. L. The *cspA* mRNA is a thermosensor that modulates translation of the cold-shock protein CspA. **Mol. Cell**, v. 37, n. 1, p. 21-33, 2010.

GIULIODORI, A. M.; BRANDI, A.; GUALERZI, C. O.; PON, C. L. Preferential translation of cold-shock mRNAs during cold adaptation. **RNA**, v. 10, n. 2, p. 265-276, 2004.

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

GOLDSTEIN, J.; POLLIT, N. S.; INOUE, M. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 87, n. 1, p. 283-287, 1990.

GOLEY, D. E.; INIESTA, A. A.; SHAPIRO, L. Cell cycle regulation in *Caulobacter*: locations, location, location. **J. Cell Sci.**, v. 120, n. Pt 20, p. 3501-3507, 2007.

GORBATYUK, B.; MARCZYNSKI, G. T. Regulated degradation of chromosome replication proteins DnaA and CtrA in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 55, n. 4, p. 1233-1245, 2005.

GOURSE, R. L.; GAAL, T.; AIYAR, S. E.; BARKER, M. M.; ESTREM, S. T.; HIRVONEN, C. A.; ROSS, W. Strength and regulation without transcription factors: lessons from bacterial rRNA promoters. **Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.**, v. 63, p. 131-139, 1998.

GRAUMANN, P. L.; MARAHIEL, M. A. 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.

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.

GROSS, C. A.; LONETTO, M.; LOSICK, R. Bacterial sigma factors. In: MCKNIGHT, S.L. Transcriptional Regulation. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992. pp. 129-176.

GRUNBERG-MANAGO, M. Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. **Annu. Rev. Genet.**, v. 33, p. 193-227, 1999.

GUALERZI, C. O.; GIULIODORI, A. M.; PON, C. L. Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. **J. Mol. Biol.**, v. 331, n. 3, p. 527-539, 2003.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modelling. **Electrophoresis**, v. 18, n. 15, p. 2714-2723, 1997.

GUSCHINA, I. A.; HARWOOD, J. L. Mechanisms of temperature adaptation in poikilotherms. **FEBS Lett.**, v. 580, n. 23, p. 5477-5483, 2006.

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

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

HEERMANN, R.; JUNG, K. Structural features and mechanisms for sensing high osmolarity in microorganisms. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 7, n. 2, p. 168-174, 2004.

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

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

HOSOI-TANABE, S.; ZHANG, H.; ZHU, D.; NAGATA, S.; BAN, S.; IMURA, S. Comprehensive analysis of an antarctic bacterial community with the adaptability of growth at higher temperatures than those in Antarctica. **Biocontrol Sci.**, v. 15, n. 2, p. 57-62, 2010.

HOTTES, A. K.; SHAPIRO, L.; MCADAMS, H. H. DnaA coordinates replication initiation and cell cycle transcription in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 58, n. 5, p. 1340-1353, 2005.

HU, P.; BRODIE, E. L.; SUZUKI, Y.; MCADAMS, H. H.; ANDERSEN, G. L. Whole-genome transcriptional analysis of heavy metal stresses in *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 24, p. 8437-8449, 2005.

HUGHES, D.; ANDERSSON, D. I. Carbon starvation of *Salmonella typhimurium* does not cause a general increase of mutation rates. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 21, p. 6688-6691, 1997.

HUNGER, K.; BECKERING, C. L.; MARAHIEL, M. A. Genetic evidence for the temperature-sensing ability of the membrane domain of the *Bacillus subtilis* histidine kinase DesK. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 230, n. 1, p. 41-46, 2004.

HUNGER, K.; BECKERING, C. L.; WIEGESHOFF, F.; GRAUMANN, P. L.; MARAHIEL, M. A. Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 188, n. 1, p. 240-248, 2006.

HURME, R.; RHEN, M. Temperature sensing in bacterial gene regulation – what it all boils down to. **Mol. Microbiol.**, v. 30, n. 1, p. 1-6, 1998.

INIESTA, A. A.; MCGRATH, P. T.; REISENAUER, A.; MCADAMS, H. H.; SHAPIRO, L. A phosphosignaling pathway controls the localization and activity of a protease complex critical for bacterial cell cycle progression. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, n. 29, p. 10935-10940, 2006.

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

INOUYE, M.; PHADTARE, S. Cold shock response and adaptation at near-freezing temperature in microorganisms. **Sci. STKE**, v. 237, p. 26, 2004.

IOST, I.; DREYFUS, M. mRNAs can be stabilized by DEAD-box proteins. **Nature**, v. 372, n. 6502, p. 193-196, 1994.

\_\_\_\_\_. DEAD-box RNA helicases in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Res.**, v. 34, n. 15, p. 4189-4197, 2006.

ISRAELI, E.; SHAFFER, B. T.; LIGHTHART, B. Protection of freeze-dried *Escherichia coli* by trehalose upon exposure to environmental conditions. **Cryobiology**, v. 30, n. 5, p. 519-523, 1993.

JACOBS, C.; DOMIAN, I. J.; MADDOCK, J. R.; SHAPIRO, L. Cell cycle-dependent polar localization of an essential bacterial histidine kinase that controls DNA replication and cell division. **Cell**, v. 97, n. 1, p. 111-120, 1999.

JAIN, C. The *E. coli* RhIE RNA helicase regulates the function of related RNA helicases during ribosome assembly. **RNA**, v. 14, n. 2, p. 381-389, 2008.

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

JENKINS, D. E.; SCHULTZ, J. E.; MATIN, A. Starvation-induced cross protection against heat or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> challenge in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 170, n. 9, p. 3910-3914, 1988.

JIANG, W.; FANG, L.; INOUE, M. The role of the 5'-end untranslated region of the mRNA for CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, in cold-shock adaptation. **J. Bacteriol.**, v. 178, n. 16, p. 4919-4925, 1996.

JONES, P. G.; MITTA, M.; KIM, Y.; JIANG, W.; INOUE, M. Cold shock induces a major ribosomal-associated protein that unwinds double-stranded RNA in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, n. 1, p. 76-80, 1996.

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.

JONES, P. G.; VANBOGELEN, R. A.; NEIDHARDT, F.C. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 169, n. 5, p. 2092-1095, 1987.

JUDD, E. M.; COMOLLI, L. R.; CHEN, J. C.; DOWNING, K. H.; MOERNER, W. E.; MCADAMS, H. H. Distinct constrictive processes, separated in time and space, divide *Caulobacter* inner and outer membranes. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 20, p. 6874-6882, 2005.

KANDROR, O.; DELEON, A.; GOLDBERG, A. L. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 99, n. 15, p. 9727-9732, 2002.

KARLSON, D.; IMAI, R. Conservation of the cold shock domain protein family in plants. **Plant Physiol.**, v. 131, n. 1, p. 12-15, 2003.

KATAOKA, K.; MIZUSHIMA, T.; OGATA, Y.; MIKI, T.; SEKIMIZU, K. Heat shock-induced DNA relaxation in vitro by DNA gyrase of *Escherichia coli* in the presence of ATP. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 40, p. 24806-24810, 1996.

KATAYAMA, S.; MATSUSHITA, O.; TAMAI, E.; MIYATA, S.; OKABE, A. Phased A-tracts bind to the alpha subunit of RNA polymerase with increased affinity at low temperature. **FEBS Lett.**, v. 509, n. 2, p. 235-238, 2001.

- KAWAHARA, H.; LI, J.; GRIFFITH, M.; GLICK, B. R. Relationship between antifreeze protein and freezing resistance in *Pseudomonas putida* GR12-2. **Curr. Microbiol.**, v. 43, n. 5, p. 365-370, 2001.
- KHEMICI, V.; TOESCA, I.; POLJAK, L.; VANZO, N. F.; CARPOUSIS, A. J. The RNase E of *Escherichia coli* has at least two binding sites for DEAD-box RNA helicases: functional replacement of RhlB by RhlE. **Mol. Microbiol.**, v. 54, n. 5, p. 1422-1430, 2004.
- KIEFER, F.; ARNOLD, K.; KÜNZLI, M.; BORDOLI, L.; SCHWEDE, T. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, Database issue D387-392, 2009.
- KIM, M. H.; SASAKI, K.; IMAI, R. Cold shock domain protein 3 regulates freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 35, p. 23454-23460, 2009.
- KIM, W. S.; PARK, S. D.; LEE, S. M.; KIM, Y.; KIM, P.; LEE, H. S. Expression analysis of the csp-like genes from *Corynebacterium glutamicum* encoding homologs of the *Escherichia coli* major cold-shock protein cspA. **J. Microbiol. Biotechnol.**, v. 17, n. 8, p. 1353-1360, 2007.
- KIM, W. S.; KHUNAJAKR, N.; REN, J.; DUNN, N. W. Conservation of the major cold shock protein in lactic acid bacteria. **Curr. Microbiol.**, v. 37, n. 5, p. 333-336, 1998.
- KLINKERT, B.; NARBERHAUS, F. Microbial thermosensors. **Cell Mol. Life Sci.**, v. 66, n. 16, p. 2661-2676, 2009.
- KONKEL, M. E.; TILLY, K. Temperature-regulated expression of bacterial virulence genes. **Microbes Infect.**, v. 2, n. 2, p. 157-166, 2000.
- KOSSEN, K.; UHLENBECK, O. C. Cloning and biochemical characterization of *Bacillus subtilis* YxiN, a DEAD protein specifically activated by 23S rRNA: delineation of a novel sub-family of bacterial DEAD proteins. **Nucleic Acids Res.**, v. 27, n. 19, p. 3811-3820, 1999.
- KÜLTZ, D.; CHAKRAVARTY, D. Hyperosmolality in the form of elevated NaCl but not urea causes DNA damage in murine kidney cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 98, n. 4, p. 1999-2004, 2001.
- KUMAR, A. R.; MALLOCH, A.; FUJITA, N.; SMILLIE, D. A.; ISHIHAMA, A.; HAYWARD, R. S. The minus 35-recognition region of *Escherichia coli* sigma 70 is



inessential for initiation of transcription at an “extended minus 10” promoter. **J. Mol. Biol.**, v. 232, n. 2, p. 406-418, 1993.

KVINT, K.; HOSBOND, C.; FAREWELL, A.; NYBROE, O.; NYSTRÖM, T. Emergency derepression: stringency allows RNA polymerase to override negative control by an active repressor. **Mol. Microbiol.**, v. 35, n. 2, p. 435-443, 2000.

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.

LANDICK, R.; STEWART, J.; LEE, D. N. Amino acid changes in conserved regions of the beta-subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase alter transcription pausing and termination. **Genes Dev.**, v. 4, n. 9, p. 1623-1636, 1990.

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. 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.

LANG, E. A. S.; M. V. MARQUES. 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.

LANGE, R.; HENGGE-ARONIS, R. Identification of a central regulator of stationary phase gene expression in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 5, n. 1, p. 49-59, 1991.

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

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

LESLIE, S. B.; TETER, S. A.; CROWE, L. M.; CROWE, J. H. Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1192, n. 1, p. 7-13, 1994.

LIOU, G. G.; CHANG, H. Y.; LIN, C. S.; SUE, L. C. DEAD box RhlB RNA helicase physically associates with exoribonuclease PNPase to degrade double-stranded RNA independent of the degradosome-assembling region of RNase E. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 43, p. 41157-41162, 2002.

LOPEZ-GARCIA, P.; FORTERRE, P. DNA topology and the thermal stress response, a tale from mesophiles and hyperthermophiles. **Bioessays**, v. 22, n. 8, p. 738-746, 2000.

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.

MA, D.; COOK, D. N.; ALBERTI, M.; PON, N. G.; NIKADO, H.; HEARST, J. E. Genes *acrA* and *acrB* encode a stress-induced efflux system of *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 16, n. 1, p. 45-55, 1995.

MALAKOOTI, J.; WANG, S. P.; ELY, B. A consensus promoter sequence for *Caulobacter crescentus* genes involved in biosynthetic and housekeeping functions. **J. Bacteriol.**, v. 177, n. 15, p. 4372-4376, 1995.

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

MANSILLA, M. C.; CYBULSKI, L. E.; ALBANESI, D.; DE MENDOZA, D. Control of membrane lipid fluidity by molecular thermosensors. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 20, p. 6681-6688, 2004.

MARCZYNSKI, G. T. Chromosome methylation and measurement of faithful, once and only once per cell cycle chromosome replication in *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 7, p. 1984-1993, 1999.

MARKS, M. E.; CASTRO-ROJAS, C. M.; TEILING, C.; DU, L.; KAPATRAL, V.; WALUNAS, T. L.; CROSSON, S. The genetic basis of laboratory adaptation in *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 14, p. 3678-3688, 2010.

- MATIN, A. The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 5, n. 1, p. 3-10, 1991.
- 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. R.; LANG, E. A. S. ; BRAZ, V. S. ; MARQUES, M. V. Characterization of *Caulobacter crescentus* response to low temperature and identification of genes involved in freezing resistance. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 288, n. 2, p. 178-185, 2008.
- MCGRATH, P. T.; INIESTA, A. A.; RYAN, K. R.; SHAPIRO, L.; MCADAMS, H. H. A dynamically localized protease complex and a polar specificity factor control a cell cycle master regulator. **Cell**, v. 124, n. 3, p. 535-547, 2006.
- MCGRATH, P. T.; LEE, H.; ZHANG, L.; INIESTA, A. A.; HOTTES, A. K.; TAN, M. H.; HILLSON, N. J.; HU, P.; SHAPIRO, L.; MCADAMS, H. H. High-throughput identification of transcription start sites, conserved promoter motifs and predicted regulons. **Nat. Biotechnol.**, v. 25, n. 5, p. 584-592, 2007.
- MCKEEGAN, K. S.; BORGES-WALMSLEY, M I.; WALMESLEY, A. R. The structure and function of drug pumps: a update. **Trends Microbiol.**, v. 11, n. 1, p. 21-29, 2003.
- MICZAK, A.; KABERDIN, V. R.; WEI, C. L.; LIN-CHAO, S. Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 93, n. 9, p. 3865-3869, 1996.
- MICZAK, A.; SRIVASTAVA, R. A.; APIRION, D. Location of the RNA-processing enzymes RNase III, RNase E and RNase P in the *Escherichia coli* cell. **Mol. Microbiol.**, v. 5, n. 7, p. 1801-1810, 1991.
- MILLER, J. H. **Experiments in Molecular Genetics**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972. 466 p.
- MITTA, M.; FANG, L.; INOUE, M. Deletion analysis of *cspA* of *Escherichia coli*: requirement of the AT-rich Up element for *cspA* transcription and the downstream box in the coding region for its shock induction. **Mol. Microbiol.**, v. 26, n. 2, p. 321-335, 1997.

MIZUSHIMA, T.; KATAOKA, K.; OGATA, Y.; INOUE, R.; SEKIMIZU, K. Increase in negative supercoiling of plasmid DNA in *Escherichia coli* exposed to cold shock. **Mol. Microbiol.**, v. 23, n. 2, p. 381-386, 1997.

MURAKAMI, S.; NAKASHIMA, R.; YAMASHITA, E.; YAMAGUSHI, A. A Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. **Nature**, v. 419, n. 6907, p. 587-593, 2002.

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

NARBERHAUS, F.; WALDMINGHAUS, T.; CHOWDHURY, S. RNA thermometers. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 30, n. 1, p. 3-16, 2006.

NICKERSON, C. A.; ACHBERGER, E. C. Role of curved DNA in binding of *Escherichia coli* RNA polymerase to promoters. **J. Bacteriol.**, v. 177, n. 20, p. 5756-5761, 1995.

NIERMAN, W. C.; FELDBLYUM, T. V.; LAUB, M. T.; PAULSEN, I. T.; NELSON, K. E.; EISEN, J. A.; HEIDELBERG, J. F.; ALLEY, M. R. K.; 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. M.; SHETTY, J.; BERRY, K. J.; UTTERBACK, T.R.; TRAN, K.; WOLF, A. M.; VAMATHEVAN, J. J.; ERMOLAEVA, M. D.; WHITE, O.; SALZBERG, S. L.; VENTER, J. C.; SHAPIRO, L.; FRASER, C. M. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 98, n. 7, p. 4136-4141, 2001.

NIES, D. H. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 27, n. 2-3, p. 313-339, 2003.

NYSTRÖM, T. Growth versus maintenance: a trade-off dictated by RNA polymerase availability and sigma factor competition? **Mol. Microbiol.**, v. 54, n. 4, p. 855-862, 2004.

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

PEIL, L.; VIRUMÄE, K.; REMME, J. Ribosome assembly in *Escherichia coli* strains lacking the RNA helicase DeaD/CsdA or DbpA. **FEBS J.**, v. 275, n. 15, p. 3772-3782, 2008.

- PELICIC, V.; REYRAT, J. M.; GICQUEL, B. Expression of the *Bacillus subtilis sacB* gene confers sucrose sensitivity on mycobacteria. **J. Bacteriol.**, v. 178, n. 4, p. 1197-1179, 1996.
- PENG, W. T.; NESTER, E. W. Characterization of a putative RND-type efflux system in *Agrobacterium tumefaciens*. **Gene**, v. 270, n. 1, p. 245-252, 2001.
- PHADTARE, S. Recent developments in bacterial cold-shock response. **Curr. Issues Mol. Biol.**, v. 6, n. 2, p. 125-136, 2004.
- PHADTARE, S.; INOUE, M. Sequence-selective interactions with RNA by CspB, CspC and CspE, member of the CspA family of *Escherichia coli*. **J. Mol. Microbiol.**, v. 33, n. 5, p. 1004-1014, 1999.
- PHADTARE, S.; INOUE, M. Genome-wide transcriptional analysis of the cold shock response in wild-type and cold-sensitive, quadruple-csp-deletion strains of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 20, p. 7007-7014, 2004.
- PHADTARE, S.; INOUE, M.; 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.
- PHADTARE, S.; SEVERINOV, K. Extended -10 motif is critical for activity of the *cspA* promoter but does not contribute to low-temperature transcription. **J. Bacteriol.**, v. 187, n. 18 p. 6584-6589, 2005.
- PHADTARE, S.; SEVERINOV, K.; INOUE, M. Assay of transcription antitermination by proteins of the CspA family. **Methods Enzymol.**, v. 371, p. 460-471, 2003.
- PHADTARE, S.; TYAGI, S.; INOUE, M.; SEVERINOV, K. Three amino acids in *Escherichia coli* CspE surface-exposed aromatic patch are critical for nucleic acid melting activity leading to transcription antitermination and cold acclimation of cells. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 48, p. 46706-46711, 2002.
- POINDEXTER, J. S. The caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 45, n. 1, p. 123-179, 1981.
- PRENTKI, P.; KRISCH, H. M. *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. **Gene**, v. 29, n. 3, p. 303-313, 1984.
- PROSEDA, G.; FALCONI, M.; GIANGROSSI, M.; GUALERZI, C. O.; MICHELI, G.; AND COLONNA, B. The *virF* promoter in *Shigella*: More than just a curved DNA stretch. **Mol. Microbiol.**, v. 51, n. 2, p. 523-537. (2004).

PRUD'HOMME-GENEREUX, A.; BERAN, R. K.; IOST, I.; RAMEY, C. S.; MACKIE, G. A.; SIMONS, R. W. Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: evidence for a 'cold shock degradosome'. **Mol. Microbiol.**, v. 54, n. 5, p. 1409-1421, 2004.

PURUSHARTH, R. I.; KLEIN, F.; SULTHANA, S.; JAGER, S.; JAGANNADHAM, M. V.; EVGUENIEVA-HACKENBERG, E.; RAY, M. K.; KLUG, G. Exoribonuclease R interacts with endoribonuclease E and an RNA helicase in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae*. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 15, p. 14572-14578, 2005.

PY, B.; HIGGINS, C. F.; KRISCH, H. M.; CARPOUSIS, A. J. A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. **Nature**, v. 381, n. 6578, p. 169-172, 1996.

QUON, K. C.; MARCZYNSKI, G. T.; SHAPIRO, L. Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. **Cell**, v. 84, n. 1, p. 83-93, 1996.

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.

REEVE, C. A.; AMY, P. S.; MATIN, A. Role of protein synthesis in the survival of carbonstarved *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.**, v. 160, n. 3, p. 1041-1046, 1984.

REISENAUER, A.; QUON, K.; SHAPIRO, L. The CtrA response regulator mediates temporal control of gene expression during the *Caulobacter* cell cycle. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 8, p. 2430-2439, 1999.

REISENAUER, A.; SHAPIRO, L. DNA methylation affects the cell cycle transcription of the CtrA global regulator in *Caulobacter*. **EMBO J.**, v. 21, n. 18, p. 4969-7497, 2002.

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 chaperone gene *grpE*. **J. Bacteriol.**, v. 178, n. 7, p. 1829-1841, 1996.

ROCHA, E. P.; CORNET, E.; MICHEL, B. Comparative and evolutionary analysis of the bacterial homologous recombination systems. **PLoS Genet.**, v. 1, n. 2, p. 15, 2005.

SCHMID, B.; KLUMPP, J.; RAIMANN, E.; LOESSNER, M. J.; STEPHAN, R.; TASARA, T. Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 6, p. 1621-1627, 2009.

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.

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

SCHWEDE, T.; KOPP, J.; GUEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, n. 13, p. 3381-3385, 2003.

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

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.

SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.**, v. 98, n. 3, p. 503-517, 1975.

SOUZU, H. Changes in chemical structure and function in *Escherichia coli* cell membranes caused by freeze-thawing. Change of lipid state in bilayer vesicles and in the original membrane fragments depending on rate of freezing. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 978, n. 1, p. 105-111, 1989.

STAROŇ, A.; MASCHER, T. General stress response in  $\alpha$ -proteobacteria: PhyR and beyond. **Mol. Microbiol.**, v. 78, n. 2, p. 271-277, 2010.

STENT, G. S.; BRENNER, S. A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 47, p. 2005-2014, 1961.

TAKATA, R.; IZUHARA, M.; AKIYAMA, K. Processing in the 5' region of the *pnp* transcript facilitates the site-specific endonucleolytic cleavages of mRNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 20, n. 4, p. 847-850, 1992.

THAMMAVONGS, B.; CORROLER, D.; PANOFF, J. M.; AUFRAY, Y.; BOUTIBONNES, P. Physiological response of *Enterococcus faecalis* JH2-2 to cold shock: growth at low temperatures and freezing/thawing challenge. **Lett. Appl. Microbiol.**, v. 23, n. 6, p. 398-402, 1996.

THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. **Current Protocols in Bioinformatics**, New York, Chapter 2, Unit 2.3, 2002. ISSN: 1934-3396.

TOULOKHONOV, I. I.; SHULGINA, I.; HERNANDEZ, V. J. Binding of the transcription effector ppGpp to *Escherichia coli* RNA polymerase is allosteric, modular, and occurs near the N terminus of the beta'-subunit. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 2, p. 1220-1225, 2001.

TUPPER, A. E.; OWEN-HUGHES, T. A.; USSERY, D. W.; SANTOS, D. S.; FERGUSON, D. J.; SIDEBOTHAM, J. M.; HINTON, J. C.; HIGGINS, C. F. The chromatin-associated protein H-NS alters DNA topology *in vitro*. **EMBO J.**, v. 13, n. 1, p. 258-268, 1994.

VAN HELDEN, J. Regulatory sequence analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, n. 13, p. 3593-3596, 2003.

VANBOGELEN, R. A.; HUTTON, M. E.; NEIDHARDT, F. C. Gene-protein database of *Escherichia coli* K-12: edition 3. **Electrophoresis**, v. 11, n. 12, p. 1131-1166, 1990.

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

WASSARMAN, K. M. Small RNAs in bacteria. Diverse regulators of gene expression in response to environmental changes. **Cell**, v. 109, n. 2, p. 141-144, 2002.

WEBER, M. H.; FRICKE, I.; DOLL, N.; MARAHIEL, M. A. CSDBase: an interactive database for cold shock domain-containing proteins and the bacterial cold shock response. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, n. 1, p. 375-378, 2002.



WEBER, M. H.; MARAHIEL, M. A. Coping with the cold: the cold shock response in the Gram-positive soil bacterium *Bacillus subtilis*. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 357, n. 1423, p. 895-907, 2002.

\_\_\_\_\_. Bacterial cold shock responses. **Sci. Prog.**, v. 86, pt. 1-2, p. 9-75, 2003.

WHITE-ZIEGLER, C. A.; DAVIS, T. R. Genome-wide identification of H-NS-controlled, temperature-regulated genes in *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.**, v. 191, n. 3, p. 1106-1110, 2009.

WILLIMSKY, G.; BANG, H.; FISCHER, G.; MARAHIEL, M. A. Characterization of *cspB*, a *Bacillus subtilis* inducible cold shock gene affecting cell viability at low temperatures. **J. Bacteriol.**, v. 174, n. 20, p. 6326-6335, 1992.

WILSON, D. N.; NIERHAUS, K. H. The how and Y of cold shock. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 11, n. 11, p. 1026-1028, 2004.

WIMBERLY, B. T.; BRODERSEN, D. E.; CLEMONS, W. M. JR.; MORGAN-WARREN, R. J.; CARTER, A. P.; VONRHEIN, C.; HARTSCH, T.; RAMAKRISHNAN, V. Structure of the 30S ribosomal subunit. **Nature**, v. 407, n. 6802, p. 327-339, 2000.

WOLFFE, A. P.; TAFURI, S.; RANJAN, M.; FAMILARI, M. The Y-box factors: a family of nucleic acid binding proteins conserved from *Escherichia coli* to man. **New Biol.**, v. 4, n. 4, p. 290-298, 1992.

WORTINGER, M. A.; QUARDOKUS, E. M.; BRUN, Y.V. Morphological adaptation and inhibition of cell division during stationary phase in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 29, n. 4, p. 963-973, 1998.

WOUTERS, J. A; FRENKIEL, H.; DE VOS, W. M; KUIPERS, O. P.; ABEE, T. Cold shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363 are involved in cryoprotection and in the production of cold-induced proteins. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 67, n. 11, p. 5171-5178, 2001.

WOUTERS, J. A; MAILHES, M.; ROMBOUTS, F M; DE VOS, W. M; KUIPERS, O. P.; ABEE, T. Physiological and regulatory effects of controlled overproduction of five cold shock proteins of *Lactococcus lactis* MG1363. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 9, p. 3756-3763, 2000.

WU, J.; NEWTON, A. The *Caulobacter* heat shock sigma factor gene *rpoH* is positively autoregulated from a sigma32-dependent promoter. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 2, p. 514-521, 1997.

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.

XIAO, H.; KALMAN, M.; IKEHARA, K.; ZEMEL, S.; GLASER, G.; CASHEL, M. Residual guanosine 3', 5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 9, p. 5980-5990, 1991.

YAMANAKA, K.; MITTA, M.; INOUE, M. Mutation analysis of the 5' untranslated region of the cold shock *cspA* mRNA of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 20, p. 6284-6291, 1999.

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.; INOUE, M. Growth-phase-dependent expression of *cspD* encoding a member of the CspA family in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 197, n. 16, p. 5126-5130, 1997.

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.

YOKOIGAWA, K.; MURAKAMI, Y.; KAWAI, H. Trehalase activity and trehalose content in a freeze-tolerant yeast, *Torulasporea delbrueckii*, and its freeze-sensitive mutant. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 59, n. 11, p. 2143-2145, 1995.