

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.

São Paulo
2011

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

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

reprodução não autorizada pelo autor

Mazzon, Ricardo Ruiz.

Estudo de genes de *Caulobacter crescentus* importantes para a sobrevivência em baixas temperaturas / Ricardo Ruiz Mazzon. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Marilis do Valle Marques.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Regulação gênica bacteriana.

Versão do título para o inglês: Study of *Caulobacter crescentus* genes important to low temperature survival.

Descritores: 1. Genética bacteriana 2. Genética molecular 3. Genética microbiana I. Marques, Marilis do Valle II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0164/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ricardo Ruiz Mazzon.

Título da Tese: Estudo de genes de *Caulobacter crescentus* importantes para a sobrevivência em baixas temperaturas.

Orientador(a): Marilis do Valle Marques.

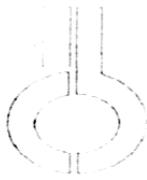
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Nome completo:
Instituição:

Presidente: Nome completo:
Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

Comissão de Ética em Pesqui

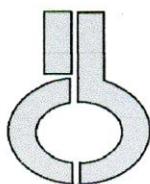
CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 209/07, referente ao projeto intitulado *Caracterização de genes de **Caulobacter crescentus** importantes para a sobrevivência em baixa temperatura* sob a responsabilidade de **Ricardo Ruiz Mazzon**, foi analisado na presente data pela CEPsh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por esta Comissão.

São Paulo, 09 de maio de 2007.

Prof. Dr. PAOLO M.A ZANOTTO

Vice-Coordenador da CEPsh-ICB/USP



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

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **081** nas fls. **34** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Marilis do Valle Marques, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Estudo da regulação de genes envolvidos na resposta a estresses ambientais em caulobacter crescentus**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Valéria Cristina da Silva Italiani, Ricardo Ruiz Mazzon, Heloise Balhesteros, Carolina Antunes**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **22.06.2006**.

São Paulo, 23 de junho de 2006.

Prof. Dra. Marília C.L. Seelaender
Coordenadora -CEEA - ICB/USP

Prof. Dra. Patrícia Castelucci
Secretária Suplente CEEA – ICB/USP

Ao meu querido sobrinho Matteo por
me mostrar com um sincero sorriso
a beleza de um recomeço repleto de
amor e esperanças.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marilis do Valle Marques pela orientação zelosa, presença, acessibilidade e dedicação aos alunos, pela confiança em mim depositada e pelos exemplos de ética e profissionalismo.

Aos colegas de laboratório Carolina, Daniela, Heloise, Juliana, Maristela e Ynés pela colaboração e por proporcionar um ambiente de trabalho descontraído e animado.

Aos ex-colegas de laboratório Elza, José, Vânia e Valéria pelas colaborações, exemplos de perseverança e, sobretudo, pela amizade incondicional. Um agradecimento especial à Elza que, mais que uma colaboradora e amiga, foi a responsável pelos primórdios deste trabalho e por muitos ensinamentos a mim destinados desde minha chegada ao laboratório.

À Profa. Dra. Regina Lucia Baldini e aos colegas participantes do grupo de discussão em Microbiologia Molecular pela colaboração e sugestões valiosas durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Frederico José Gueiros Filho e seus orientandos pela colaboração e utilização dos equipamentos de microscopia.

Ao Prof. Dr. Carlos Frederico Martins Menck e seus orientandos pela colaboração e utilização dos equipamentos de seu laboratório.

Aos professores Konstantin K. Severinov e Sangita Phadtare pela colaboração, receptividade e disponibilidade durante minha estada na Rutgers University.

À Iris, Marlene e Emílio pela eficiência, disponibilidade e apoio técnico imprescindível em todos os momentos.

À Alice, Naíde, Ana, Bruno e todos os demais funcionários e colegas do departamento, pelas orientações, convívio e apoio sempre que necessário.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao CNPq pelos apoios financeiros.

À toda minha família, em especial ao meu irmão Cristiano, por ter sido a pessoa quem mais acreditou em minhas potencialidades estimulando-me a prosseguir a despeito de quaisquer adversidades.

Aos meus queridos Arthur, Cristiane, Maura, Morgana, Jéssica, Cintia, Talita, Tybyreçá, Rafael, Regiane, Helena, Carolina e muitos outros pelo carinho e por terem estado ao meu lado em todos os momentos de alegrias e tristezas.

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*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 5'-UTR:** região 5' não traduzida
- ppGpp:** guanosina tretrafosfatada
- CSD:** Domínio de choque frio (*Cold Shock Domain*)
- CSP:** Proteína de choque frio (*Cold Shock Protein*)
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico
- dNTP:** Desoxiribonucleotídeos trifosfatados
- UDG:** Uracil-N-glicosilase
- EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético
- LB:** Luria-Bertani
- IPTG:** Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
- kb:** Quilobase(s)
- Mb:** Megabase(s)
- pb:** Pares de bases
- RNA:** Ácido ribonucleico
- mRNA:** RNA mensageiro
- rRNA:** RNA ribossomal
- ONPG:** Orto-nitrofenil- β -galactopiranosídeo
- RNase:** Ribonuclease
- SDS:** Dodecil sulfato de sódio
- UFC:** Unidades formadoras de colônia
- x g:** Vezes a aceleração da gravidade
- Ω Spec:** Cassete de resistência a espectinomicina e estreptomicina
- PNPase:** Polinucleotídeo fosforilase
- DO₆₀₀:** Densidade óptica a 600 nm
- PBS:** Solução de tampão fosfato (*Phosphate Buffer Solution*)
- DEPC:** Dietilpirocarbonato
- dTTP:** Desoxiribonucleotídeo timidina trifosfatada
- dGTP:** Desoxiribonucleotídeo guanosina trifosfatada
- dATP:** Desoxiribonucleotídeo adenosina trifosfatada
- dCTP:** Desoxiribonucleotídeo citidina trifosfatada
- SSC:** Tampão salino-citrato de sódio (*Saline-Sodium Citrate*)
- UB:** Sequência regulatória na 5'-UTR chamada *Upstream box*
- DB:** Sequência regulatória na região codificante chamada *Downstream box*
- SD:** Shine-Dalgarno
- AFP:** Proteínas anticongelantes (*Antifreeze Proteins*)
- X-gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|-----------|
| Figura 1. Ciclo celular de <i>Caulobacter crescentus</i>..... | 19 |
| Figura 2. Ilustração esquemática de regulação do ciclo celular em <i>C. crescentus</i>. | 21 |
| Figura 3. Esquema representativo do perfil de expressão de proteínas influenciado pelo choque frio em <i>Escherichia coli</i>..... | 26 |
| Figura 4. Microscopias de <i>Caulobacter crescentus</i> ao longo da fase estacionária de crescimento..... | 37 |
| Figura 5. Ilustração esquemática do envolvimento das proteínas CSP e helicases DEAD na resposta ao frio | 40 |
| Figura 6. Determinação do perfil de crescimento de <i>Caulobacter crescentus</i> em diferentes temperaturas de incubação..... | 68 |
| Figura 7. Determinação do perfil de sobrevivência de <i>Caulobacter crescentus</i> em diferentes temperaturas, números de ciclos e fases de crescimento..... | 69 |
| Figura 8. Ensaio de aquisição de criotolerância..... | 76 |
| Figura 9. Curvas de crescimento das linhagens obtidas na varredura de biblioteca de mutantes..... | 78 |
| Figura 10. Estratégia de mutagênese adotada na deleção de <i>cspB</i>. | 83 |
| Figura 11. Ensaio de viabilidade a 10 °C das linhagens mutantes para genes codificantes das CSPs de <i>Caulobacter crescentus</i>..... | 87 |
| Figura 12. Curvas de crescimento das linhagens selvagem e mutantes de genes codificantes para proteínas de choque frio. | 88 |
| Figura 13. Ensaio de determinação de sobrevivência a congelamento..... | 89 |
| Figura 14. Avaliação da sobrevivência em fase estacionária das linhagens mutantes de CSPs induzidas em frio..... | 95 |
| Figura 15. Ensaio de atividade de beta-galactosidase para determinação da expressão de <i>cspC</i> e <i>cspD</i> na linhagem mutante ΔAB. | 96 |
| Figura 16. Ensaio de determinação de viabilidade ao longo da fase estacionária..... | 97 |
| Figura 17. Visualização das morfologias das linhagens mutantes de genes codificantes para proteínas de choque frio induzidas em fase estacionária.. | 98 |
| Figura 18. Ensaio de atividade de beta-galactosidase para a determinação do padrão de expressão de <i>cspA</i> e <i>cspB</i> em fase estacionária de crescimento..... | 99 |

| | |
|--|------------|
| Figura 19. Ensaio de atividade de beta-galactosidase para determinação do perfil de expressão de <i>cspA</i> e <i>cspB</i> nas linhagens mutantes durante a adaptação ao frio..... | 103 |
| Figura 20. Ensaio de atividade de beta-galactosidase para a determinação do perfil de expressão de <i>cspC</i> e <i>cspD</i> nas linhagens NA1000 e ΔAB após o choque-frio..... | 104 |
| Figura 21. Ensaio de determinação da meia-vida dos mensageiro de <i>cspA</i> e <i>cspB</i>..... | 114 |
| Figura 22. Alinhamentos para a determinação de possíveis alvos de estudos de regulação de <i>cspA</i> e <i>cspB</i>..... | 115 |
| Figura 23. Alinhamento das sequencias dos genes codificantes para rRNA 16S de <i>Caulobacter crescentus</i> e <i>Escherichia coli</i>..... | 116 |
| Figura 24. Ilustração esquemática das estruturas secundária e terciária propostas para rRNA 16S de <i>E. coli</i>..... | 117 |
| Figura 25. Mapeamento do promotor e região 5'-UTR de <i>cspA</i>..... | 118 |
| Figura 26. Mapeamento do promotor e região 5'-UTR de <i>cspB</i>..... | 119 |
| Figura 27. Estrutura secundária predita para a região 5'-UTR dos mensageiros de pJBZ-BR8/<i>lacZ</i>, pJBZ-AR2/<i>lacZ</i> e pJBZ-FR3/<i>lacZ</i>..... | 120 |
| Figura 28. Ensaio de determinação da meia vida dos mensageiros de pJBZ-AR2/<i>lacZ</i> e pJBZ-FR3/<i>lacZ</i>..... | 121 |
| Figura 29. Curvas de crescimento da linhagem de <i>E. coli</i> RL211 carregando cópias dos genes codificantes para CSPs de <i>C. crescentus</i>..... | 127 |
| Figura 30. Alinhamento das CSPs de <i>C. crescentus</i> e CspE de <i>E. coli</i>, com localização de resíduos em estrutura terciária..... | 128 |
| Figura 31. Ensaio de atividade in vivo das CSPs de <i>Caulobacter crescentus</i>..... | 129 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Linhagens de <i>Escherichia coli</i> utilizadas neste trabalho..... | 42 |
| Tabela 2 - Linhagens de <i>Caulobacter crescentus</i> utilizadas neste trabalho..... | 43 |
| Tabela 3 - Correspondência entre NA1000 e CB15 das ORF estudadas no presente trabalho..... | 43 |
| Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho..... | 44 |
| Tabela 5 - Plasmídeos e cosmídeos utilizados neste trabalho..... | 45 |
| Tabela 6 - Sobrevivência da linhagem selvagem e dos mutantes selecionados na biblioteca de mutantes obtida pela inserção do transposon mini-Tn5..... | 77 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 17 |
| 1.1 <i>Caulobacter crescentus</i> | 17 |
| 1.2 Respostas adaptativas às baixas temperaturas | 23 |
| 1.2.1 <u>Grau de enovelamento do DNA</u> | 26 |
| 1.2.2 <u>Estruturas secundárias nos RNAs</u> | 28 |
| 1.2.3 <u>Fluidez de membrana</u> | 29 |
| 1.2.4 <u>Eficiência traducional</u> | 30 |
| 1.2.5 <u>Sobrevivência a congelamento</u> | 31 |
| 1.3 Proteínas de choque frio (CSP) | 33 |
| 2 OBJETIVOS | 41 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 42 |
| 3.1 Linhagens bacterianas e condições de crescimento | 42 |
| 3.2 Oligonucleotídeos utilizados | 44 |
| 3.3 Plasmídeos e cosmídeos utilizados | 44 |
| 3.4 Experimentos de análise fenotípica | 47 |
| 3.4.1 <u>Ensaio de sobrevivência em baixas temperaturas</u> | 47 |
| 3.4.2 <u>Ensaio de sobrevivência a congelamento</u> | 47 |
| 3.4.3 <u>Ensaio de aquisição de criotolerância</u> | 48 |
| 3.4.4 <u>Ensaio de sobrevivência a ciclos de congelamento/descongelamento</u> | 49 |
| 3.4.5 <u>Ensaio de sobrevivência a ao longo da fase estacionária</u> | 49 |
| 3.4.6 <u>Microscopias de fluorescência com coloração LIVE/DEAD</u> | 50 |
| 3.4.7 <u>Curvas de crescimento</u> | 51 |
| 3.4.8 <u>Ensaio de complementação heteróloga</u> | 51 |
| 3.4.9 <u>Ensaio de determinação de atividade antiterminadora <i>in vivo</i></u> | 51 |
| 3.5 Estudos de expressão gênica | 52 |
| 3.5.1 <u>Extração de RNA total de <i>C. crescentus</i> e síntese de cDNA</u> | 52 |
| 3.5.2 <u>Ensaio de determinação de meia-vida de mRNA por RT-PCR semi-quantitativo</u> | 53 |
| 3.5.3 <u>Ensaio de determinação de meia-vida de mRNA por RT-PCR quantitativo em tempo real</u> | 54 |
| 3.5.4 <u>Ensaio atividade de beta-galactosidase</u> | 55 |
| 3.6 Obtenção de linhagens mutantes de <i>C. crescentus</i> | 56 |
| 3.6.1 <u>Extração de DNA cromossomal de <i>C. crescentus</i></u> | 56 |
| 3.6.2 <u>Reações de PCR para amplificação das regiões flangeadoras de <i>cspB</i></u> | 57 |

| | |
|--|-----|
| 3.6.3 <u>Sequenciamento de DNA</u> | 57 |
| 3.6.4 <u>Reações de ligação de DNA</u> | 58 |
| 3.6.5 <u>Extrações plasmidiais</u> | 58 |
| 3.6.6 <u>Obtenção e transformação de células eletrocompetentes</u> | 59 |
| 3.6.7 <u>Conjugação</u> | 60 |
| 3.6.8 <u>Obtenção e detecção de linhagens mutantes de <i>cspB</i></u> | 60 |
| 3.7 Mutagênese sítio-dirigida | 61 |
| 3.8 Análises <i>in silico</i> | 62 |
| 3.8.1 <u>Predição de estruturas secundárias nos mRNAs</u> | 62 |
| 3.8.2 <u>Predição de estruturas terciárias em proteínas de choque frio de <i>Caulobacter crescentus</i></u> | 62 |
| 3.8.3 <u>Alinhamento e análises de sequencias</u> | 62 |
| 3.8.4 <u>Varredura do genoma em busca de genes que possuam sequencias UB semelhantes a das <i>csps</i></u> | 63 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 64 |
| 4.1 Estudo do perfil de crescimento em baixas temperaturas e sobrevivência a congelamento de <i>C. crescentus</i> | 64 |
| 4.1.1 <u>Aquisição de criotolerância</u> | 70 |
| 4.1.2 <u>Identificação de genes importantes na resistência ao congelamento</u> | 70 |
| 4.2 Estudo das CSPs de <i>Caulobacter crescentus</i> | 79 |
| 4.2.1 <u>Obtenção de linhagens mutantes para genes codificantes das CSPs</u> | 79 |
| 4.2.2 <u>Caracterização dos mutantes das CSPs de <i>Caulobacter crescentus</i> em relação a baixas temperaturas</u> | 84 |
| 4.2.3 <u>Caracterização dos mutantes das CSPs de <i>Caulobacter crescentus</i> em relação à fase estacionária</u> | 90 |
| 4.2.4 <u>Estudo da regulação das CSPs induzidas em baixas temperaturas</u> | 100 |
| 4.2.5 <u>Estudo da indução de <i>cspA</i> e <i>cspB</i> em baixa temperatura</u> | 105 |
| 4.2.6 <u>Estudo da atividade das CSPs <i>in vivo</i></u> | 122 |
| 4.2.7 <u>Ensaio de atividade antiterminadora de CSPs <i>in vivo</i></u> | 125 |
| 5 CONCLUSÕES | 130 |
| REFERÊNCIAS | 132 |

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).

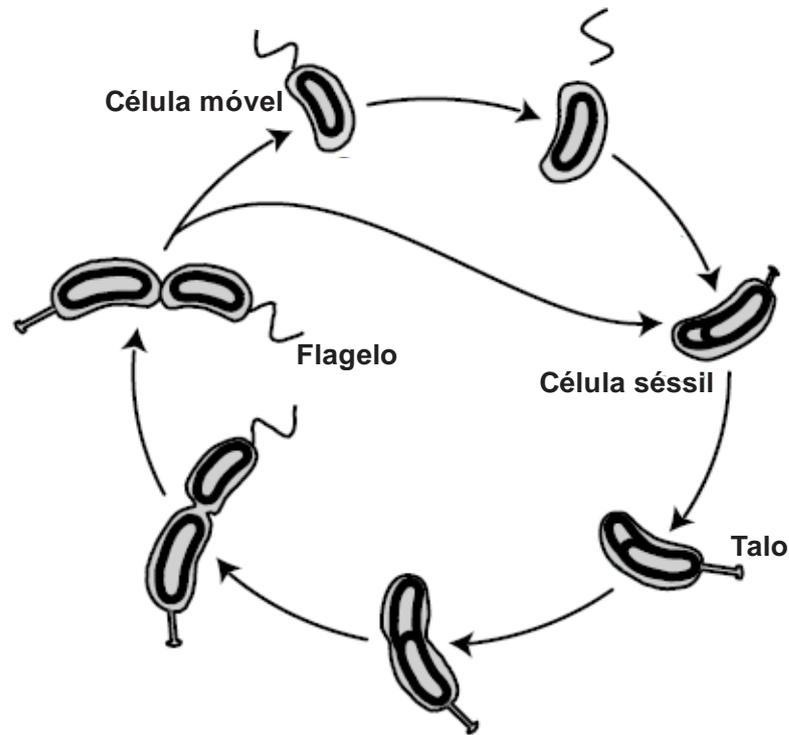


Figura 1. Ciclo celular de *Caulobacter crescentus*. No decorrer do ciclo celular a célula sésbil que possui um talo, replica o DNA e no polo oposto sintetiza um flagelo. Esta célula alongada é chamada pré-divisional. Após a citocinese, duas células distintas morfológica e fisiologicamente são geradas. 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).

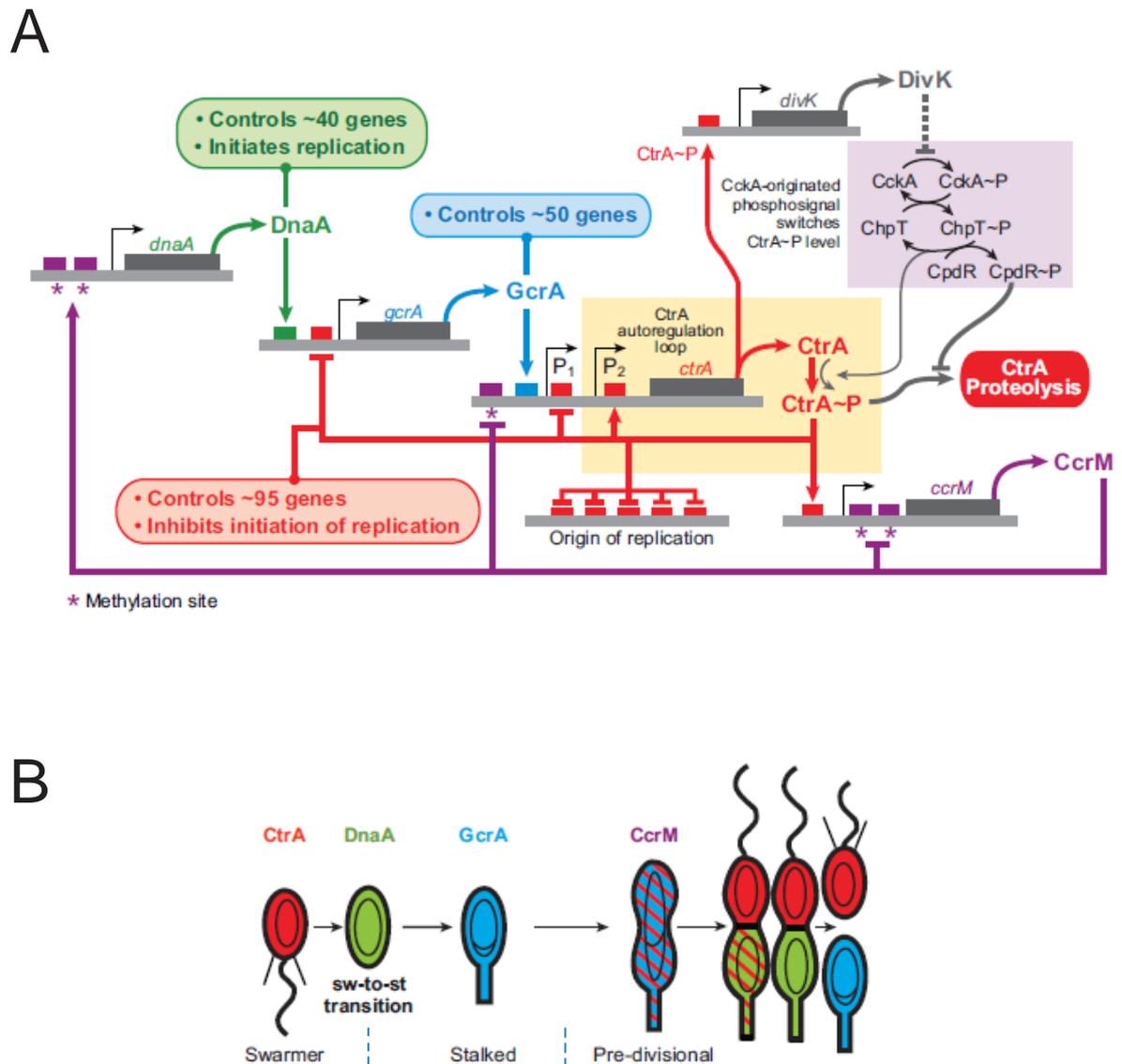


Figura 2. Ilustração esquemática da regulação do ciclo celular em *C. crescentus*. (A) Neste esquema estão representados os mecanismos regulatórios que envolvem os quatro principais reguladores globais que controlam as fases de diferenciação existentes durante o ciclo celular de *C. crescentus*. Estes 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 σ^E em resposta a estresse oxidativo gerado por cádmio, hidroperóxido orgânico, oxigênio singlete, σ^T e σ^U em resposta a estresses osmótico e oxidativo e σ^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).

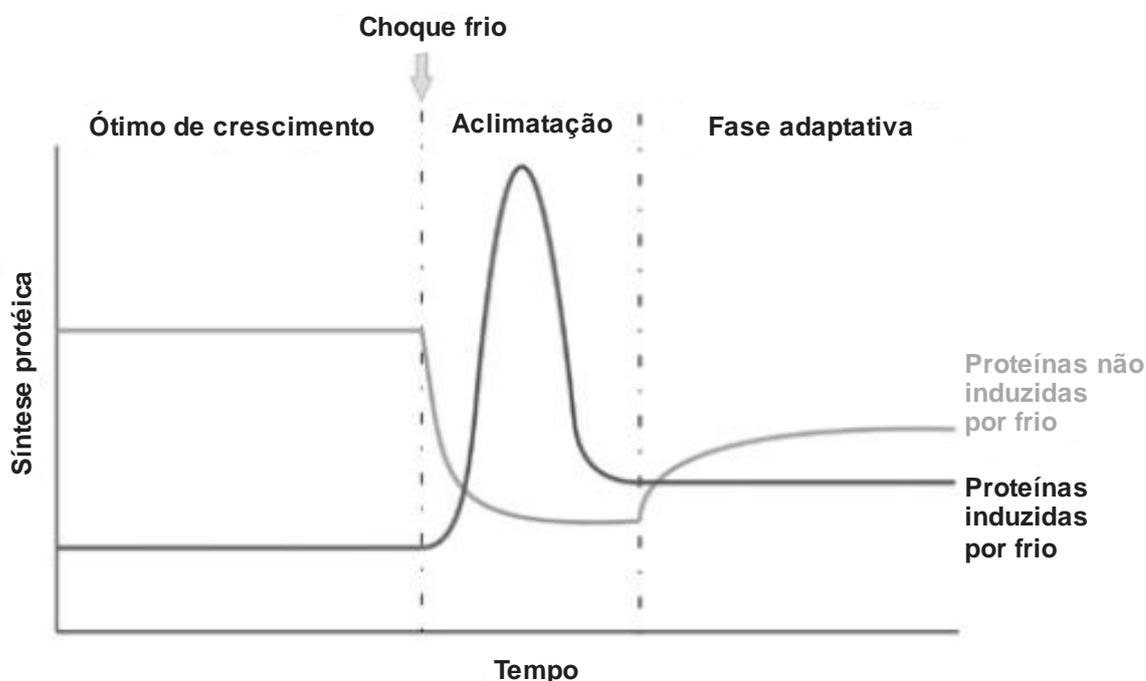


Figura 3. Esquema representativo do perfil de expressão de proteínas influenciado pelo choque frio em *Escherichia coli*. Culturas advindas de incubação a temperatura ótima de crescimento, ao serem submetidas a uma mudança brusca de temperatura de incubação alteram seu perfil de expressão de proteínas. 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 INOUYE, 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 sequencias 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 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; INOUYE, 1999; YAMANAKA e INOUYE, 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 α -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 σ^{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 α 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 σ^S . O σ^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 σ^S na adaptação à fase estacionária (NYSTRÖM, 2004a). O fator σ^S de *Escherichia coli* e seu correspondente em *Bacillus*, o fator σ^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 β e β' 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 σ^{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.

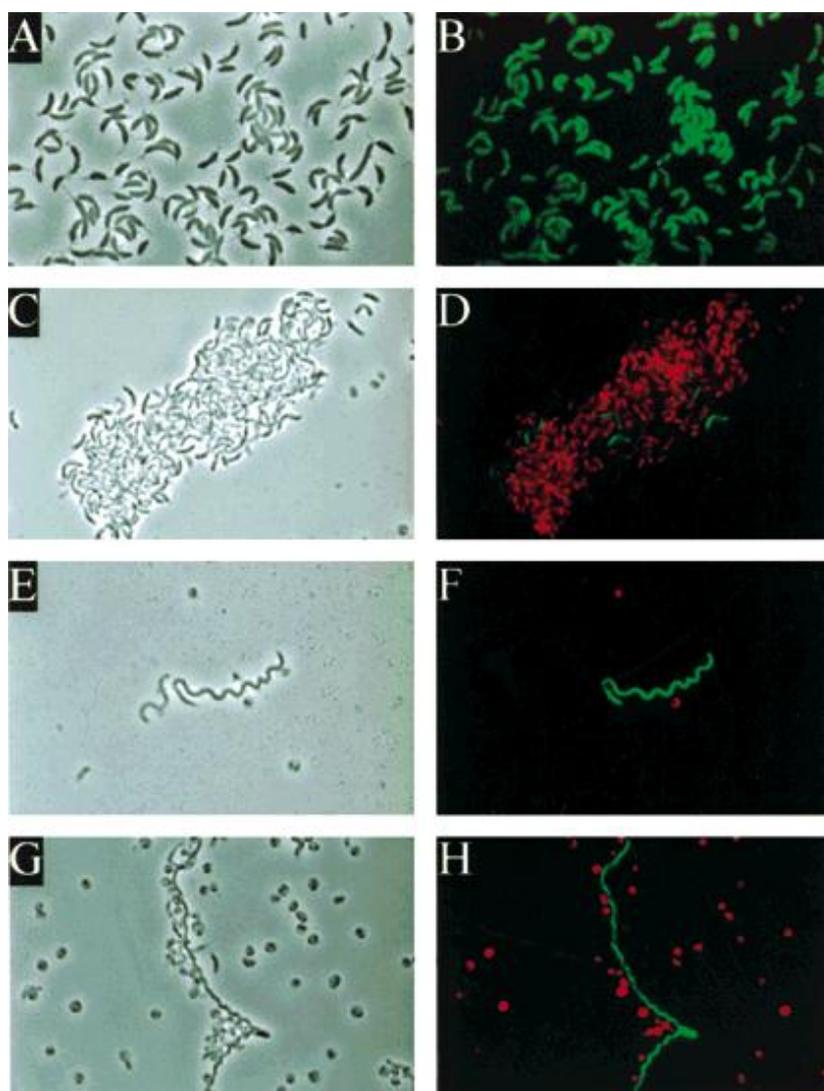


Figura 4. Microscopias de *Caulobacter crescentus* ao longo da fase estacionária de crescimento. Na coluna da esquerda estão microscopias de contraste de fase e, na direita microscopias de fluorescência com a coloração LIVE/DEAD. A coloração verde mostra células viáveis, enquanto que as vermelhas são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

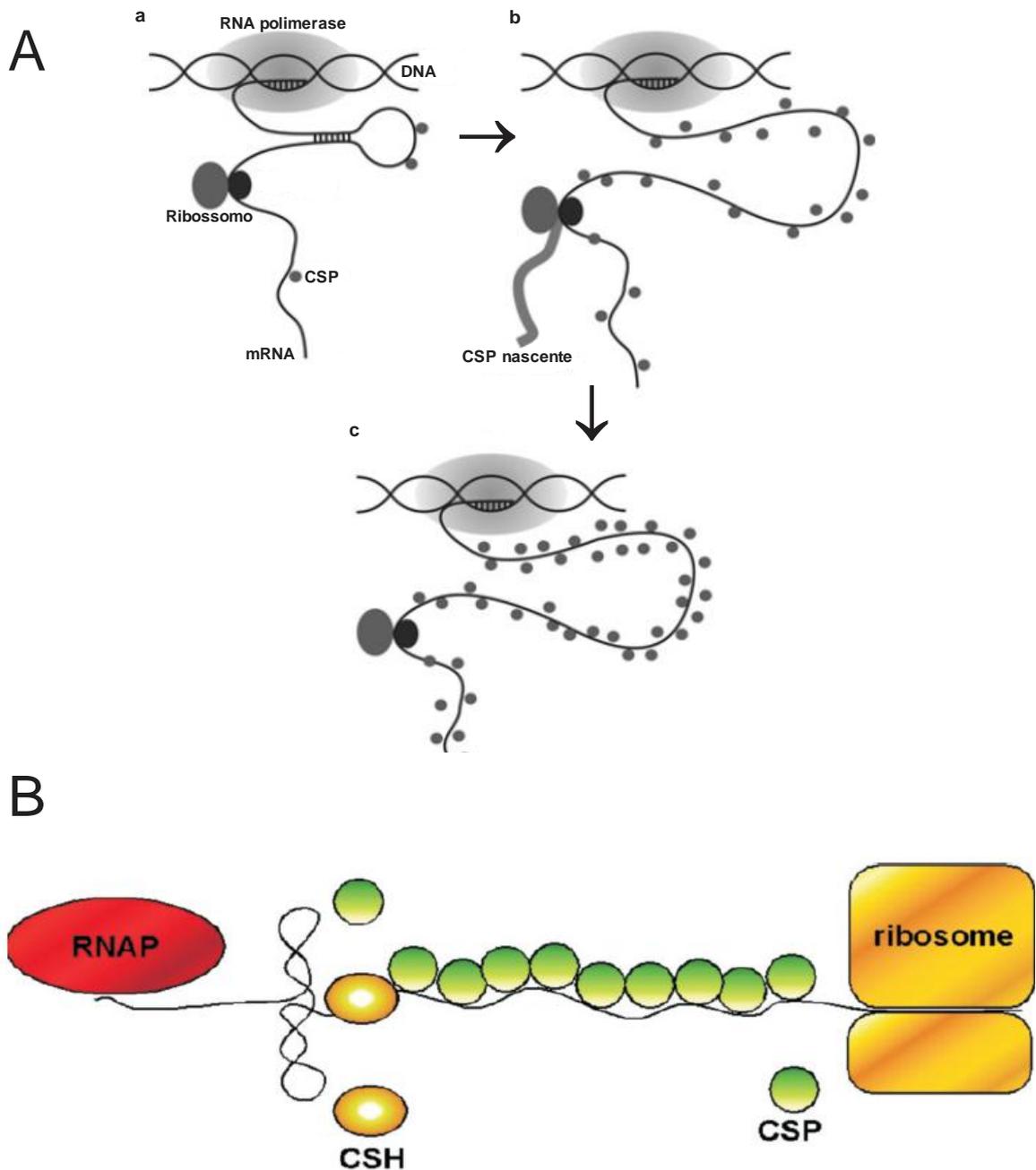


Figura 5. Ilustração esquemática do envolvimento das proteínas CSP e helicases DEAD na resposta ao frio. Após a queda brusca de temperatura proteínas de choque frio (A) são fortemente sintetizadas e associam-se aos mRNAs mantendo-os em conformação linear não estruturada. FONTE: Modificado de Horn et 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 grupos de estrutura secundária. FONTE: Hunger et al. (2006).

2 OBJETIVOS

Este trabalho de pesquisa tem como objetivos a caracterização da resposta de *Caulobacter crescentus* a baixas temperaturas e congelamento, bem como identificação de genes envolvidos nestes processos, além do estudo da regulação de genes codificantes para proteínas de choque frio. As estratégias utilizadas para alcançar estes objetivos foram as seguintes:

- a) Determinação do efeito da queda de temperatura e congelamento na sobrevivência e crescimento de *C. crescentus*
- b) Varredura de biblioteca de mutantes em busca de genes envolvidos na resistência ao congelamento
- c) Obtenção de linhagens mutantes para genes codificantes de proteínas de choque frio e análise da contribuição de cada gene na sobrevivência em baixas temperaturas
- d) Análise do perfil de expressão das quatro CSPs de *Caulobacter* em baixas temperaturas e fase estacionária de crescimento, nas linhagens NA1000 e mutantes.
- e) Estudo da regulação de *cspA* e *cspB* em resposta à queda de temperatura e fase estacionária
- f) Determinação das funções de CspA, CspB, CspC e CspD na célula.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens bacterianas e condições de crescimento

As linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho encontram-se listadas na tabela 1 e tabela 2.

As linhagens de *Caulobacter crescentus* foram cultivadas sob agitação a 30 °C, 15 °C, 10 °C ou 5°C em meio PYE (peptona 2 g/L; extrato de levedura 1 g/L; MgSO₄ 0,2 g/L; CaCl₂ 0,5 mM) ou meio mínimo M2-glicose (Na₂PO₄ 0,5 g/L; KH₂PO₄ 1,74 g/L; NH₄Cl 1,06 g/L; pH 6,9; Fe₂SO₄ 1 mM; glicose 20%; MgSO₄ 1 mM; CaCl₂ 0,5 mM) (ELY, 1991). Quando necessário, os meios de cultura foram suplementados com ácido nalidíxico (20 µg/mL), tetraciclina (1 µg/mL), espectinomicina (20 µg/mL), estreptomicina (0,5 µg/mL), canamicina (5 µg/mL) ou rifampicina (20 µg/mL).

As linhagens de *Escherichia coli* foram cultivadas a 37 °C em meio LB (triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; pH 7,5) ou 2 x TY (triptona 16 g/L; extrato de levedura 10 g/L; NaCl 5 g/L; pH 7,5). Quando necessário os meios de cultura foram suplementados com os antibióticos ampicilina (100 µg/mL), tetraciclina (12,5 µg/mL), canamicina (50 µg/mL), estreptomicina (5 µg/mL), espectinomicina (50 µg/mL) ou cloranfenicol (30 µg/mL).

Tabela 1 - Linhagens de *Escherichia coli* utilizadas neste trabalho.

| | Linhagens | Genótipo | Referência |
|-------------------------|-----------|---|------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i> | DH5α | <i>supE44 lacU169 (80 lacZ M15) hsdR 17 recA 1 endA 11 gyrA 96 thi-1 relA1</i> | HANAHAN, 1983 |
| | S17-1 | 294::RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7) | SIMON; PRIEFER; PUHLER, 1983 |
| | BX04 | <i>galk2 rpsL31 recB21 recC22 sbcB15 ΔcspA ΔcspB ΔcspE ΔcspG</i> | XIA; KE; INOUE, 2001 |
| | RL211 | F ⁻ <i>lacZ</i> λRL12 Δ(<i>recA-srI</i>)306 <i>srI-301::Tn10-84 tnaA2 trpR</i> | LANDICK; STEWART; LEE, 1990 |

Tabela 2 - Linhagens de *Caulobacter crescentus* utilizadas neste trabalho.

| | Linhagens | Genótipo | Referência |
|-------------------------------|-----------|--|--------------------------|
| <i>Caulobacter crescentus</i> | NA1000 | Linhagem sincronizável utilizada como padrão | EVINGER e AGABIAN, 1977 |
| | ΔA | NA1000 (ΔCC2903) | LANG e MARQUES, 2004 |
| | ΔB | NA1000 (ΔCC0665) | Este trabalho |
| | ΔC | NA1000 (ΔCC02623::ΩSpec ^r) | BALHESTEROS et al., 2010 |
| | ΔD | NA1000 (ΔCC1387) | LANG e MARQUES, 2004 |
| | ΔAB | ΔA (ΔCC0665) | BALHESTEROS et al., 2010 |
| | ΔAC | ΔC (ΔCC2903) | Este trabalho |
| | ΔAD | ΔD (ΔCC2903) | LANG, 2005 |
| | ΔBC | ΔC (ΔCC0665) | Este trabalho |
| | ΔBD | ΔD (ΔCC0665) | Este trabalho |
| | ΔCD | ΔC) (ΔCC1387) | BALHESTEROS et al., 2010 |
| | ΔABD | ΔAD (ΔCC0665::ΩSpec ^r) | BALHESTEROS et al., 2010 |

Nos experimentos foi utilizada a linhagem de *Caulobacter crescentus* NA1000 que teve seu genoma sequenciado recentemente (MARKS et al., 2010). Este trabalho foi desenvolvido quase em sua totalidade antes da conclusão do sequenciamento do genoma de NA1000, tomando como base o genoma sequenciado da linhagem não sincronizável CB15. Por isso, no decorrer da descrição dos resultados do presente trabalho, os genes serão referidos através do número de identificação dos genes em CB15. Todavia, segue abaixo na tabela 3 os produtos gênicos e os números identificadores das ORFs nos genomas das duas linhagens de *Caulobacter*.

Tabela 3 - Correspondência entre NA1000 e CB15 das ORF estudadas no presente trabalho.

| Produto gênico ^a | ORF CB15 | ORF NA1000 |
|-----------------------------------|----------|------------|
| CspB | CC0665 | CCNA_00701 |
| RhlE | CC0835 | CCNA_00878 |
| CspD | CC1387 | CCNA_01451 |
| CspC | CC2623 | CCNA_02705 |
| CspA | CC2903 | CCNA_02997 |
| Proteína com domínio AcrA (12-9F) | CC3196 | CCNA_03298 |
| AddA (12-9E) | CC3538 | CCNA_03650 |

^a Entre parênteses encontram-se os nomes dos clones da biblioteca de mutantes nos quais os referidos genes estão interrompidos pelo mini-Tn5

3.2 Oligonucleotídeos utilizados

A tabela 4 lista os oligonucleotídeos utilizados em todos os processos de amplificação, mutagênese e síntese de DNA utilizados neste trabalho.

Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

| Nome | Sequência (5'→3') ^a |
|--------------------|--|
| CSPA-B | ATAGGATCCGTCGTTCTCAGAACCATC |
| CSPA-R2 | AAAGCTTCATGGGGATGTTCCCTGTAGG |
| CSPA-R4 | TTTAAGCTTGACTTCGGGCTCGTACGAGATC |
| CSPA-R5 | AGGATCCACGGTATTTCTCTGATATCCCC |
| CSPA-R6 | AAAGAATTCATGGCGACTGAACCGTGAAG |
| CSPA-R7 | AAAGGATCCGTCGTGGACCTCCTGCGCG |
| CSPA-R8 | TTAAGCTTATTCGATAACAACATAAACAGG |
| qRTCSPAf | ATGGCGACTGGAACCGTGAAG |
| qRTCSPAr | GCGCTCAACGGCCGAGA |
| CSPB-A | ATAGGATCCCCTCACC GCGAGAC |
| CSPB-B | GAAAAGCTTCAAGGCCTCACGCTGCGC |
| CSPB-C | AAAAAGCTTGAACCACTTACGGTGCCG |
| CSPB-F | ATAGGATCCGCTCATTGCCGATGCTGG |
| CSPB-R1 | AGGATCCCCTGAAAATAAAACAATTGTGG |
| CSPB-R2 | AAAGCTTCATGTTGTATCTTTCAGATGTG |
| CSPB-R3 | AAAGCTTCATGTTGTATCTTTCAGATAAGAGCAAGCGTGGAGAGCGAC |
| CSPB-R4 | ATAAAGCTTCTCGTAGTTGAGCTTCTGACC |
| CSPB-R6 | AAAGAATTCATGGCTACCGGCACCGTAAAG |
| qRTCSPBf | TGCGGACGCGTTCGTCCATA |
| qRTCSPBr | GCGTTGGTCGCGTTCGAGCT |
| CSPCH137R-R | CGACGCCGAGATGCGCACGAACACATCG |
| RicLacFow | GTTTTACAACGTCGTGACTGG |
| RicLacRev | GATGGGCGCATCGTAACC |
| M13 FORWARD | GTAAAACGACGGCCAGT |
| M13 REVERSE | AGCGGATAACAATTCACACAG |
| LacZEXT1 | GGGTTTTCCAGTCACGACGTTGT |

^a Os nucleotídeos sublinhados representam sítios de reconhecimento por enzimas de restrição *EcoRI*, *BamHI* ou *HindIII* que foram adicionados aos oligonucleotídeos.

3.3 Plasmídeos e cosmídeos utilizados

Os plasmídeos e cosmídeos utilizados nas clonagens, ensaios de complementação, beta-galactosidase e antiterminação realizados durante o desenvolvimento deste trabalho encontram-se listados na tabela 5.

Tabela 5 - Plasmídeos e cosmídeos utilizados neste trabalho.

(Continua)

| Plasmídeos/Cosmídeos | Características | Fonte/referência |
|---|---|--------------------------|
| pGEM T-Easy | Vetor de clonagem, Ap ^r | Promega ^a |
| pNPTS138 | Replicon ColE1, <i>oriT</i> , <i>npt</i> (Km ^r), <i>sacB</i> | D. Alley |
| pNPTSΔ<i>cspB</i> | pNPTS138 contendo as regiões flanqueadoras de <i>cspB</i> ligadas | Este trabalho |
| pNPTSΔ<i>cspB</i>::ΩSpec^r | pNPTS138 contendo as regiões flanqueadoras de <i>cspB</i> intercaladas pelo cassete de resistência a espectinomicina/estreptomicina | Este trabalho |
| PHP45Ω | Derivado do pBR322, Ap ^r , cassete Ω Spec (Sm ^r /Sp ^r) | PRENTKI e KRISCH, 1984 |
| Cosmídeo 2G7 | Cosmídeo carregando um fragmento do genoma de <i>C. crescentus</i> onde se encontra o gene CC3538 | ALLEY et al., 1991 |
| Cosmídeo 2F2 | Cosmídeo carregando um fragmento do genoma de <i>C. crescentus</i> onde se encontra o gene CC3196 | ALLEY et al., 1991 |
| Cosmídeo 1D5 | Cosmídeo carregando um fragmento do genoma de <i>C. crescentus</i> onde se encontra o gene CC0835 | ALLEY et al., 1991 |
| pMR20 | Vetor de clonagem, replicon IncP1, Tc ^r , mobilizável | ROBERTS et al., 1996 |
| pMR20<i>cspA</i> | Vetor pMR20 carregando uma cópia selvagem do gene <i>cspA</i> | Este trabalho |
| pMR20<i>cspAcspB</i> | Vetor pMR20 carregando uma cópia selvagem do gene <i>cspA</i> e <i>cspB</i> | Este trabalho |
| pMR20<i>cspC</i> | Vetor pMR20 carregando uma cópia selvagem do gene <i>cspC</i> | BALHESTEROS et al., 2010 |
| pMR20<i>cspD</i> | Vetor pMR20 carregando uma cópia selvagem do gene <i>cspD</i> | BALHESTEROS et al., 2010 |
| pMR20<i>cspCcspD</i> | Vetor pMR20 carregando uma cópia selvagem do gene <i>cspC</i> e <i>cspD</i> | BALHESTEROS et al., 2010 |
| pRK<i>lacZ</i>290 | Vetor de fusão de transcrição com o gene repórter <i>lacZ</i> , Tc ^r , replicon IncP1, <i>oriT</i> | GOBER e SHAPIRO, 1992 |
| pRK<i>lacZ</i>-BR4(P<i>cspA</i>) | Vetor pRK <i>lacZ</i> 290 carregando a região promotora de <i>cspA</i> , 5'-UTR e parte da região codificante. | LANG e MARQUES, 2004 |
| pRK<i>lacZ</i>-FR4 (P<i>cspB</i>) | Vetor pRK <i>lacZ</i> 290 carregando a região promotora de <i>cspB</i> , 5'-UTR e parte da região codificante. | LANG e MARQUES, 2004 |
| pRK<i>lacZ</i>-P<i>cspC</i> | Vetor pRK <i>lacZ</i> 290 carregando a região promotora de <i>cspC</i> , 5'-UTR e parte da região codificante. | LANG e MARQUES, 2004 |
| pRK<i>lacZ</i>-P<i>cspD</i> | Vetor pRK <i>lacZ</i> 290 carregando a região promotora de <i>cspD</i> , 5'-UTR e parte da região codificante. | LANG e MARQUES, 2004 |
| pRK<i>lacZ</i>-R1C | Vetor pRK <i>lacZ</i> 290 carregando parte da região promotora de <i>cspB</i> , 5'-UTR inteiro e parte da região codificante. | Este trabalho |

Tabela 5 - Plasmídeos e cosmídeos utilizados neste trabalho.

(Continuação)

| Plasmídeos/Cosmídeos | Características | Fonte/referência |
|-------------------------|---|------------------|
| pRKlacZ-R5R4 | Vetor pRKlacZ290 carregando parte da região promotora de <i>cspA</i> , 5'-UTR inteiro e parte da região codificante. | Este trabalho |
| pRKlacZ-BR8 | Vetor pRKlacZ290 a região promotora de <i>cspA</i> sem a região 5'-UTR. | Este trabalho |
| pJBZ281 | Vetor de fusão de tradução com gene repórter <i>lacZ</i> , Km ^r , replicon ColE1 | M. R. K. Alley |
| pJBZ-FR4 | Vetor pJBZ281 carregando a região promotora de <i>cspB</i> , 5'-UTR e parte da região codificante. | Este trabalho |
| pJBZ-FR3 | Vetor pJBZ281 carregando a região promotora de <i>cspB</i> , 5'-UTR com porção deletada e parte da região codificante. | Este trabalho |
| pJBZ-AR2 | Vetor pJBZ281 carregando a região promotora de <i>cspB</i> e 5'-UTR. | Este trabalho |
| pJBZ-BR2 | Vetor pJBZ281 carregando a região promotora de <i>cspA</i> e 5'-UTR. | Este trabalho |
| pJBZ-BR4 | Vetor pJBZ281 carregando a região promotora de <i>cspA</i> , 5'-UTR e parte da região codificante. | Este trabalho |
| pINIII | Vetor de expressão derivado do pBR322, Ap ^r , com promotor induzível por IPTG utilizado para expressão heteróloga. | INOUE, 1983 |
| pINIIIcspA | Vetor pINIII carregando a região codificante de <i>cspA</i> | Este trabalho |
| pINIIIcspB | Vetor pINIII carregando a região codificante de <i>cspB</i> | Este trabalho |
| pINIIIcspC | Vetor pINIII carregando a região codificante de <i>cspC</i> | Este trabalho |
| pINIIIcspD | Vetor pINIII carregando a região codificante de <i>cspC</i> | Este trabalho |
| pINIIIcspA-H30R | Vetor pINIII carregando a região codificante de <i>cspA</i> com troca de base mudando o códon 30 de His para Arg | Este trabalho |
| pINIIIcspB-H30R | Vetor pINIII carregando a região codificante de <i>cspB</i> com troca de base mudando o códon 30 de His para Arg | Este trabalho |
| pINIIIcspC-H30R | Vetor pINIII carregando a região codificante de <i>cspC</i> com troca de base mudando o códon 30 de His para Arg | Este trabalho |
| pINIIIcspC-H137R | Vetor pINIII carregando a região codificante de <i>cspC</i> com troca de base mudando o códon 137 de His para Arg | Este trabalho |

(Continua)

Tabela 5 - Plasmídeos e cosmídeos utilizados neste trabalho.

(Conclusão)

| Plasmídeos/Cosmídeos | Características | Fonte/referência |
|---|---|-----------------------------------|
| pINIII$cspC$-H30R/H130R | Vetor pINIII carregando a região codificante de $cspC$ com trocas de bases mudando os códons 30 e 137 de His para Arg | Este trabalho |
| pINIII$cspE$ | Vetor pINIII carregando a região codificante de $cspE$ de <i>E. coli</i> | PHADTARE; INOUYE; SEVERINOV, 2002 |
| pINIII$cspE$-H32R | Vetor pINIII carregando a região codificante de $cspE$ de <i>E. coli</i> , com troca de base mudando o códon 32 de His para Arg | PHADTARE; INOUYE; SEVERINOV, 2002 |

^a Promega Co., Madison, WI, E.U.A.

3.4 Experimentos de análise fenotípica

3.4.1 Ensaio de sobrevivência em baixas temperaturas

Culturas de *Caulobacter crescentus* NA1000 foram incubadas por 16 horas até atingirem a fase estacionária, quando então foram diluídas para a densidade óptica (DO₆₀₀) de 0,05. Assim que as culturas atingiram uma densidade óptica de 0,2 estas foram mantidas na temperatura ótima de crescimento (30 °C) ou então transferidas para diferentes temperaturas como 15 °C e 10 °C. Após 2, 4, 6, 8, 12, 24 e 28 horas de incubação em cada uma das temperaturas acima mencionadas, alíquotas das culturas foram retiradas e semeadas em placas de PYE para a determinação das unidades formadoras de colônia (UFC). Para tanto, foram realizadas diluições seriadas de modo a permitir a contagem de UFCs individualizadas. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas até que fosse possível visualizar colônias. Os ensaios foram realizados em duplicatas técnicas e repetidos três vezes com culturas distintas. O cálculo das sobrevivências relativas foi realizado dividindo-se o número de UFCs obtidos em cada ponto após a incubação nas diferentes temperaturas pelo número de UFC obtido no ponto inicial das curvas de viabilidade. Os valores foram então expressos em porcentagem.

3.4.2 Ensaio de sobrevivência a congelamento

A determinação da resistência de *C. crescentus* ao congelamento nas diferentes fases de crescimento foi realizada com culturas NA1000 no meio da fase exponencial de crescimento (densidade óptica das culturas em torno de 0,5), após

24 horas e 7 dias de incubação (fase estacionária precoce e tardia, respectivamente).

A sensibilidade dos clones da biblioteca de mutantes construída por Braz e Marques (2005) e dos mutantes de genes codificantes para proteínas de choque frio em *C. crescentus* foi determinada através de ensaios de viabilidade com contagem de UFCs. Os clones da biblioteca foram plaqueados em placas de PYE contendo canamicina com auxílio de uma ferramenta de 48 pinos. As placas de 96 poços contendo os clones foram congeladas a -20 °C e -80 °C por 24 horas, quando então foram incubadas a 30 °C até que descongelassem por completo. Novamente com auxílio da ferramenta de 48 pinos os clones foram plaqueados em nova placa de PYE contendo canamicina. A sobrevivência foi estimada comparando-se a massa de células obtidas no plaqueamento das culturas antes e após o congelamento. Nesta primeira varredura, a sobrevivência dos mutantes foi analisada de maneira qualitativa e, os clones que apresentaram menor massa de células após o congelamento foram avaliados de forma quantitativa através de diluições seriadas. Os clones que apresentaram sobrevivências na ordem de 10% da apresentada pela linhagem selvagem a -80 °C foram selecionados para a identificação dos genes interrompidos.

A linhagem de *Caulobacter crescentus* NA1000 e as linhagens mutantes $\Delta cspA$, $\Delta cspB$, $\Delta cspC::\Omega Spec^r$, $\Delta cspD$, $\Delta cspA\Delta cspB$, $\Delta cspA\Delta cspC::\Omega Spec^r$, $\Delta cspA\Delta cspD$, $\Delta cspB\Delta cspC::\Omega Spec^r$, $\Delta cspB\Delta cspD$, $\Delta cspC::\Omega Spec^r\Delta cspD$, $\Delta cspA\Delta cspB::\Omega Spec^r\Delta cspD$, 30-10H, 12-9E e 12-9F foram incubadas até atingirem uma densidade óptica (DO 600 nm) de 0,05, quando uma alíquota foi tomada para a determinação das UFCs enquanto, outras duas alíquotas de 100 μ L foram congeladas a -20 °C e -80 °C. Após 24 horas de congelamento em ambas as temperaturas, as alíquotas foram retiradas dos congeladores e incubadas a 30 °C até que descongelassem por completo, quando então eram semeadas em placas de PYE para a determinação das UFCs remanescentes. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas até que fosse possível visualizar colônias. A sobrevivência relativa foi obtida dividindo o número de UFCs após o congelamento pelas UFCs apresentadas antes do processo.

3.4.3 Ensaio de aquisição de criotolerância

Os ensaios de aquisição de criotolerância foram realizados com culturas de *C. crescentus* NA1000 no meio da fase exponencial de crescimento (densidade

óptica das culturas em torno de 0,5). A cultura foi dividida em quatro partes, sendo que cada parte foi incubada a uma temperatura: 30 °C, 20 °C, 15°C e 5°C. Após 2 e 6 horas de incubação em cada temperatura, alíquotas foram tomadas para diluição seriada e determinação de UFCs e imediatamente, 100 µL das culturas foram congelados a -20 °C. Após 24 h de congelamento, as alíquotas foram retiradas do congelador e incubadas a 30 °C até que descongelassem por completo, quando então eram semeadas em placas de PYE para a determinação das UFCs remanescentes. As placas foram incubadas a 30 °C por 48 horas até que fosse possível visualizar colônias. A sobrevivência relativa foi obtida dividindo o número de UFCs após o congelamento pelas UFCs apresentadas antes do processo.

3.4.4 Ensaio de sobrevivência a ciclos de congelamento e descongelamento

Culturas de *Caulobacter crescentus* NA1000 foram incubadas até atingirem uma densidade óptica de 0,5, quando uma alíquota foi tomada para a determinação das UFCs enquanto, outras alíquotas de 100 µL foram congeladas a -20 °C e -80 °C. Após 24 horas de congelamento em ambas as temperaturas, as alíquotas foram retiradas dos congeladores e incubadas a 30 °C até que descongelassem por completo, foram semeadas em placas de PYE para a determinação das UFCs remanescentes. O remanescente destas alíquotas foi congelado imediatamente na mesma temperatura anterior. Foram realizados quatro ciclos de congelamento/descongelamento em duplicatas técnicas. Três culturas distintas foram utilizadas neste ensaio de modo a permitir a obtenção de médias e desvio padrão.

3.4.5 Ensaio de sobrevivência ao longo da fase estacionária

A fim de determinar a sobrevivência das linhagens mutantes $\Delta cspA\Delta cspB$, $\Delta cspC::\Omega Spec^r$, $\Delta cspD$ e $\Delta cspC::\Omega Spec^r\Delta cspD$ e $\Delta cspA\Delta cspB::\Omega Spec^r\Delta cspD$ comparadas à linhagem selvagem NA1000, culturas foram incubadas durante 16 horas, quando então foram diluídas para uma densidade óptica de 0,1. Assim que as culturas atingiram uma densidade óptica de 0,5 no meio da fase exponencial de crescimento e após 24, 48, 72 e 96 horas de entrada na fase estacionária, bem como após 7 e 14 dias nesta fase, alíquotas foram retiradas para a tomada das UFCs. Através de diluições seriadas e semeadura em placas de PYE, que foram

incubadas posteriormente por 48 horas a 30 °C, foi obtida uma curva de viabilidade ao longo da fase estacionária precoce e tardia.

3.4.6 Microscopia de fluorescência com coloração LIVE/DEAD

As culturas de NA1000, $\Delta cspA\Delta cspB$, $\Delta cspC::\Omega Spec^r$, $\Delta cspD$ e $\Delta cspC::\Omega Spec^r\Delta cspD$ foram inoculadas em meio PYE a 30 °C por 16 horas e posteriormente diluídas para uma DO_{600nm} de 0,1. Assim que as culturas atingiram a densidade óptica de 0,5 uma alíquota foi retirada para a preparação de lâminas e observação das morfologias em fase exponencial de crescimento. As culturas permaneceram incubadas até a entrada na fase estacionária, quando as demais alíquotas foram tomadas para a preparação das lâminas desta fase. As células foram observadas ao microscópio óptico, coradas utilizando o kit de coloração de células vivas e mortas (*LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability*, Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil) que consiste em dois corantes de DNA, sendo um vermelho (iodeto de propídeo) que é barrado por membranas celulares, entrando apenas em células cuja integridade das membranas esteja comprometida, e o outro verde (SYTO-9) que atravessa facilmente as membranas celulares intactas.

Para a coloração, as culturas foram diluídas em meio de cultura fresco na proporção 1:1 em volume final de 500 μ L e adicionado 1,5 μ L da mistura dos corantes também na proporção 1:1. As culturas foram incubadas com os corantes por 15 minutos e, então, 4 μ L foram colocados entre lamínula e um tapete de agarose 1%, 1 X PBS. As lâminas foram visualizadas em microscópio invertido Nikon TE300 (Nikon Instruments, Inc., Melville, NY, E.U.A.), no qual o corante SYTO 9 da coloração LIVE/DEAD e o corante de membrana FM1-43 FX foram detectados usando o filtro FITC com objetivas de aumento de 40 X. As imagens foram capturadas usando uma câmera Roper CoolSnap HQ (Roper Scientific Germany, Ottobrunn, Bayern, Alemanha) com tempo de abertura de 0,5 segundos. As imagens foram processadas e analisadas utilizando-se os MetaMorph (MetaMorph versão 7.1, Universal Imaging Co., Downingtown, PA, E.U.A.) e a contagem das células foi feita utilizando o programa ImageJ (*ImageJ 1.44p*, Wayne Rasband National Institutes of Health, E.U.A.).

3.4.7 Curvas de crescimento

A determinação do perfil de crescimento das culturas em temperatura ótima de crescimento ou ainda, após a incubação em baixas temperaturas foi realizada a partir do monitoramento da densidade óptica das culturas, obtida através da absorbância a 600 nm medida através de espectrofotômetro. Aliquotas de 1 mL foram retiradas das culturas ao longo do crescimento nas diferentes condições de incubação e utilizadas para a tomada da absorbância.

3.4.8 Ensaio de complementação heteróloga

O ensaio de complementação heteróloga foi realizado com a linhagem de *E. coli* BX04 carregando o plasmídeo pINIII vazio ou contendo os genes codificantes para as CSPs de *C. crescentus* selvagens ou mutadas destes genes gerando os produtos CspA_{H30R}, CspB_{H30R}, CspC_{H30R}, CspC_{H137R} e CspC_{H30R/H137R}.

A linhagem BX04 produzida por Xia et al. (2001) é incapaz de formar colônias quando incubada a 15 °C. Esta linhagem foi transformada com cada uma das construções (mutantes e selvagens), bem como com o plasmídeo vazio, além do plasmídeo pINIII carregando um gene *csp* endógeno (*cspE* e mutante que gera CspE_{H32R}) desta espécie. As culturas foram inoculadas em meio LB suplementado com ampicilina (50 µg/mL) e quando estas atingiram a DO_{600nm} 1,0, 1 µL da cultura foi semeado em placas de LB ágar (contendo ampicilina adicionando-se ou não 1 mM de IPTG). As placas foram incubadas a 15 °C por 96 horas quando então o crescimento foi analisado.

3.4.9 Ensaio de determinação de atividade antiterminadora *in vivo*

Culturas de *E. coli* RL211 recém-transformadas (menos de dois dias) carregando o plasmídeo pINIII vazio ou com os genes codificantes para as CSPs de *C. crescentus* foram inoculadas em meio LB suplementado com ampicilina. Ao atingir a densidade óptica de 1, 3 µL das culturas foram semeados em placas de meio LB ágar contendo somente ampicilina, ampicilina e cloranfenicol ou ainda, ampicilina, cloranfenicol e IPTG (1 mM). As placas foram então incubadas por 48 horas a 37 °C quando o crescimento das culturas foi analisado.

3.5 Estudos de expressão gênica

3.5.1 Extração de RNA total em *C. crescentus* e síntese de cDNAs

A fim de extrair RNA das células de *Caulobacter* para determinar o perfil de decaimento de mRNA específicos, culturas foram crescidas até atingirem o meio da fase exponencial de crescimento quando então foram divididas em duas partes. A primeira parte foi incubada a 10 °C por 2 horas enquanto a segunda parte permaneceu incubada a 30 °C. A cada uma das partes foi adicionado o antibiótico rifampicina (20 µg/mL) de modo a inibir a síntese de RNAs e a cada 5 minutos 10 mL da cultura eram centrifugados e após a centrifugação o meio de cultura descartado e o precipitado mantido em gelo seco.

Os precipitados de células, após o descarte do meio de cultura, foram lisados em 1 mL de Trizol (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Os tubos foram incubados a 65 °C por 10 minutos e em seguida foram adicionados 50 µL de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada invertendo os tubos por 15 segundos, incubada a temperatura ambiente por 5 minutos sendo em seguida centrifugada por 15 minutos a 12000 x g. A fase aquosa contendo o RNA foi coletado e precipitado com 0,5 mL de isopropanol por 1 hora a -80 °C. Os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 20 minutos a 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em etanol 75%. O precipitado foi seco por 30 a 60 minutos a temperatura ambiente, solubilizado por 10 minutos a 60 °C em 200 µL de água MilliQ tratada com DEPC e armazenado a -80 °C. O rendimento foi de cerca de 100 µg de RNA para cada 10 mL de cultura.

A concentração foi estimada por medida da absorbância a 260 nm e sua integridade foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão desnaturante (MOPS 1 X, formaldeído 6,5%). As amostras foram aplicadas no gel e a corrida foi feita em MOPS 1 X a 100 V por 1 hora.

Os RNAs extraídos (5 µg) foram tratados com 5 U de DNase I (Fermentas, *Thermo Scientific Inc.*, MD, E.U.A.) em tampão próprio fornecido pelo fabricante, juntamente com 20 U de inibidor de RNase (*RNase OUT*, Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil) a 37 °C por 40 minutos. Após o tratamento a DNase I foi inativada incubando os RNAs tratados a 65 °C com 2,5 µL de EDTA 25 mM por 10 minutos.

Os RNAs livre de contaminação por DNA foram utilizados como molde nas reações de transcrição reversa fazendo-se uso do *kit SuperScript III First-Strand*

Synthesis System for RT-PCR (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil). A etapa de desnaturação foi feita aquecendo 5 µg dos RNAs livres de contaminação por DNA, 50 ng de oligonucleotídeos randômicos e 10 mM da mistura dos dNTPs em 10 µL finais por 5 minutos a 65 °C. Na sequência as reações foram resfriadas a 4 °C por 1 minuto e a transcrição reversa foi realizada acrescentando ao RNA 10 µL da mistura de 2 X do tampão apropriado, 10 mM de MgCl₂, 20 mM de DTT, 40 U de *RNase OUT* e 200 U de *SuperScript III*. As reações foram incubadas a 25 °C por 10 minutos e a síntese dos cDNAs foi feita a 50 °C por 50 minutos. Então, a transcriptase reversa foi inativada a 85 °C por 5 minutos e a remoção do molde de RNA ocorreu com a adição de 2 U de RNase H e incubação por 20 minutos a 37 °C.

Para verificar a eficiência da síntese dos cDNAs e confirmar a presença do cDNA específico foram feitas reações de PCR utilizando 250 ng de cada um dos 6 cDNAs, 0,2 µM de oligonucleotídeo; 0,2 mM de cada dNTP; 3,0 mM MgCl₂; 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil) e 1 X tampão PCR fornecido pelo fabricante. As reações foram aplicadas em gel de agarose 1,5% para o isolamento dos fragmentos de DNA resultantes da amplificação em tampão TBE (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8). Em seguir os fragmentos foram corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e a visualização foi feita sob iluminação UV.

3.5.2 Ensaio de determinação de meia-vida de mRNA por RT-PCR semi-quantitativo

Após a síntese dos cDNAs e averiguação da eficiência de síntese, estes foram quantificados fazendo-se uso do espectrofotômetro NanoDrop (*Thermo Scientific Inc.*, MD, E.U.A.) e 1 µg de cada cDNA foi utilizado como molde em reações de PCR. Nas reações em cadeia da polimerase utilizando cDNAs advindos de mRNAs de culturas incubadas a 10 °C, apenas 15 ciclos de amplificação foram utilizados, enquanto, reações com cDNAs advindos de mRNAs de culturas incubadas a 30 °C ocorreram por 22 ciclos. Todas as reações de PCR foram realizadas com 0,2 µM de oligonucleotídeos; 0,2 mM de cada dNTP; 3,0 mM MgCl₂; 10x DMSO; 2,5 U de Taq DNA Polimerase (*Fermentas, Thermo Scientific Inc.*, MD, E.U.A.) e 1 X tampão PCR fornecido pelo fabricante. As condições do PCR foram de 94 °C por 5 minutos, seguidos por ciclos de 94 °C por 15 segundos, 60 °C por 30 segundos e 72 °C por 20 segundos. Após os ciclos foi mantida a 4 °C.

As reações foram aplicadas em gel de agarose 1,5% para o isolamento dos fragmentos de DNA resultantes da amplificação em tampão TBE (Tris 89 mM; ácido

bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8). Em seguir os fragmentos foram corados com brometo de etídeo (0,5 µg/mL) e a visualização foi feita sob iluminação UV. A imagem foi captada por câmera digital e utilizada para a determinação da intensidade das bandas por meio de utilização do programa ImageJ (*ImageJ 1.44p*, Wayne Rasband National Institutes of Health, E.U.A.). Tendo os valores de densidade extraídos com o programa, as densidades das bandas de cada ponto após a adição de rifampicina foram divididas pela densidade da banda no ponto inicial da curva de decaimento a fim de obterem-se quantidades relativas.

3.5.3 Ensaio de determinação de meia-vida de mRNA por RT-PCR quantitativo em tempo real

Após a síntese dos cDNAs e averiguação da eficiência de síntese, estes foram quantificados fazendo-se uso do espectrofotômetro NanoDrop (*Thermo Scientific Inc.*, MD, E.U.A.) e 50 ng de cada cDNA foram utilizados como molde nas reações de PCR em tempo real, que ocorreu utilizando-se o kit *Platinum SYBR Green qPCR SuperMix UDG* (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Os nucleotídeos utilizados na determinação da meia-vida dos mRNAs foram qRTCSPAf e qRTCSPAr (*cspA*) e qRTCSPBf e qRTCSPBr (*cspB*). Nas reações foram utilizados 0,1 µM de cada oligonucleotídeos, 12,5 µL do Sybergreen Mix (SYBR Green I; 60 U/mL de HotStar Platinum Taq DNA Polimerase; 400 µM de cada desoxinucleotídeo; 40 mM de Tris-HCl pH 8,4; 100 mM KCl; 6 mM de MgCl₂; 40 U/mL UDG e estabilizantes) além de 0,5 µL de corante de referência ROX em um volume final de reação de 25 µL. Após 2 minutos a 50 °C necessária para a ativação da Uracil-N-glicosilase (UDG), a reação foi mantida por outros 2 minutos a 95 °C para a ativação da Taq polimerase. A reação de PCR ocorreu por 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. Durante o passo de extensão, que neste caso é concomitante ao de anelamento, a fluorescência é medida e, para normalizar a emissão entre as reações, o corante de referência ROX foi utilizado. Curvas de dissociação foram executadas de modo a confirmar a ausência de dímeros e produtos inespecíficos. A análise do PCR em tempo real foi realizada pelo programa 7500 System SDS Software V 1.2.2. (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil).

3.5.4 Ensaio de atividade de beta-galactosidase

No ensaio de atividade de β -galactosidase, descrito por Miller (1972), o padrão de expressão do promotor em estudo é determinado através do padrão de expressão da β -galactosidase que reflete a transcrição do gene *lacZ* pelo promotor clonado à sua frente. Para tanto, as células foram inoculadas em meio PYE contendo o antibiótico adequado quando necessário e incubadas a 30 °C sob agitação até chegarem em D.O. 0,5, quando o experimento foi iniciado. Nos casos em que a expressão em baixas temperaturas estava sendo analisada, após a tomada das unidades Miller obtidas da cultura em D.O. 0,5 a 30 °C, esta foi transferida para 10 °C para a continuidade do experimento. Nos casos em que a expressão em fase estacionária foi o alvo de estudo, este ponto em D.O. 0,5 foi referente à fase exponencial de crescimento e as demais medidas foram tomadas após 24 ou 48 horas em fase estacionária.

Assim, alíquotas foram retiradas a cada intervalo de tempo para medir a densidade óptica e para o ensaio de β -galactosidase. Foram aplicados 200 μ L de cultura em uma mistura contendo 800 μ L de tampão Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60 mM; $\text{NaHPO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mM; KCl 10 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM; β -mercaptoetanol 50 mM) e 100 μ L de clorofórmio e incubados a 30 °C por 5 minutos. Então 200 μ L de ONPG (O-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo 4 mg/mL em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0) foram adicionados à mistura e incubados a 30 °C por mais 5 minutos. A reação foi então parada com a adição de 400 μ L de uma solução de CaCO_3 1M. A densidade óptica foi então medida a 420 nm. Quando possível, como controle negativo foi utilizada uma cultura da linhagem NA1000 contendo somente o pRK*lacZ*290 sem promotor. O experimento foi realizado em duplicata técnica e triplicata biológica. As unidades de atividade de β -galactosidase foram calculadas de acordo com a fórmula a seguir, onde (T) é tempo de incubação em minutos, (V) é o volume da cultura adicionado em mL e (n) o número de replicatas técnicas:

$$Unidades = 1000 \times \left[\frac{\left(\frac{\sum A_{420}}{n} \right)}{V \times T \times A_{600}} \right] \quad (1)$$

As fusões transcricionais foram obtidas clonando-se as regiões promotoras dos genes em estudo no vetor pRK*lacZ*290, enquanto que as fusões traducionais fizeram uso do plasmídeo pJBZ281, no qual os fragmentos foram clonados em fase com o gene *lacZ*.

3.6 Obtenção de linhagens mutantes de *C. crescentus*

3.6.1 Extração de DNA cromossomal de *C. crescentus*

A metodologia de extração do DNA cromossomal das células de *Caulobacter* foi baseada no protocolo descrito por Chen e Kuo (1993). Culturas de *Caulobacter* foram incubadas meio PYE a 30 °C por 16 horas com agitação constante de 200 rpm. Foram transferidos 1,5 mL da cultura para um tubo, que foi centrifugado por 3 minutos a 12.000 x g. As células foram ressuspendidas em 200 µL de tampão de lise (Tris-acetato 40 mM pH 7,8; acetato de sódio 20 mM; EDTA 1 mM; SDS 1%) e pipetadas vigorosamente. Em seguida 66 µL de uma solução de NaCl 5 M foram adicionados, a mistura foi vigorosamente agitada até a mistura ficar viscosa e então, foi centrifugada a 4 °C por 10 minutos a 12000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, ao qual foi adicionado um volume igual de uma mistura de fenol e clorofórmio (1:1). Os tubos contendo a mistura foram invertidos gentilmente, até que a mistura ficasse leitosa e sem apresentar separação de fases, quando então foi centrifugada por 3 minutos a 12000 x g. A fase do sobrenadante foi transferida para outro tubo, ao qual foi adicionado o dobro do volume de etanol, e centrifugado por 10 minutos a 12000 x g. O DNA cromossomal foi lavado com etanol 70% por duas vezes, seco e ressuspendido em 50 µL de TE.

3.6.2 Reações de PCR para amplificação das regiões flanqueadoras de *cspB*

Todas as reações de PCR foram realizadas com 0,5 µl de DNA genômico desnaturado, 50 pmol de cada oligonucleotídeo; 0,2 mM de uma mistura de dNTPs (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil); 1,25 U de Platinum Pfx DNA Polimerase (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil); MgSO₄ 3 mM; 1 X de Enhancer e 1 X tampão PCR fornecidos pelo fabricante. As condições do PCR foram de 94 °C por 3 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94 °C por 15 segundos, 60 °C por 30 segundos e 68 °C por 1 minuto. Após os 30 ciclos a reação permaneceu a 68 °C por 7 minutos e foi mantida a 4 °C. Alíquotas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da amplificação. As reações foram purificadas com o kit de limpeza de produtos de PCR (*QIAquick*® QIAGEN Inc., CA, USA). Após serem purificadas, as reações foram submetidas à adição de um nucleotídeo de adenosina nas extremidades (*A-Tailing*).

As reações de adição de nucleotídeos de adenosina (*A-Tailing*) foram realizadas com 5 µl das reações de PCR, dATP 0,2 mM (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil); 5 U de Taq DNA Polimerase (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil); MgCl₂ 1,5 mM e 1X tampão PCR fornecido pelo fabricante. As reações permaneceram a 70 °C por 30 minutos e foram mantidas a 4 °C.

Os fragmentos de PCR com nucleotídeos de adenosina nas extremidades 3' obtidos foram ligados em um vetor de clonagem (*pGEM-T Easy*, Promega Co., Madison, WI, E.U.A.) conforme instruções do fabricante, transformados em *E. coli* DH5α e confirmados por sequenciamento de DNA.

3.6.3 Sequenciamento de DNA

Para realizar o sequenciamento dos clones contendo os fragmentos os fragmentos desejados clonados no vetor de clonagem *pGEM-T Easy* foi feita a extração do DNA plasmidial através do kit de extração de plasmídeos (*Wizard*® *Plus SV Minipreps Kit*, Co., Madison, WI, E.U.A.) e foi utilizado o kit de sequenciamento *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil).

Aproximadamente 1 µg DNA plasmidial foi transferido para um tubo contendo os iniciadores M13 FORWARD ou M13 REVERSE 3,2 µM, 2 µl do tampão 5x, além de 1 µL da mistura apropriada do *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*

(Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil). O volume foi completado com H₂O MilliQ para 10 µL. A mistura foi submetida a seguinte reação de PCR: 95 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 52 °C por 20 segundos e 60 °C por 4 minutos. Ao final a temperatura foi mantida 4°C. Para precipitar as reações foram adicionados 50 µl de uma solução de isopropanol 75% aos 10 µl de reação. Esta mistura foi homogeneizada e mantida a temperatura ambiente por 10 minutos, e em seguida os tubos foram centrifugados por 20 minutos a 12.000 rpm sob temperatura de 20 °C. Após a precipitação, as reações foram lavadas com uma solução de etanol 70% por duas vezes e o DNA foi seco a 37 °C por 30 minutos. As amostras foram ressuspensas em 2,5 µL de tampão apropriado, tendo sido deixadas neste tampão por 2 horas em temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C, sendo então desnaturadas por calor para serem aplicadas no sistema de sequenciamento *ABI-3100 DNA sequencer* (Life Technologies Brasil, São Paulo, SP, Brasil) do serviço de sequenciamento do Departamento de Bioquímica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

3.6.4 Reações de ligação de DNA

As ligações de DNA foram realizadas utilizando-se uma proporção de 3 partes de fragmento para cada parte de vetor (em massa), usando 1 - 1,5 U de T4 DNA ligase em tampão apropriado, perfazendo o volume final de 25 µL. As ligações foram realizadas por 16 horas a temperatura ambiente.

3.6.5 Extrações plasmidiais

Colônias brancas (quando os plasmídeos possuíam a ferramenta de seleção por alfa-complementação) eram retiradas das placas e inoculadas em meio LB suplementado com o antibiótico apropriado (ao qual o gene apropriado do plasmídeo conferisse resistência) e as culturas incubadas por 16 horas a 37 °C. Quando as culturas tornavam-se bastante turvas, 1,5 mL eram transferidos para tubos de microcentrífuga, e centrifugados por 3 minutos a 12000 x g, a fim de precipitar as células e descartar o meio de cultura. As extrações de plasmídeos destinados ao sequenciamento foram realizados fazendo-se do kit de extração de plasmídeos *PureYield™ Plasmid Miniprep System* (Promega Co., Madison, WI, E.U.A.). Todas as extrações de DNA plasmidial dos processos de clonagem foram realizados pelo método de lise alcalina como descrito por Ausubel et al. (1995). Os

precipitados foram secos em temperatura ambiente e ressuspensos em 50 μ L de TE contendo 50 μ g/mL de RNase A.

3.6.6 Obtenção e transformação de células eletrocompetentes

Culturas de *Escherichia coli* e de *Caulobacter crescentus* NA1000 em fase exponencial de crescimento foram resfriadas a 4 °C por 15 minutos. Após o resfriamento das culturas, estas foram centrifugadas a 4 °C por 20 minutos a 5000 x g. Após esta primeira centrifugação o meio de cultura foi desprezado e as culturas foram lavadas com água destilada gelada e novamente centrifugadas. Este processo foi repetido uma vez para células de *C. crescentus* e três vezes para as células de *Escherichia coli*. Em seguida, as culturas foram lavadas uma vez com uma solução gelada de glicerol 10%, centrifugadas e o precipitado ressuspensado em glicerol 10% gelado (volume proporcional ao volume inicial de cultura utilizado, ou seja, células advindas de 500 mL de cultura foram ressuspensas em 500 μ L de glicerol 10%) e dividido em alíquotas que foram transferidas para tubos de microcentrífuga. As células foram utilizadas para transformação ou então imediatamente congeladas a -80 °C até o uso.

Em todos os casos em que linhagens competentes foram transformadas os parâmetros usados foram 200 Ω , 25 μ F e 1,8 kV para 40 μ L de cultura em cubetas de eletroporação de fenda de diâmetro 0,1 cm. Para transformação de *E. coli* foi usado 1 μ L das ligações e após a eletroporação foi adicionado 1 mL de meio 2 x TY às células, que foram incubadas a 37 °C por 1 hora. Para a transformação de *C. crescentus* foi usado 20 μ L das misturas de ligação dialisadas e após a eletroporação foi adicionado PYE às células, que foram incubadas a 30 °C por 16 horas.

Quando as construções eram destinadas à conjugação com *Caulobacter* foi utilizada para a transformação a linhagem conjugativa de *E. coli* S17-1; para os passos de clonagem foi utilizada a linhagem DH5 α ; para ensaios de complementação a linhagem BX04 e para ensaios de antiterminação *in vivo* a linhagem RL211. Após a recuperação das células eram distribuídos 500 μ L da cultura em três placas de meio LB contendo o antibiótico apropriado que permaneciam incubadas a 37 °C por 16 horas. Quando os vetores permitiam seleção por α -complementação eram adicionados 25 μ L de X-gal (20 mg/mL) e 25 μ L de IPTG (100 mM) ao meio de cultura das placas.

3.6.7 Conjugação

Os plasmídeos conjugativos foram introduzidos nas linhagens de *Caulobacter crescentus* utilizando a linhagem doadora de *Escherichia coli* S17-1. Culturas de células receptoras (linhagens de *C. crescentus*) foram misturadas com culturas de células doadoras (*E. coli* S17-1 carregando plasmídeos que contenham *oriT*) na proporção de 3:1 em placas de Petri contendo o meio de cultura PYE e incubadas a 30 °C por 16 horas. Em seguida, a mistura foi transferida para placas de PYE contendo ácido nalidíxico (50 µg/mL) com a finalidade de matar as células de *E. coli* (que são sensíveis a este antibiótico) permitindo apenas o crescimento de *C. crescentus*, naturalmente resistente a ácido nalidíxico. Também foi adicionado ao meio da placa um antibiótico ao qual a marca de resistência contida no plasmídeo transferido conferia resistência, de modo a selecionar apenas células de *Caulobacter* que tivessem recebido o plasmídeo na conjugação.

3.6.8 Obtenção e detecção de linhagens mutantes de *cspB*

As regiões flanqueadoras do gene *cspB* ou ainda estas regiões intercaladas pelo cassete que confere resistência a espectinomicina e estreptomicina, clonados no vetor pNPTS138 foram inseridas na linhagem conjugativa de *E. coli* S17-1. A linhagem carregando o plasmídeo pNPTSΔ*cspB* foi misturada à linhagem NA1000 ou Δ*cspA* ou Δ*cspC*::Spec^r ou Δ*cspD* e, a carregando o plasmídeo pNPTSΔ*cspB*::ΩSpec^r à linhagem Δ*cspA*Δ*cspD*. Após a conjugação, as culturas foram semeadas em placas de PYE contendo ácido nalidíxico (20 µg/mL) e canamicina (5 µg/mL) e incubadas a 30 °C por 48 horas. As colônias resultantes foram testadas por PCR utilizando os oligonucleotídeos CSPB-A e CSPB-B, de modo que as linhagem contendo o plasmídeo integrado deveriam apresentar duas bandas de amplificação correspondentes à cópia íntegra e a deletada, presente na construção pNPTSΔ*cspB*. Após a certificação do primeiro evento de recombinação homóloga, uma colônia portando o plasmídeo pNPTSΔ*cspB* integrado ao genoma foi inoculada em meio PYE líquido a 30 °C por 48 horas, sem adição de antibiótico. Neste passo, a ausência do antibiótico permite que as células nas quais o segundo evento de recombinação homóloga aconteceu, multipliquem-se livremente. Após os dois dias de incubação as culturas foram semeadas em placas PYE contendo 3% de sacarose. O plasmídeo pNPTS138 carrega o gene *sacB* que converte a sacarose em um produto polimérico tóxico, cuja toxicidade pode ser devida ao seu acúmulo no

espaço periplasmático (PELICIC; REYRAT; GICQUEL, 1996). Sendo assim, apenas as células nas quais o segundo evento de recombinação ocorreu são capazes de formar colônias em PYE com sacarose. As colônias resultantes desta etapa de seleção foram organizadas e numeradas em placas de PYE ou PYE + espectinomicina/canamomicina e posteriormente, analisadas através de reações de PCR quanto à presença de bandas de tamanho referente à cópia selvagem ou deletada de *cspB*.

3.7 Mutagênese sítio-dirigida

Para a análise da relevância dos resíduos de histidina dos motivos de ligação de ácidos nucleicos no domínio CSD, foi realizada a metodologia de mutagênese sítio-dirigida. Nesta estratégia, dois oligonucleotídeos são sintetizados de modo a trocar as bases necessárias para alterar o códon do gene para o resíduo desejado. Os oligonucleotídeos sintetizados têm cerca de 30 bases, de modo a serem perfeitamente complementares um ao outro e com a troca situada no meio dos mesmos. Os genes alvos das mutações estavam clonados no vetor pINIII. Na mutagênese, 10 ng destas construções foram usadas como molde para um PCR usando 125 ng dos oligonucleotídeos sintetizados e 1 U de enzima Pfu de alta fidelidade (New England Biolabs, MA, E.U.A) em volume final de 20 µL. As condições do PCR foram de 95 °C por 3 minutos, seguidos de 15 ciclos de 95 °C por 50 segundos, 60 °C por 50 segundos e 68 °C por 8 minutos. Após os 15 ciclos a reação permaneceu a 68 °C por 7 minutos e foi mantida a 4°C. Após a reação de PCR foi adicionado a cada tubo 1 U de enzima *DpnI* (que digere DNA metilado) e incubado a 37 °C por 2 h. Este passo é necessário para a destruição das fitas molde, de modo que apenas o DNA amplificado e carregando a mutação pontual permanece íntegro. Após o tratamento com *DpnI*, 2 µL da reação foi utilizado para transformar células competentes. Os plasmídeos foram extraídos das colônias resultantes da transformação e sequenciados a fim de assegurar a eficiência da mutagênese.

3.8 Análises *in silico*

3.8.1 Predição de estruturas secundárias nos mRNAs

A predição das estruturas secundárias dos mRNA das construções presentes nas fusões traducionais e transcricionais foi realizada permitindo pareamentos de G e U, considerando as menores energias e alterando as temperaturas nas quais os mensageiros se encontrariam (30 °C e 10 °C). Para tanto, foi utilizado o programa GeneQuest, que está incluído no pacote de análise de DNA Lasergene da DNASTAR (DNASTAR Inc., Madison, WI, E.U.A).

3.8.2 Predição das estruturas terciárias das proteínas de choque frio de *C. crescentus*

As proteínas CSP de *C. crescentus* tiveram suas estruturas terciárias preditas com base na estrutura observada para CspA de *E. coli*. As sequencias de aminoácidos destas proteínas foram inseridas no ambiente de modelagem comparativa automatizada de proteínas SWISS-MODEL Workspace (ARNOLD et al., 2006; GUEX e PEITSCH, 1997; KIEFER et al., 2009; SCHWEDE et al., 2003) que por homologia à estrutura de CspA_{ec} (1mjc) realizou a predição de suas estruturas. Após a predição das estruturas estas foram sobrepostas à estrutura de CspA de *E. coli* de modo a localizar tridimensionalmente os resíduos considerados críticos para a atividade destas proteínas a ser utilizados na mutagênese sítio-dirigida. A sobreposição e análise da posição dos resíduos foi realizada fazendo-se uso do programa PyMOL Versão 1.3 (*PyMOL Molecular Graphics System*, Schrödinger, LLC).

3.8.3 Alinhamento e análise de sequencias

O alinhamento da região de 250 pares de bases a montante dos inícios de tradução anotados para os genes *cspA* e *cspB*, bem como o alinhamento as proteínas CspA, CspB, CspC e CspD de *C. crescentus* e CspE de *Escherichia coli* foi realizado fazendo-se uso da ferramenta ClustalW2 (THOMPSON; GIBSON; HIGGINS, 2002) do European Bioinformatics Institute.

3.8.4 Varredura do genoma em busca de genes que possuam sequencias UB semelhantes a dos genes *csp*

A sequência consenso para a região *Upstream box* de *cspA* e *cspB* foi utilizada em uma varredura no genoma de *C. crescentus* a fim de identificar genes que pudessem possuir o mesmo mecanismo de indução em baixas temperaturas, compartilhando a mesma *Upstream box*. Para tal varredura, foi utilizada a ferramenta *Genome-scale-dna-pattern matching* da página da internet *Regulatory Sequence Analysis Tool* – RSAT (VAN HELDEN, 2003).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho está dividido em duas partes. Na primeira ocorre o estudo da fisiologia de *Caulobacter crescentus* em baixas temperaturas e a detecção de genes que conferem a capacidade de sobrevivência ao frio e congelamento cujos resultados foram publicados em Mazzon et al. (2008). Na segunda parte, os genes codificantes para proteínas chamadas Cold Shock Proteins (CSPs) foram estudados quanto à sua importância na resposta a baixas temperaturas e na adaptação à fase estacionária sendo que parte destes resultados foram publicados em Balhesteros et al. (2010) e outros resultados serão contemplados em um manuscrito que se encontra em preparação.

4.1 Estudo do perfil de crescimento em baixas temperaturas e sobrevivência a congelamento de *C. crescentus*

Caulobacter foi descrita como sendo bactérias mesofílicas com ótimo de temperatura de crescimento em torno dos 30°C, mas a presença de espécimes deste gênero já foi relatada em corpos d'água que congelam completamente durante o inverno, sugerindo a existência de espécies psicrotolerantes (ABYZOV et al., 2001, HOSOI-TANABE et al., 2010; POINDEXTER, 1981). A primeira abordagem para caracterizar a resposta de *C. crescentus* NA1000 a baixas temperaturas foi determinar o crescimento desta linhagem, incubando-a em temperaturas que variaram desde a ótima até 5 °C. As taxas de crescimento decrescem gradativamente com a diminuição da temperatura de incubação partindo de tempos de geração de 2 h em 30 °C para cerca de 7 h em 15 °C e 21 h em 10 °C (Fig. 6A). Além disso, as células foram também capazes de apresentar crescimento em temperaturas baixas como 5 °C apresentando tempos de geração de aproximadamente 4 dias, indicando que *C. crescentus* NA1000 é uma linhagem psicrotolerante ao invés de uma mesófila estrita (Fig. 6B).

A fim de determinar a resistência de *C. crescentus* NA1000 ao congelamento, células em fase exponencial de crescimento foram submetidas a congelamento em temperaturas finais de -20 °C e -80 °C, sem adição de quaisquer crioprotetores. As culturas congeladas em fase exponencial de crescimento mostraram praticamente nenhuma perda de viabilidade celular quando o congelamento se deu a -80 °C, mesmo após longos períodos sob esta condição (Fig. 7A). Em contraste, culturas de *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Lactobacillus acidophilus* apresentam grande

perda de viabilidade celular nesta condição, apresentando 1%, 27% e 43% de células viáveis após 24 h de congelamento a -80 °C (BAATI et al., 2000; WILLIMSKY et al., 1992). As culturas de *C. crescentus* mantiveram-se 100% viáveis por pelo menos 120 dias de congelamento nesta condição e, nenhuma diferença foi observada quando as células foram submetidas a essa condição advindas de crescimento em meio mínimo (LANG, 2005). As morfologias celulares foram avaliadas por microscopia e não apresentaram diferenças antes e após o congelamento, e as células mantiveram a motilidade normal após o descongelamento, sugerindo que *Caulobacter* em fase de crescimento exponencial possui uma resistência intrínseca ao congelamento.

A despeito da pronunciada resistência ao congelamento a -80°C apresentada por *C. crescentus* NA1000, quando culturas em fase exponencial de crescimento são submetidas ao congelamento a -20 °C os níveis de viabilidade celular apresentados após o descongelamento são consideravelmente inferiores (LANG, 2005). Nesta condição, a taxa de sobrevivência após 24 h de congelamento cai para 10% da viabilidade inicial, mantendo a tendência de queda com o passar dos dias. A diferença de viabilidade apresentada nas primeiras 24 h de congelamento entre as temperaturas de -80 °C e -20 °C pode ser resultado da diferença entre as taxas de resfriamento as quais as culturas foram submetidas nas duas condições, sendo mais rápida a -80 °C que a -20 °C. Souzu (1989) e Dumont et al. (2004) propuseram que taxas de congelamentos específicas mostram-se mais deletérias à viabilidade celular, principalmente por permitir o congelamento da água durante o transporte através das membranas, o que poderia acarretar a ruptura das células. Além do mais, o congelamento lento também é capaz de submeter as células a estresse osmótico surgido com o efluxo de água do interior da célula para o meio externo, como resultado do congelamento do conteúdo extracelular antes do intracelular, este mais concentrado. A situação de hiperosmolaridade seria um resultado do aumento da concentração dos solutos celulares após a perda de água para o meio (DUMONT; MARECHAL; GERVAIS, 2004; GAO e CRITSER, 2000). A queda progressiva com o passar do tempo sob congelamento observada nos níveis de viabilidade celular, entretanto, não poderia ser explicada por os fatores explicitados acima, uma vez que seus efeitos teriam que ser imediatos.

Além da sobrevivência ao congelamento descrita anteriormente, foi analisada a capacidade destas culturas de resistir a ciclos contínuos e sequenciais de congelamento e descongelamento (Fig. 7A e 7B). De acordo com este experimento é possível notar que a porcentagem de células viáveis de culturas em fase exponencial

de crescimento diminui lentamente após cada ciclo de congelamento/descongelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ estando, após quatro ciclos, em torno de 48% de sobrevivência – taxa ainda alta quando comparada à sobrevivência de outras linhagens bacterianas como já mencionado anteriormente. A resistência ao congelamento diminui com a progressão do crescimento da cultura atingindo os níveis mais baixos quando esta se encontra no estágio inicial da fase estacionária chamada estacionária precoce (cerca de 48 h após a entrada em fase estacionária) apresentando cerca de 10% de viabilidade celular após 24 h de congelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Nos experimentos de congelamento/ descongelamento realizados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ também há a queda progressiva da viabilidade após cada ciclo, com a taxa de sobrevivência após o primeiro ciclo sendo cerca de 20 vezes maior nas células advindas da fase exponencial de crescimento quando comparadas às de fase estacionária precoce.

A fim de determinar se a queda na resistência ao congelamento observada na fase estacionária precoce era definitiva, culturas em diferentes estágios da fase estacionária foram testadas e, de acordo com os resultados observados (Fig. 7C), é possível notar que esta diminuição da resistência ao congelamento é transitória. As culturas readquirem esta resistência tanto a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ como a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ quando no estágio posterior da fase estacionária, após quatorze dias de incubação, chamada de fase estacionária tardia.

Wortinger et al. (1998) demonstrou que *C. crescentus* quando em fase estacionária tardia sofre diferenciação morfológica tornando-se filamentosa e helicoidal e apresentando maior resistência a diversos estresses como oxidativo, alcalinidade, acidez e choque térmico. Os resultados mostrados neste trabalho sugerem que células em fase exponencial de crescimento estão mais bem adaptadas a rápidas mudanças em temperatura, o que pode ser particularmente importante nesta fase uma vez que as células móveis precisam lidar com diferentes ambientes quando se encontram em dispersão. Assim que entram em fase estacionária, perdem os níveis intrínsecos de resistência, mas conforme se diferenciam na morfologia helicoidal restauram a resistência ao congelamento a níveis semelhantes dos apresentados pelas células móveis.

Esta notável característica de *Caulobacter* poderia ser relacionada a propriedades bioquímicas, como expressão constitutiva de moléculas crioprotetoras ou a características estruturais, como composição lipídica de membrana. Em *E. coli*, o acúmulo de trealose é crítico para a manutenção da viabilidade em baixas temperaturas e a trealose sintase (OtsA/OtsB) é induzida sob essas condições

(KANDROR; DELEON; GOLDBERG, 2002). No entanto, *C. crescentus* não possui um gene homólogo à trealose sintase anotado em seu genoma (NIERMAN et al., 2001), sugerindo que esta resistência ao congelamento e baixas temperaturas seja devido a outros fatores crioprotetores. Ainda nesse sentido, a composição da membrana de *Caulobacter crescentus* é ligeiramente atípica com predominância de glicopeptídeos e ausência de fofolípideos usuais como fosfatidiletanolamina e cardiolipinas (BATRAKOV et al., 1997; DE SIERVO e HOMOLA, 1980). Sabe-se que a composição lipídica da membrana de *C. crescentus* sofre mudanças quando suas células entram em fase estacionária de crescimento, apresentando um aumento na quantidade de acilfosfatidilglicerol e glicopeptídeos contendo ácidos glicurônicos (DE SIERVO e HOMOLA, 1980).

Um isolado psicrotolerante identificado como *Caulobacter* sp. K31 apresenta mudanças na composição de ácidos graxos durante o choque-frio, com aumento de ácidos graxos insaturados e diminuição de ácidos graxos saturados e ramificados (br-19:1) (MÄNNISTÖ e PUHAKKA, 2001). Por outro lado, *Caulobacter* sp. K31 apresenta diminuição de 60 a 70% nas quantidades de ácidos graxos insaturados quando as células entram em fase estacionária de crescimento (estacionária precoce) tanto a 25 °C quanto a 8 °C e esta redução é acompanhada pelo aumento dos ácidos graxos ramificados br-19:1 (MÄNNISTÖ e PUHAKKA, 2001). Estas diferenças na composição lipídica da membrana das células de fase exponencial, estacionária precoce e tardia podem esclarecer a inesperada maior susceptibilidade ao congelamento de células em fase estacionária precoce quando comparadas às em fase exponencial de crescimento.

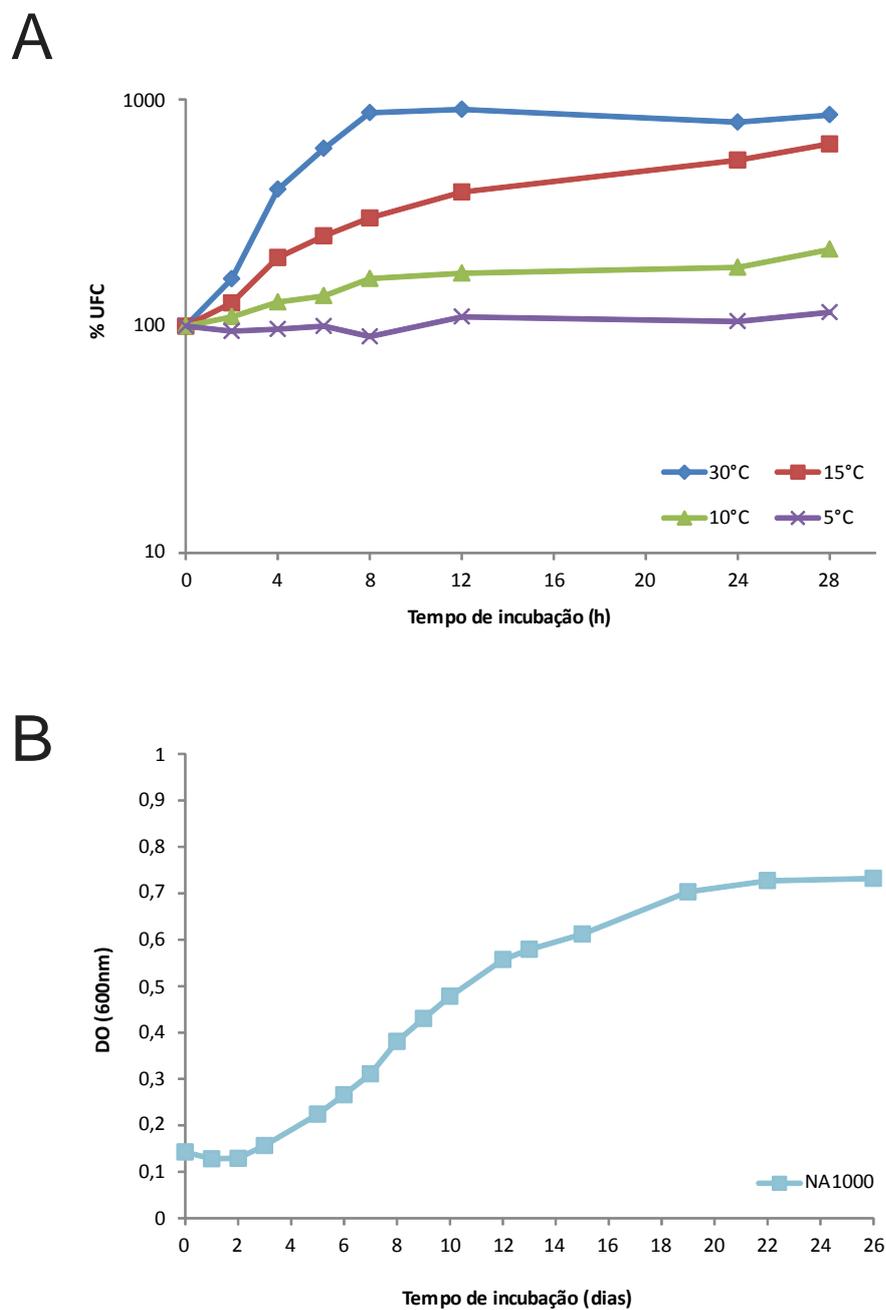


Figura 6. Determinação do perfil de crescimento de *Caulobacter crescentus* em diferentes temperaturas de incubação. (A) Culturas de NA1000 em fase exponencial de crescimento foram incubadas a 30 °C (azul), 15 °C (vermelho), 10 °C (verde) e 5 °C (roxo) e alíquotas foram retiradas para a determinação das UFCs ao longo da incubação. (B) Densidade óptica de cultura de NA1000 incubada a 5 °C ao longo de 26 dias.

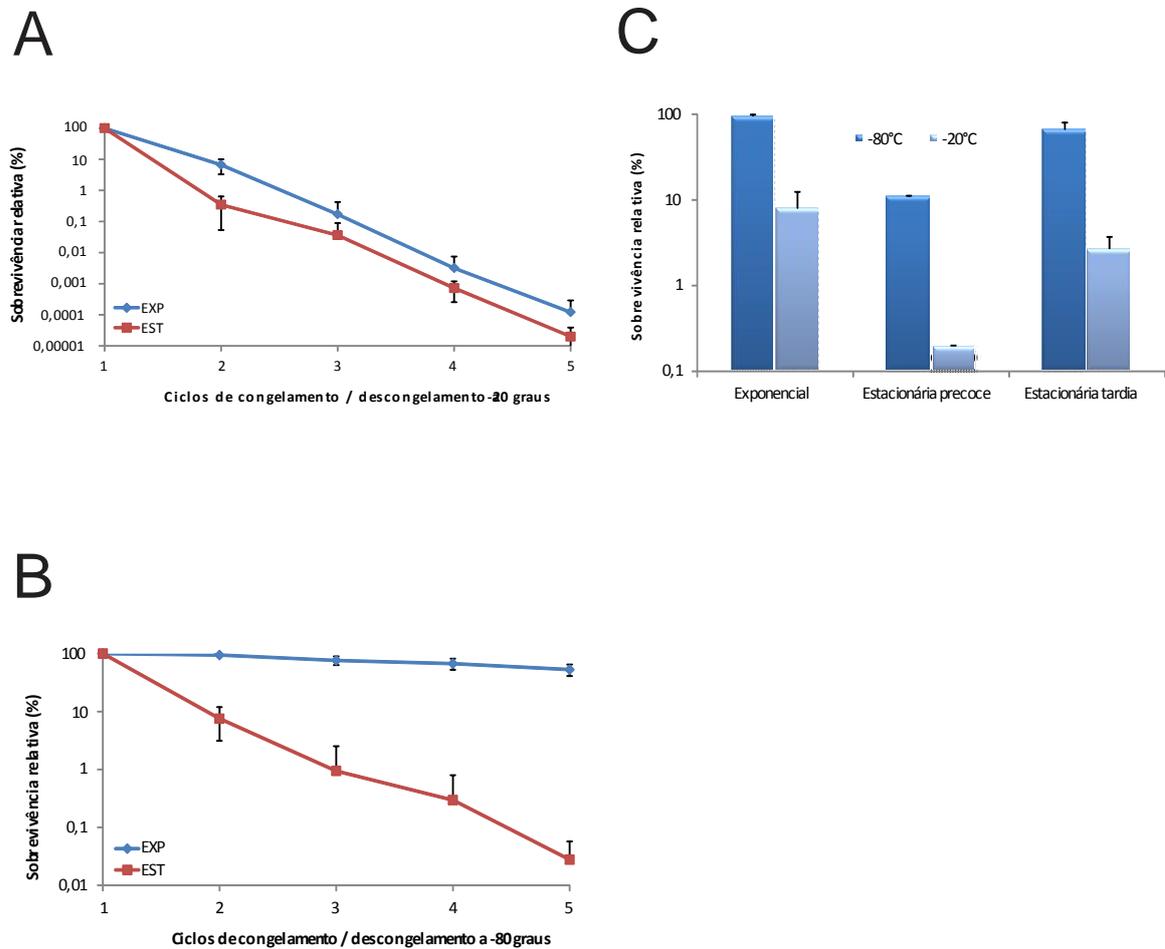


Figura 7. **Determinação do perfil de sobrevivência de *Caulobacter crescentus* a ciclos de congelamento.** Culturas de NA1000 em fase exponencial e estacionária precoce de crescimento foram submetidas a ciclos sequenciais de congelamento e descongelamento a -20 °C (A) e -80 °C (B) com tomada de alíquotas a cada descongelamento para determinação das UFCs. (C) Determinação da resistência ao congelamento a -80 °C e -20 °C de culturas em fases exponencial e estacionárias precoce e tardia. Os resultados representam médias de triplicatas biológicas e duplicatas técnicas. As barras pretas representam o desvio padrão.
 FONTE: Mazzon et al. (2008).

4.1.1 Aquisição de criotolerância

Anteriormente foi descrito para outras bactérias que a pré-incubação das células em baixas temperaturas antes de submetê-las ao congelamento aumentava os níveis de sobrevivência após o descongelamento, demonstrando que algumas células são capazes de adquirir criotolerância (GOLDSTEIN; POLLIT; INOUE, 1990; KAWAHARA et al., 2001; KIM; KHUNAJAKR; DUNN, 1998; WILLIMSKY et al., 1992).

A fim de avaliar se *Caulobacter crescentus* seria capaz de adquirir criotolerância e se haveria uma temperatura ideal para o desenvolvimento desta habilidade, culturas foram pré-incubadas a diferentes temperaturas (5 °C, 15 °C ou 20 °C) por 2 h e 6 h anteriormente ao congelamento a -20 °C por 24 h. A aquisição de criotolerância torna-se mais efetiva quando as células são incubadas a 15 °C ao invés de 5 °C ou 20 °C, sendo que 2 h de incubação mostra-se ligeiramente mais eficaz que 6 h (Fig. 8). Os genes *cspA* e *cspB* de *C. crescentus*, codificantes para proteínas de choque frio, são mais induzidas em temperaturas entre 15 °C - 20 °C, com pouca expressão a 5 °C (LANG e MARQUES, 2004), indicando que a resposta de choque frio é maior nesta faixa de temperatura onde ocorrem as maiores taxas de aquisição de crioproteção. Entretanto, os resultados não podem ser explicados apenas pela expressão destas proteínas de choque frio e, provavelmente, outros fatores estão envolvidos na crioproteção adquiridas a 15 °C. *C. crescentus* apresenta cerca de quarenta peptídeos cuja síntese é aumentada em células incubadas a 10 °C (LANG, 2005), que podem ter papéis relevantes na adaptação em baixas temperaturas, bem como na crioproteção. A aquisição da criotolerância foi também observada para células de culturas em fase estacionária precoce com aumento entre 2,6 e 2,8 vezes do número de células viáveis tanto a -20 °C quanto a -80 °C (dados não mostrados). Estes resultados demonstram que células de *Caulobacter*, sejam em fase exponencial de crescimento ou em fase estacionária, podem adquirir criotolerância ao congelamento ao serem pré-adaptadas a baixas temperaturas.

4.1.2 Identificação de genes importantes na resistência ao congelamento

Na tentativa de identificar genes cujos produtos pudessem desempenhar papéis relevantes na resistência ao congelamento, uma biblioteca de mutantes obtidos por inserção de transposons contendo cerca de 5700 clones (BRAZ e MARQUES, 2005) foi avaliada em busca de clones que apresentassem sensibilidade

ao congelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Três linhagens foram isoladas, as quais mostraram pronunciada redução (de ao menos 10 vezes) na taxa de sobrevivência após o congelamento (Tabela 6). A inserção única nos mutantes foi confirmada por experimento de Southern Blot (dados não mostrados) e o gene interrompido por cada transposon foi identificado. Todas as linhagens apresentaram redução também na sobrevivência ao congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Quando uma cópia selvagem do gene interrompido foi introduzida na célula os mutantes tiveram seus fenótipos de sensibilidade a congelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, mas não a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ completamente revertidos.

Dois mutantes (12-9E e 30-10H) tiveram a inserção do transposon interrompendo genes codificantes para uma DNA helicase da família AddA (CC3538) e uma RNA helicase ATP-dependente da família DEAD/DEAH (CC0835), respectivamente. Helicases são muito importantes por desestabilizar estruturas secundárias em ácidos nucleicos, as quais são aumentadas em baixas temperaturas (WEBER e MARAHIEL, 2003) e, a sensibilidade ao congelamento destes dois mutantes indicam que estas proteínas são também importantes na sobrevivência a esse estresse.

O gene CC3538 é o último de um operon de seis genes e está a montante de um gene codificante para uma thioredoxina cujo promotor foi encontrado a 125 nucleotídeos de distância deste (MCGRATH et al., 2007) sugerindo que este fenótipo não se trate na realidade de efeito polar. Helicases do tipo AddA foram descritas como envolvidas em reparo de quebras de dupla fita de DNA em algumas bactérias (ROCHA; CORNET; MICHEL, 2005). A dificuldade da linhagem 12-9E em lidar com os efeitos do congelamento pode ser um resultado da deficiência na resposta a estresse osmótico. Há algumas evidências que condições de hiperosmolaridade causadas por NaCl, KCl ou manitol, são capazes de aumentar a frequência de quebras de dupla fita de DNA em células de rim de roedores (KÜLTZ e CHAKRAVARTY, 2001), embora ainda não tenhamos conhecimento deste fenômeno sendo descrito para células bacterianas. O provável envolvimento do produto de CC3538 na desestabilização de estruturas secundárias em baixas temperaturas é sugerido pela ligeira redução da taxa de crescimento desta linhagem tanto $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ quanto $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, neste último apresentando um tempo de geração de 9,5 horas, quase 1,4 vezes maior que a apresentada pela linhagem selvagem (Fig. 9). A queda na sobrevivência ao congelamento poderia ser explicada se a proteína codificada por CC3538 tivesse algum papel no reparo de eventuais danos ao DNA originados durante o congelamento ou descongelamento.

O mutante 30-10H possui o gene CC0835 interrompido pelo transposon mini-Tn5 próximo à 10^a base da região codificante. Este gene, que codifica para uma helicase de RNA da família DEAD/DEAH box com 1431 aminoácidos, localiza-se 157 pares de bases a montante do gene CC0836 que codifica para uma proteína sensora histidina quinase. A montante do gene CC0835, encontra-se o gene CC0834, que codifica para uma proteína hipotética.

Com a estabilização de estruturas secundárias nos RNAs, ficam comprometidas a tradução e a própria degradação dos transcritos. Para contornar o problema da estabilização dos mRNAs, a célula possui um maquinário, o degradossomo, que é capaz de desfazer as estruturas secundárias do RNA e degradá-lo. Em *E. coli* encontra-se associada ao degradossomo uma RNA helicase (RhlB) desta família que é responsável pela desestabilização das estruturas secundárias. Alternativamente, o degradossomo pode conter ainda uma RNA helicase CsdA (da mesma família que RhlB), que é induzida pelo choque frio, enquanto que a RhlB é induzida na fase de recuperação do choque frio. CsdA e RhlB se ligam em sítios diferentes da RNase E, e a segunda tem maior afinidade ao degradossomo (PRUD'HOMME-GÉNÉREUX et al., 2004).

E. coli possui quatro genes anotados como codificantes para RNA helicases ATP-dependentes de cinco grupos classificados quanto a seus domínios funcionais (DbpA, SrmB, RhlB, RhlE e CsdA/DeaD) (BLATTNER et al., 1997). *Caulobacter crescentus* também possui quatro genes anotados que codificam para proteínas desta família, sendo que um destes genes apresenta uma mudança de fase na região da 1575^a base da região codificante interrompendo o domínio DbpA (NIERMAN et al., 2002) (maior similaridade com DbpA – 43%). Mais recentemente Hardwick et al. (2010) caracterizaram o degradossomo de *C. crescentus* em condições ótimas de crescimento, sendo que este se mostrou constituído de uma RNase E, a RNA helicase codificada por CC1847, uma PNPase e, por fim, ao invés da enolase, como acontece no degradossomo de *E. coli*, a aconitase está associada ao complexo.

Foi observado em *E. coli* que mutações no gene *rhlB* tem pouco ou nenhum efeito no crescimento a várias temperaturas ou no *pool* de mRNA, mas comprometem seriamente a degradação de mRNAs com sequencias REP. CsdA, ao contrário das outras da mesma família, possui um domínio na região C-terminal que separa dsRNA na ausência de ATP e não possui atividade ATPásica (domínio DbpA) (KOSSEN e UHLENBECK, 1999). Este domínio DbpA não está presente na helicase codificada pelo gene CC0835. Originalmente identificada como DeaD,

posteriormente CsdA foi descrita como envolvida na biogênese das subunidades 50S e necessária para a tradução de mRNAs longos com estruturas secundárias (PRUD'HOMME-GÉNÉREUX et al., 2004).

Mutantes de CsdA apresentam um retardo no desaparecimento das proteínas de choque-frio, talvez pelo defeito no decaimento do mRNA a baixas temperaturas e, pouco ou nenhum defeito de crescimento a 37 °C, mas um retardo a 15 °C (PRUD'HOMME-GÉNÉREUX et al., 2004). Da mesma maneira, o mutante 30-10H apresenta grande retardo no crescimento a 15 °C e leve deficiência a 30 °C. Isto sugere semelhanças de funções entre a CsdA de *E. coli* e a helicase interrompida no mutante em questão. No entanto, estruturalmente, a helicase codificada pelo gene CC0835 assemelha-se mais a RhlE de *E. coli* (52% de similaridade) que a CsdA (42%) ou RhlB (38%) propriamente ditas. Em *E. coli* a RNase E do degradossomo já foi descrita como tendo dois sítios de ligação para helicases da família DEAD: RhlB e RhlE (KHEMICI et al., 2004). Em *Pseudomonas syringae* foi mostrado que esta helicase RhlE associa-se a RNase E e RNase R, possuindo a capacidade de degradar mRNAs com estruturas secundárias (PURUSHARTH et al., 2005).

CsdA de *E. coli* se apresenta em baixas quantidades a 37 °C, mas é fortemente induzido em choque frio. Em condição de queda brusca de temperatura, esta helicase se associa a RNase E (mas não com a PNPase) formando o degradossomo de choque frio, substituindo perfeitamente a helicase RhlB em baixas temperaturas. A atividade desestabilizadora de dsRNA na ausência de ATP depende da concentração de mRNA com estruturas secundárias. CsdA também pode ser encontrada em degradossomos de choque frio purificados de culturas pré-adaptadas (PRUD'HOMME-GÉNÉREUX et al., 2004). Neste sentido, o produto codificado por CC0835 poderia se tratar de uma RNA helicase associada ao degradossomo de frio, uma vez que apresenta indução de oito vezes após 2 h de incubação a 10 °C (ALVELOS, 2010, comunicação pessoal¹).

Além disso, mutantes de algumas destas helicases possuem fenótipos de sensibilidade ao frio (PRUD'HOMME-GÉNÉREUX et al., 2004). Helicases da família DEAD/DEAH em *Bacillus subtilis* foram descritas como cooperativas com CSPs a fim de facilitar o processo traducional (HUNGER et al., 2006). O mutante CC0835 apresenta crescimento mais lento mesmo em temperatura ótima de crescimento, mas uma acentuada deficiência de crescimento a 15 °C com tempos de geração de 15 horas, mais de 2,1 vezes maior que a apresentada pela linhagem selvagem nesta condição. Entretanto, a linhagem mostrou-se capaz de retomar o crescimento após

¹ ALVELOS, D. São Paulo, 2010.

a transferência para a temperatura de 30 °C, 72 h após incubação a 15 °C (dado não mostrado). Os resultados evidenciam que esta helicase desempenha papel crucial na adaptação a baixas temperaturas, mas o seu exato envolvimento com a resposta ao congelamento não é clara. O envolvimento do produto codificado pelo gene CC0835 na resposta de adaptação a baixas temperaturas, bem como o envolvimento de outras helicases desta família codificadas por genes presentes no genoma de *C. crescentus*, será alvo de estudos futuros em nosso laboratório.

O mutante 12-9F possui o gene CC3196 interrompido pelo transposon mini-Tn5 aproximadamente na 300^a base da região codificante. Este gene, que codifica para uma proteína de um sistema RND de transporte com 369 aminoácidos, localiza-se em um operon, estando a jusante do gene CC3195 de 1503 pares de bases e que codifica para uma proteína de efluxo de membrana externa (domínio TolC) do mesmo sistema de efluxo. A jusante do gene CC3196, encontra-se o gene CC3197 de 1041 pares de bases, que codifica para uma proteína com domínio AcrB, também pertencente ao sistema RND de transporte. Este sistema AcrAB/TolC é bastante estudado em *E. coli* (MURAKAMI et al., 2002). Por se tratar de um operon, é possível que a interrupção ocorrida no gene CC3196 também cause a diminuição ou mesmo impeça a expressão do gene CC3197, à jusante dele. O sistema RND é descrito como envolvido na resistência a múltiplas drogas, exportação de íons de metais pesados, transporte de oligossacarídeos e expulsão de solventes hidrofóbicos (PENG e NESTER, 2001). Este é um dos sistemas de transporte mais elaborados, pois usa um complexo tríplice proteico ao invés de uma simples proteína de transporte para poder translocar o substrato alvo através das membranas interna e externa. Todos os membros da superfamília RND possuem 12 segmentos transmembrânicos e geralmente estes sistemas são constituídos de uma proteína de membrana interna transportadora (IMP); uma proteína de fusão de membrana (MFP) que está ancorada à membrana interna por um lipídeo ou por uma α -hélice; e uma proteína de membrana externa parecida com uma porina (OMP) (MCKEEGAN; BORGES-WALMSLEY; WALMSLEY, 2003; NIES, 2003). Tem sido proposto que a parte superior da proteína AcrB interage com a proteína TolC, através do contato de seis estruturas verticais em forma de grampo, de forma a constituir um caminho, através do periplasma, até a membrana externa. Ainda não se sabe ao certo o papel de AcrA, mas sugere-se que esta sirva de ponte para estabilização da interação entre AcrA e TolC (ESWARAN et al., 2004; MCKEEGAN; BORGES-WALMSLEY; WALMSLEY, 2003; MURAKAMI et al., 2002; NIES, 2003). Num experimento de microarranjo de DNA realizado por Hu et al. (2005) este gene

apresentou indução de 3,6 vezes na presença de Cádmio, fortalecendo a hipótese que sugere um papel na extrusão de metais pesados por sistemas deste tipo.

Não há relatos na literatura do envolvimento destes genes ou de proteínas contendo os mesmos domínios na resposta adaptativa ao frio ou na resistência ao congelamento. No entanto, a linhagem 12-9F apresenta perda de viabilidade da ordem de 10 vezes tanto a -20 °C quanto a -80 °C e apenas uma sutil diferença nas taxas de crescimento a 30 °C e 15 °C (Tabela 6 e Fig. 9).

Em Ma et al. (1995) foi demonstrado que em *E. coli*, o operon contendo os genes *acrA* e *acrB* apresenta-se induzido em condições de estresse gerais como 4% etanol, 0,5M NaCl ou ainda em fase estacionária. Estes dados sugerem que o possível envolvimento deste gene com a sobrevivência ao congelamento esteja, relacionado à manutenção da osmolaridade da célula alterada no momento do congelamento.

Portanto, os dados da literatura e resultados experimentais de curva de crescimento no frio e sobrevivência relativa ao congelamento levam a creditar que possivelmente o principal envolvimento deste gene ou deste operon na sobrevivência ao congelamento, seja na resposta osmótica ao congelamento, talvez por manutenção da osmolaridade. No entanto, não é possível descartar que este fenótipo seja resultado da deficiência na secreção de determinado metabólito importante para a resistência ao congelamento.

Os resultados obtidos até o momento sugerem que a resistência de *C. crescentus* ao congelamento seja resultante de vias diferentes e independentes, mas especialmente dependente da manutenção do grau de envelhecimento dos ácidos nucleicos.

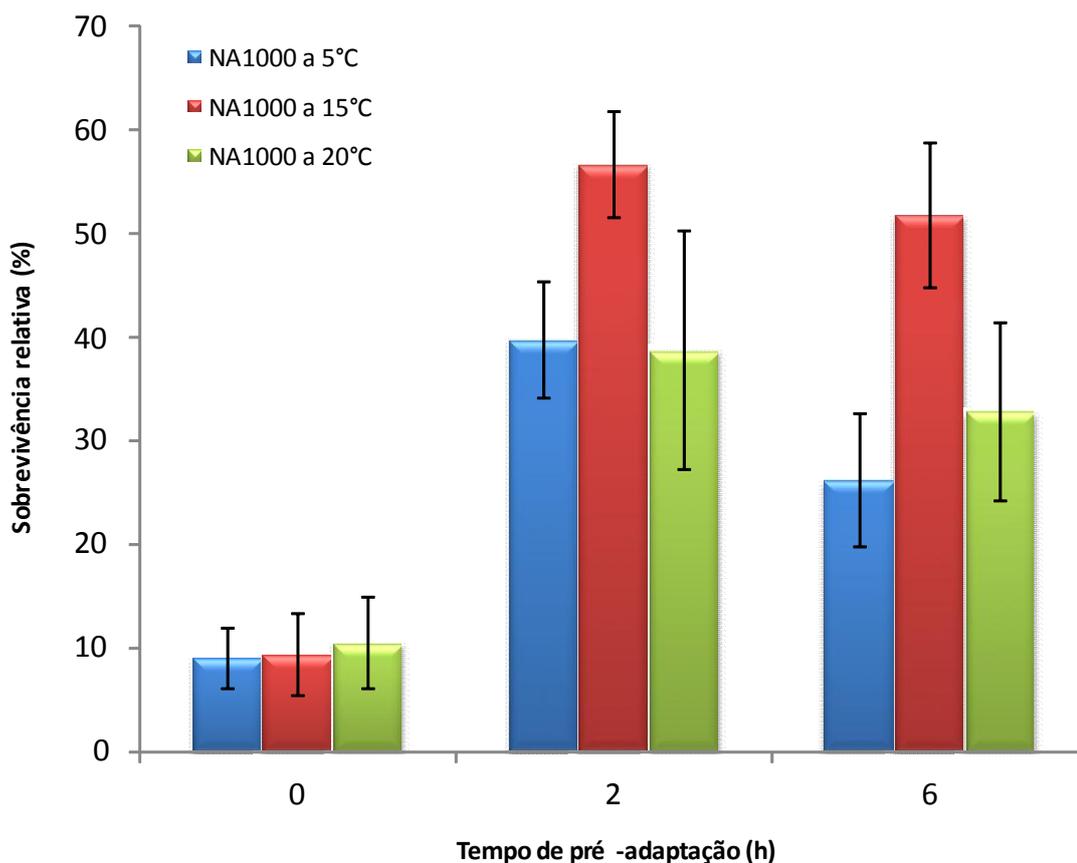


Figura 8. Ensaio de aquisição de criotolerância. A sobrevivência de culturas de NA1000 em fase exponencial de crescimento foi avaliada após o congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, sem prévia incubação em baixas temperaturas e após 2 h e 6 h de incubação a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Os resultados representam médias de triplicatas biológicas e duplicatas técnicas. As barras pretas representam o desvio padrão. FONTE: Mazzon et al. (2008).

Tabela 6 - Sobrevivência da linhagem selvagem e dos mutantes selecionados na biblioteca de mutantes obtida pela inserção do transposon mini-Tn5.

| LINHAGEM ^a | GENE INTERROMPIDO | PRODUTO GÊNICO | SOBREVIVÊNCIA A A -80 °C ^c | SOBREVIVÊNCIA A A -20 °C ^c |
|-----------------------|-------------------|-------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| NA1000 | Selvagem | - | 98,80 ± 1,20 | 9,66 ± 0,78 |
| 12-9E | CC3538 | DNA helicase (Família AddA) | 5,48 ± 3,02 | 0,17 ± 0,11 |
| 12-9E (2G7) | - | - | 94,40 ± 5,75 | 4,13 ± 0,22 |
| 12-9F | CC3196 | Proteína de secreção (família HlyD) | 4,73 ± 0,46 | 0,77 ± 0,75 |
| 12-9F (2F2) | - | - | 98,55 ± 4,44 | 3,57 ± 0,53 |
| 30-10H | CC0835 | RNA helicase (Família DEAD/DEAH) | 7,78 ± 0,91 | 0,81 ± 0,84 |
| 30-10H (1D5) | - | - | 102,10 ± 8,49 | 2,66 ± 0,50 |

^aO parênteses ao lado da linhagem representa o número do cosmídeo utilizado na complementação.

^bProdutos putativos obtidos de bancos de dados de sequencia. Características relevantes dos peptídeos estão indicadas entre parênteses.

^cA sobrevivência foi obtida comparando as UFCs obtidas após o congelamento a -80 °C e -20 °C com as UFCs obtidas antes do congelamento.

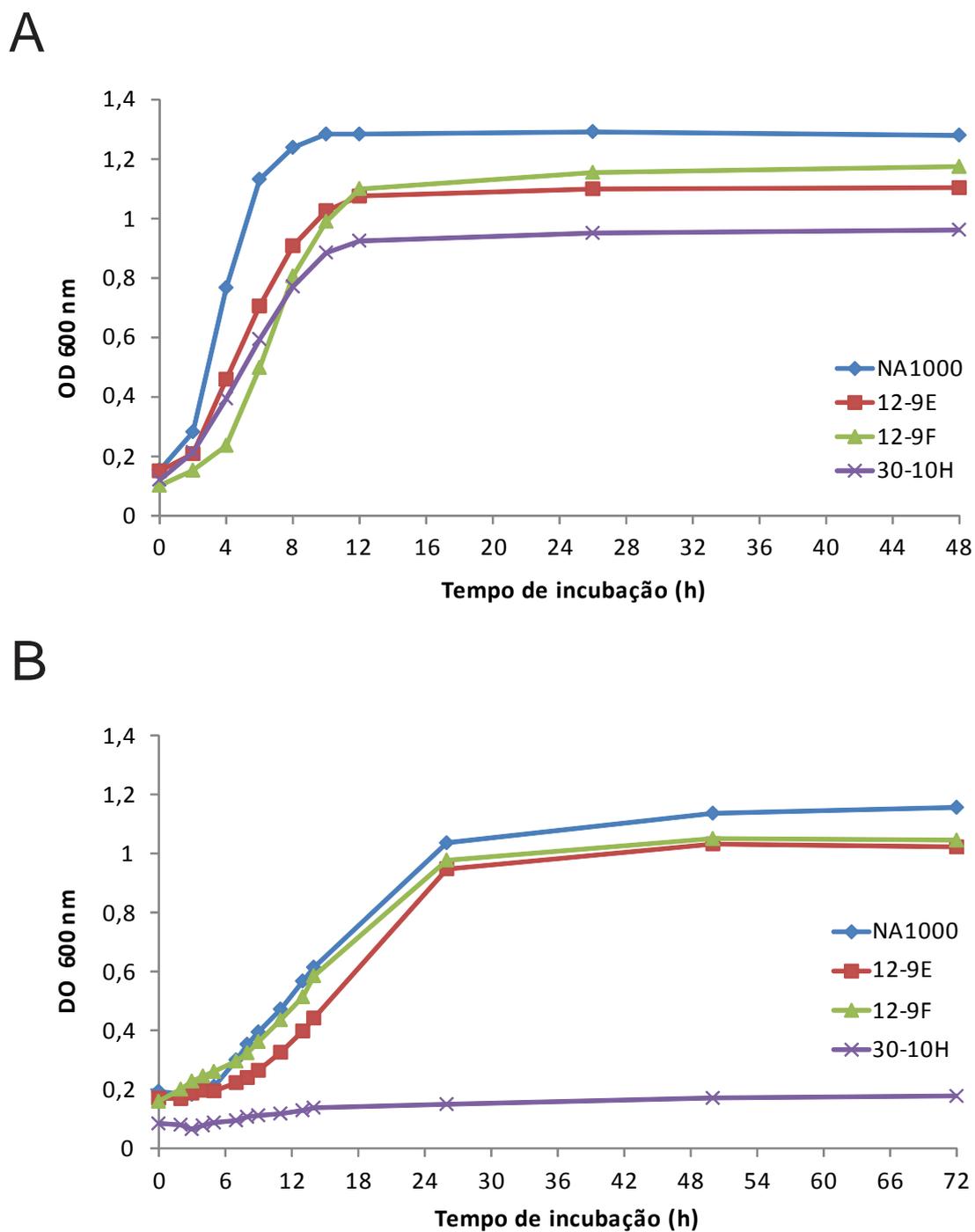


Figura 9. Curvas de crescimento das linhagens selecionadas na varredura de biblioteca de mutantes. A linhagem selvagem NA1000 e as linhagens mutantes 12-9E, 12-9F e 30-10H foram crescidas a 30 °C (A) e 15 °C (B) e alíquotas foram retiradas a cada ponto para a determinação da densidade óptica da cultura.
 FONTE: Mazzon et al. (2008).

4.2 Estudo das CSPs de *Caulobacter crescentus*

A mais característica resposta à queda de temperatura é a indução de proteínas de baixo peso molecular (em torno de 7 kDa). Estas proteínas de baixo peso molecular induzidas em baixas temperaturas possuem um domínio conservado, chamado de “*Cold Shock Domain*” (CSD) (JIANG; FANG; INOUE, 1996).

C. crescentus CB15 possui em seu genoma quatro genes que codificam para essas pequenas proteínas contendo o domínio de choque frio (NIERMAN et al., 2001), bastante semelhantes às CSPs de *E. coli* e que foram nomeados como *cspA*, *cspB*, *cspC* e *cspD*. Na anotação inicial do genoma de CB15 três proteínas (CspA, CspB e CspC) apresentavam um alto grau de similaridade entre si e com CspA de *E. coli* (LANG e MARQUES, 2004) e estavam descritos possuindo um domínio CSD, constituído por dois motivos RNP-1 e RNP-2 de ligação a RNA. Essas proteínas foram descritas com massas moleculares previstas de cerca 7 kDa, mas apresentam diferentes pIs preditos (CspA, CspB, CspC e CspD com pIs 6,54, 5,64, 6,30 e 5,78, respectivamente). Lang e Marques (2004) propuseram uma nova anotação para *cspD* na qual este gene codificaria uma proteína com tamanho aproximado de 21 kDa e contendo dois domínios CSD. Mais tarde, Balhesteros et al. (2010) constataram através de ensaios de *immunoblot* o tamanho de CspD predito por Lang e Marques (2004) e, ainda demonstraram que *cspC* também codifica uma proteína com dois domínios CSD com tamanho predito de cerca de 18 kDa, corroborado por ensaios de *immunoblot*. Sendo assim, as CSPs de *Caulobacter* se dividem em dois grupos estruturalmente distintos nos quais os indivíduos possuem um (CspA e CspB) ou dois domínios CSD (CspC e CspD) e, que aparentemente compartilham similaridades funcionais, sendo CspA e CspB induzidas em choque-frio e CspC e CspD em fase estacionária de crescimento (LANG e MARQUES, 2004).

4.2.1 Obtenção de linhagens mutantes para genes codificantes das CSPs

Com a finalidade de estudar a importância de cada uma dos parálogos desta família em *Caulobacter*, deu-se início à construção de linhagens mutantes para cada um destes genes e posteriormente à combinação das mutações. Já se encontrava disponível para estudos as linhagens mutantes $\Delta cspA$ e $\Delta cspD$ (Lang e Marques, 2004), além da combinação $\Delta cspA\Delta cspD$ (LANG, 2005). O mutante do gene *cspC* foi obtido por Balhesteros et al. (2010) e foi utilizado como arcabouço

para a construção neste trabalho dos mutantes $\Delta cspA\Delta cspC::\Omega Spec^r$, $\Delta cspC::\Omega Spec^r\Delta cspD$ e, posteriormente o $\Delta cspB\Delta cspC::\Omega Spec^r$.

A fim de obter um mutante nulo para o gene *cspB* (CC0665) os fragmentos flanqueadores a jusante e a montante do gene foram clonados no vetor pNPTS138, que não é replicativo em *C. crescentus*, perpetuando-se apenas por integração ao cromossomo. Esta construção no pNPTS138 foi utilizada para obtenção dos mutantes $\Delta cspB$, $\Delta cspA\Delta cspB$, $\Delta cspB\Delta cspD$ e $\Delta cspB\Delta cspC::\Omega Spec^r$. Os plasmídeos foram inseridos por conjugação entre *E. coli* S17-1 com as linhagens de *C. crescentus* NA1000, $\Delta cspA$, $\Delta cspD$ e $\Delta cspA\Delta cspD$. Dez colônias resultantes da segunda recombinação foram testadas por PCR para verificação da presença da mutação ou da reversão ao selvagem. A varredura realizada na detecção da deleção de *cspB* nas linhagens $\Delta cspA\Delta cspB$, $\Delta cspB\Delta cspD$ e $\Delta cspA\Delta cspB\Delta cspD$ utilizou os oligonucleotídeos CSPB-A e CSPB-B. Assim, os fragmentos obtidos por amplificação na PCR produziram bandas de 680 pb (300 pb do fragmento a montante + 380 pb do fragmento a jusante) nos mutantes e 840 pb nos revertentes (300 pb do fragmento a montante + 160 pb do gene + 380 pb do fragmento a jusante) (Figura 10) A frequência de recombinações gerando clones mutantes obtida através das colônias (10 de cada) testadas foi de 50% para $\Delta cspA\Delta cspB$, 100% $\Delta cspB\Delta cspD$, 90% $\Delta cspB$ e 0% para $\Delta cspA\Delta cspB\Delta cspD$ (não mostrado). Posteriormente, outras 24 colônias resultantes da segunda recombinação para a obtenção de $\Delta cspA\Delta cspB\Delta cspD$ foram testadas e todas se apresentaram revertentes. A próxima abordagem para a obtenção do mutante triplo foi a inserção de um cassete que confere resistência a espectinomicina e estreptomicina na construção pNPTS138 $\Delta cspB$, gerando pNPTS138 $\Delta cspB::\Omega Spec^r$. Após o segundo evento de recombinação, foram obtidas 22 colônias com resistência a espectinomicina e estreptomicina das 210 colônias sensíveis a canamicina. Destas 22 colônias, dez foram testadas por PCR. Na varredura por mutantes, os clones revertentes deveriam apresentar uma banda do tamanho 840 pb enquanto que os clones mutantes apresentariam a banda de 2.680 pb. Usando esta abordagem e assumindo que os demais clones sensíveis a canamicina e resistentes a espectinomicina/estreptomicina apresentem os mesmos padrões de banda dos clones testados por PCR sendo, portanto, mutantes de *cspB*, é possível admitir que a frequência de recombinações gerando mutantes $\Delta cspA\Delta cspB::\Omega Spec^r\Delta cspD$ seja de cerca de 10% (não mostrado).

A frequência de recombinações gerando clones mutantes em cada linhagem obtida poderia evidenciar a importância hierárquica exercida pelos parálogos de

CSP em *C. crescentus*. As frequências de recombinação gerando mutantes encontradas no processo de mutagênese foram de 0,1% para $\Delta cspC::\Omega Spec^r$ (BALHESTEROS, 2009), 10% para $\Delta cspA\Delta cspB::\Omega Spec^r\Delta cspD$, 40% para $\Delta cspD$ (LANG, 2005), 50% para $\Delta cspA\Delta cspB$, $\Delta cspA\Delta cspC::\Omega Spec^r$ e $\Delta cspA\Delta cspD$ (LANG, 2005), 80% para $\Delta cspA$ (LANG, 2005), 90% para $\Delta cspC::\Omega Spec\Delta cspD$ e $\Delta cspB$ e 100% de $\Delta cspB\Delta cspD$ e $\Delta cspB\Delta cspC::\Omega Spec$.

De posse dos dados de frequência de mutagênese, e levando em consideração que todo o processo de mutagênese é realizado em 30 °C, é possível imaginar que a contribuição de cada uma das proteínas CSPs seja qualitativa e quantitativamente diferente, sendo a ausência de *cspC* a mais crítica para a célula, seguida por *cspD*, *cspA* e *cspB*. Quando analisamos a frequência de obtenção de mutantes múltiplos para os genes codificantes para as CSPs, como esperado o mutante triplo apresentou uma eficiência de 5 a 10 vezes menor que a de obtenção dos mutantes duplos. Isto sugere que a contribuição de cada CSP na célula não seja completamente compensada pelas demais, na medida em que, via de regra, deleções combinadas tendem a apresentar frequências menores que as observadas nas mutações simples.

Apesar de apresentar a menor frequência de recombinação gerando mutantes simples, a ausência de *cspC* quando combinada à outras mutações surtiu efeito apenas em $\Delta cspA\Delta cspC::\Omega Spec^r$, uma vez que nos mutantes $\Delta cspB\Delta cspC::\Omega Spec^r$ e $\Delta cspC::\Omega Spec^r\Delta cspD$ apresentam frequências similares à da deleção dos genes individualmente. Essa independência sugere que as funções desempenhadas por CspC sejam ímpares e bastante diferentes das desempenhadas por CspA, CspB e CspD, com pouca sobreposição de papéis. As linhagens deletadas combinadas com a deleção do gene *cspA*, mostraram frequências similares independentemente das combinações efetuadas, porém, todas menores que a apresentada pelo mutante simples $\Delta cspA$.

A deleção de *cspB* apresentou as maiores frequências de recombinação gerando mutantes, sendo que apenas a sua combinação com *cspA* surtiu efeito aditivo. A frequência de recombinantes gerando mutantes duplos em relação a apresentada por $\Delta cspA$ e $\Delta cspB$ foi menor, evidenciando alguma sobreposição de funções, não compensada pelas demais.

No que diz respeito às combinações de deleção com $\Delta cspD$, apenas a linhagem $\Delta cspA\Delta cspD$ apresentou frequência similar à do mutante simples, sendo que intrigantemente, todas as outras combinações duplas foram 2 vezes mais

frequentes. É possível que CspD possua sobreposição de função com as CSPs remanescentes de maneira pouco específica e que sua ausência cause a superexpressão das mesmas, diminuindo o efeito sobre as frequências de recombinação nas duplas mutações combinadas com a ausência de *cspD*.

Para facilitar a leitura e compreensão dos resultados, os mutantes $\Delta cspA$, $\Delta cspB$, $\Delta cspC::\Omega Spec^r$, $\Delta cspD$, $\Delta cspA\Delta cspB$, $\Delta cspA\Delta cspC::\Omega Spec^r$, $\Delta cspA\Delta cspD$, $\Delta cspB\Delta cspC::\Omega Spec^r$, $\Delta cspB\Delta cspD$, $\Delta cspC::\Omega Spec^r\Delta cspD$ e $\Delta cspA\Delta cspB::\Omega Spec^r\Delta cspD$ serão referidos respectivamente como ΔA , ΔB , ΔC , ΔD , ΔAB , ΔAC , ΔAD , ΔBC , ΔBD , ΔCD e ΔABD .

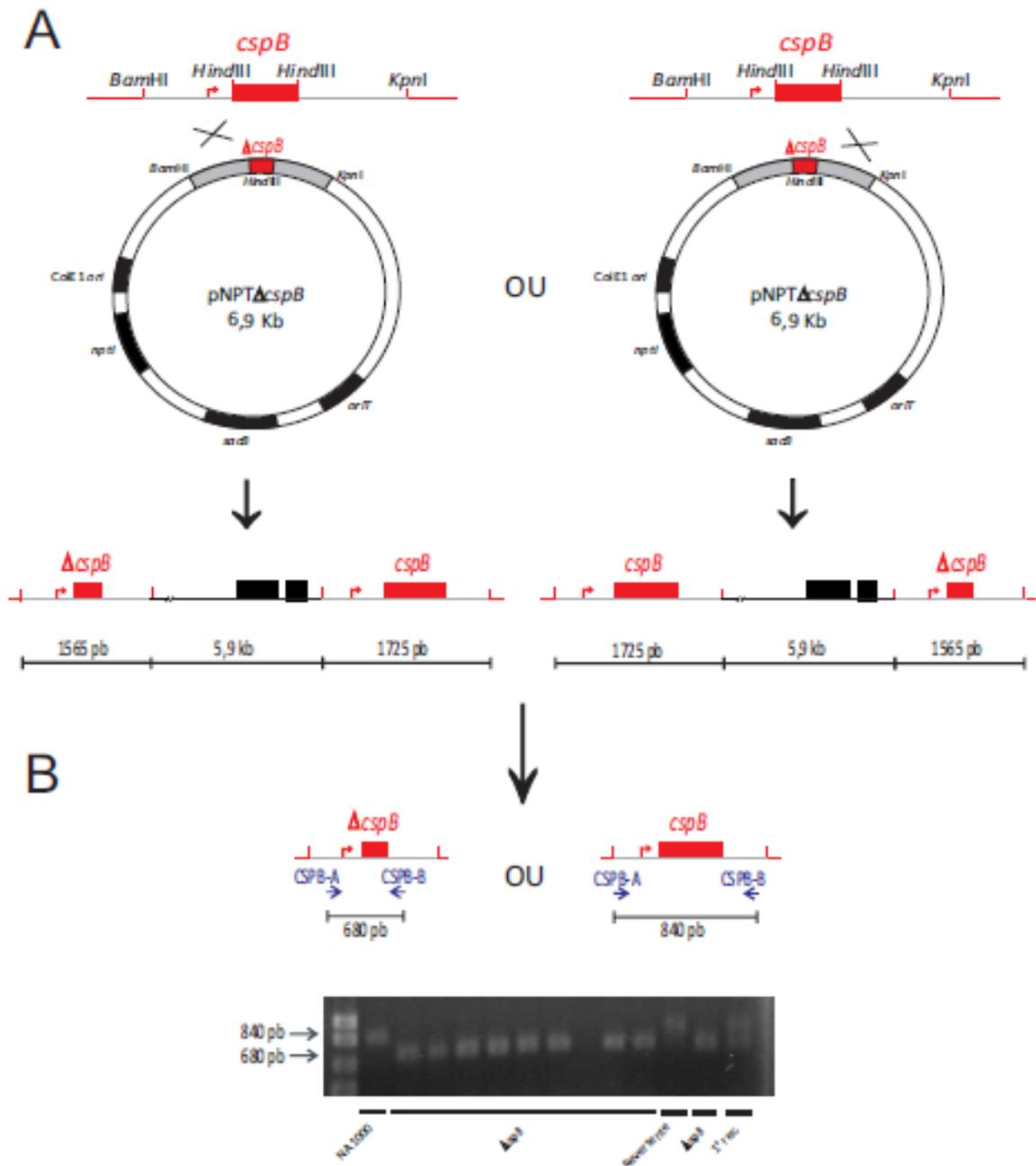


Figura 10. Estrat6gia de mutag6nese adotada na dele77o de *cspB*. Em (A) est77o evidenciadas as duas poss6veis recombina77es prim77rias onde ocorre a integra77o do plasm6deo pNPTS138 carregando a c6pia deletada de *cspB* ao gen6mio de *Caulobacter crescentus*. Em (B) est77o representadas as duas resolu77es poss6veis com o segundo evento de recombina77o hom6loga podendo gerar uma linhagem mutante ou reverter para o gen6tipo selvagem. Os oligonucleot6deos CSPB-A e CSPB-B foram utilizados para averiguar quais linhagens sofreram a muta77o (banda de 680 pb) e quais reverteram para o gen6tipo selvagem (banda de 840 pb).

4.2.2 Caracterização dos mutantes das CSPs de *Caulobacter crescentus* em relação a baixas temperaturas

Inicialmente curvas de crescimento a 15 graus foram realizadas a fim de determinar se os mutantes apresentavam fenótipos relacionados à baixa temperatura, porém, nenhuma (exceto ΔC) das linhagens obtidas até então mostrou sensibilidade ao frio quando crescidas em meio PYE a 15° C (dado não mostrado). Uma possível explicação para isto seria que a temperatura utilizada para a determinação do fenótipo de sensibilidade ao frio não fosse a mais adequada, uma vez que se apresentava apenas 15 graus abaixo da temperatura de crescimento, enquanto que nos estudos realizados em *E. coli*, por exemplo, esta temperatura se encontra 22 graus abaixo da temperatura ótima de crescimento. Ainda seria possível que este tipo de fenótipo não fosse facilmente visualizável por meio de curva de crescimento, o que exigiria a adoção de metodologias como a de semeadura das culturas com contagem de UFCs a fim de verificar a viabilidade das células após a queda de temperatura.

Assim, os ensaios de caracterização de fenótipos de sensibilidade ao frio foram realizados a 10 °C por meio de curvas de crescimento (dado não mostrado) e também contagem de UFCs ao longo da incubação. A determinação da sobrevivência se deu através da comparação das UFCs obtidas ao longo da curva de crescimento a 10 graus em PYE com as UFCs obtidas no ponto inicial da curva. Estes experimentos foram executados para as linhagens NA1000, NA1000+pMR20*cspA*, NA1000+pMR20*cspAcspB*, ΔA , ΔA +pMR20*cspA*, ΔB , ΔC , ΔD , ΔAB , ΔAB +pMR20*cspAcspB*, ΔAC , ΔAD , ΔBC , ΔBD , ΔCD e ΔABD .

As linhagens carregando deleções únicas nos genes *cspB* e *cspD*, ou ainda as linhagens ΔAD , e ΔBD não apresentaram fenótipo de sensibilidade a baixas temperaturas. Embora ΔCD tenha mostrado um pequeno atraso no crescimento no início da curva, o crescimento normal foi retomado nos pontos seguintes a uma taxa similar apresentada pela linhagem parental no início do estresse. As linhagens ΔBC e ΔC apresentaram a mesma ligeira redução da taxa de crescimento em 10 °C, sugerindo que apenas a deleção de *cspC* seja necessária para conferir esse fenótipo (Fig. 11A).

As linhagens ΔAB e ΔABD , que possuem deleções das duas CSPs que são induzidas no choque-frio e ΔA , mostraram-se mais sensíveis à queda de temperatura que a linhagem NA1000, uma vez que apresentaram um grande atraso no crescimento em baixa temperatura com retomada do crescimento com a taxa de

multiplicação bastante inferior à apresentada pela linhagem selvagem NA1000. A adição de uma cópia extra *in trans* do gene *cspA* ou ambos *cspA* e *cspB* não conferiu à linhagem selvagem melhora na capacidade de adaptação ao frio. A adição da cópia selvagem *in trans* de *cspA* em ΔA ou *cspA* e *cspB* simultaneamente em ΔAB reverteram completamente os fenótipos de deficiência de crescimento em 10°C apresentada pelas respectivas linhagens mutantes (Fig. 11B).

O mutante ΔAC apresentou a maior sensibilidade a 10 graus de todos os mutantes, sendo o único a apresentar queda de viabilidade, que ocorreu na fase inicial da aplicação do frio (primeiras 24 horas) com uma breve retomada de crescimento entre 24 e 48 horas e posteriormente estacionando até o final do experimento, evidenciando que o possível envolvimento de CspC na resposta a baixa temperatura seja mais tardia, após as 48 h de incubação.

De acordo com os experimentos de viabilidade realizados (em PYE a 10 °C) até o momento, é possível concluir que a presença das demais CSPs na célula não é suficiente para suprimir a ausência de *cspA* e *cspB* conjuntas e prover a adaptação adequada as baixas temperaturas. Por outro lado a presença de *cspB* não garante o funcionamento adequado da maquinaria celular em baixas temperaturas quando *cspA* e *cspC* estão deletadas e, esta sensibilidade poderia ser devido ao fato de *cspA* e *cspC* serem as CSPs mais abundantes na célula mesmo em condições normais de crescimento (em fase exponencial sem estresse).

Outro dado relevante no estudo dos fenótipos dos mutantes das CSPs de *Caulobacter* é o fato de ΔC (BALHESTEROS, 2009), ΔAC e ΔCD (Fig. 12) apresentarem retardo nas taxas de crescimento mesmo em fase exponencial de crescimento a 30 °C, o que sugere que embora CspC seja induzida apenas em fase estacionária, aparentemente esta possui algum papel na fase exponencial de crescimento e é possível que o fenótipo de sensibilidade observado em 10 °C possa ser um efeito pleiotrópico ao invés de uma resposta específica ao frio.

De posse dos dados referentes aos fenótipos apresentados nas diversas situações pelas combinações de deleção das *csp*s é possível concluir que há uma hierarquia geral de importância entre os produtos destes parálogos que depende da situação fisiológica na qual a célula se encontra, sendo que CspA e CspC aparentam ser as principais CSPs de *Caulobacter crescentus* em baixas temperaturas. Em *E. coli*, só são detectados fenótipos relacionados à baixa temperatura quando ao menos quatro CSPs são deletadas enquanto que em *B. subtilis* a deleção de duas das três CSPs existentes é necessária para a manifestação de fenótipo de deficiência de crescimento (XIA; KE; INOUE, 2001;

GRAUMANN et al., 1997). Em *L. monocytogenes* apenas a deleção da CSP mais fortemente induzida em baixa temperatura confere fenótipo de sensibilidade ao frio sem, no entanto, afetar o crescimento a 37 graus, diferentemente do que ocorre em *Bacillus* (GRAUMANN et al., 1997; SCHMID et al., 2009).

Tendo em vista que *C. crescentus* possui uma grande capacidade de sobrevivência ao congelamento a -80°C (MAZZON et al., 2008), decidimos avaliar se as CSPs exercem alguma contribuição para esta notável característica. As linhagens ΔA , ΔB , ΔC , ΔD , ΔAB , ΔAC , ΔAD , ΔBC , ΔBD , ΔCD e ΔABD apresentaram uma diminuição significativa do número de células viáveis após o congelamento a -80°C, mas não a -20°C (Fig. 13), o que foi estatisticamente aferido através do teste *t-Student*. Apesar de ΔA , ΔB , ΔC e ΔD possuírem fenótipo de sensibilidade a congelamento a -80 °C, intrigantemente a combinação das deleções não gerou efeitos aditivos ou sinérgicos no que diz respeito aos fenótipos de sensibilidade. Estes resultados indicam que as CSPs possuem algum envolvimento na resposta ao congelamento apenas em taxas de resfriamento rápido, porém, com pouco ou nenhum efeito no congelamento a -20 °C. O envolvimento de proteínas de choque frio na resistência ao congelamento já foi descrito para bactérias como *Bacillus subtilis*, *Lactococcus lactis* e *Lactobacillus plantarum* e também em *Arabidopsis thaliana*. Em *B. subtilis* a deleção de *cspB* impede a linhagem de adquirir criotolerância, evidenciando a participação desta CSP na sobrevivência ao congelamento, enquanto em *L. lactis* a superexpressão de *cspB*, *cspD* e *cspE* aumenta em até 10 vezes a sobrevivência das linhagens após quatro ciclos de congelamento/descongelamento quando comparados ao controle (WILLIMSKY, 1992; WOUTERS et al., 2000; WOUTERS et al., 2001). Em *L. plantarum* a superexpressão de *cspP*, mas não *cspL* e *cspC*, proporciona aumento na resistência ao congelamento após quatro a seis ciclos, evidenciando que apesar de estas proteínas compartilharem alto grau de similaridade, os papéis desempenhados por cada uma não são completamente sobrepostos ou redundantes. Em *Arabidopsis thaliana* a superexpressão da proteína AtCSP3, que contém um domínio CSD e é capaz de complementar o fenótipo de deficiência de crescimento a 15 °C da linhagem de *E. coli* BX04, confere maior resistência a congelamento quando comparadas ao controle (KIM; SASAKI; IMAI, 2009). Não foi esclarecido até o momento, qual o papel das CSPs na resposta adaptativa ao congelamento, entretanto, algumas hipóteses foram levantadas sugerindo a proteção dos ácidos nucleicos pelas CSPs de maneira específica ou não, podendo acarretar na regulação da expressão de genes importantes para a adaptação a esse estresse.

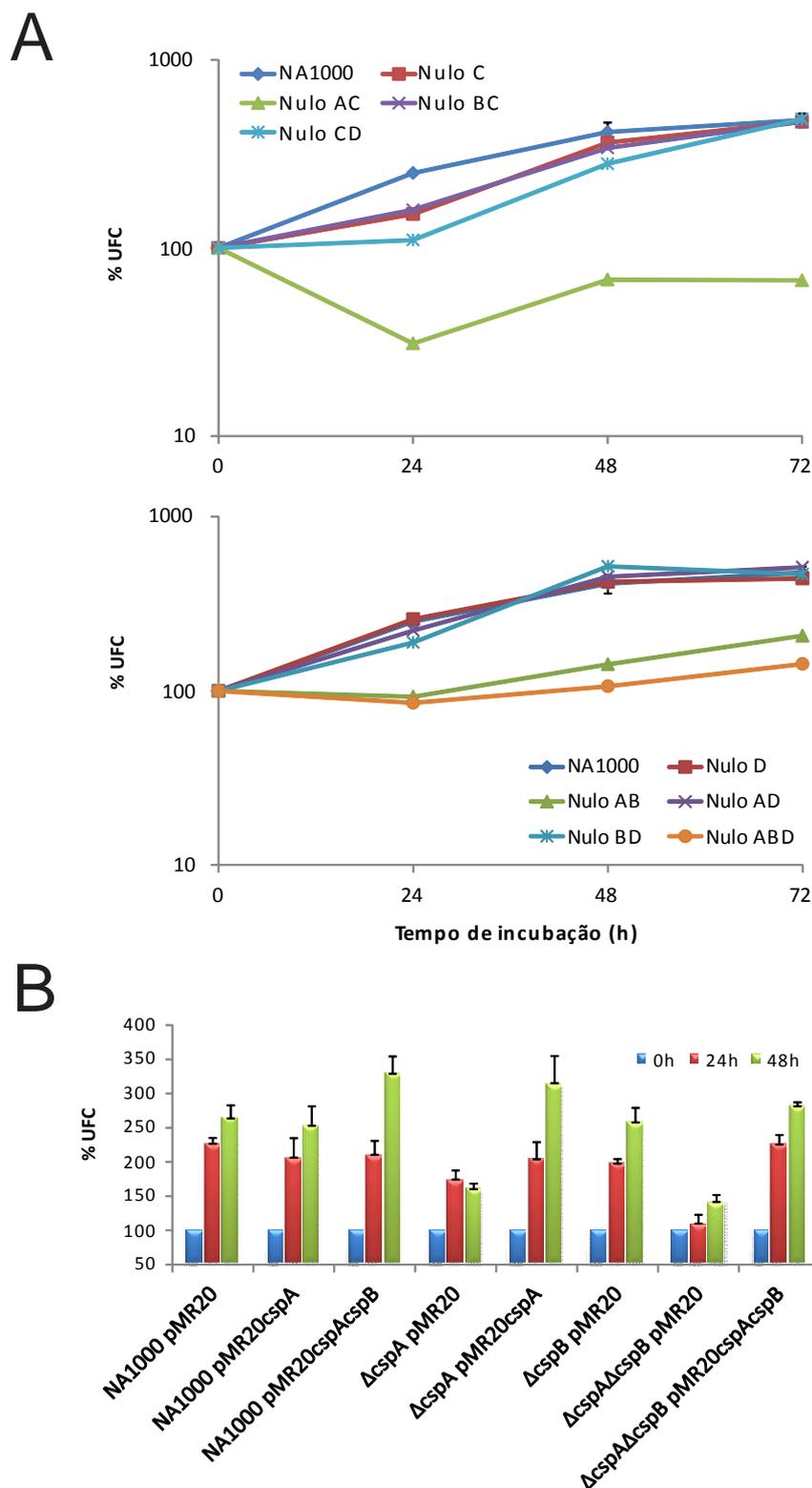


Figura 11. Ensaio de viabilidade a 10 °C das linhagens mutantes para genes codificantes das CSPs de *Caulobacter crescentus*. (A) As linhagens NA1000, ΔC, ΔD, ΔAB, ΔAC, ΔAD, ΔBC, ΔBD, ΔCD e ΔABD foram incubadas a 10 °C por 96 h e alíquotas foram tomadas a cada 24 h para a determinação das UFCs. (B) As linhagens NA1000+pMR20cspA, NA1000+pMR20cspAcspB, ΔA, ΔB, ΔAB, ΔA+pMR20cspA e ΔAB+pMR20cspAcspB foram submetidas a incubação 10 °C por 24 h para a determinação das UFCs. Os resultados representam médias de triplicatas biológicas e duplicatas técnicas. As barras pretas representam o desvio padrão.

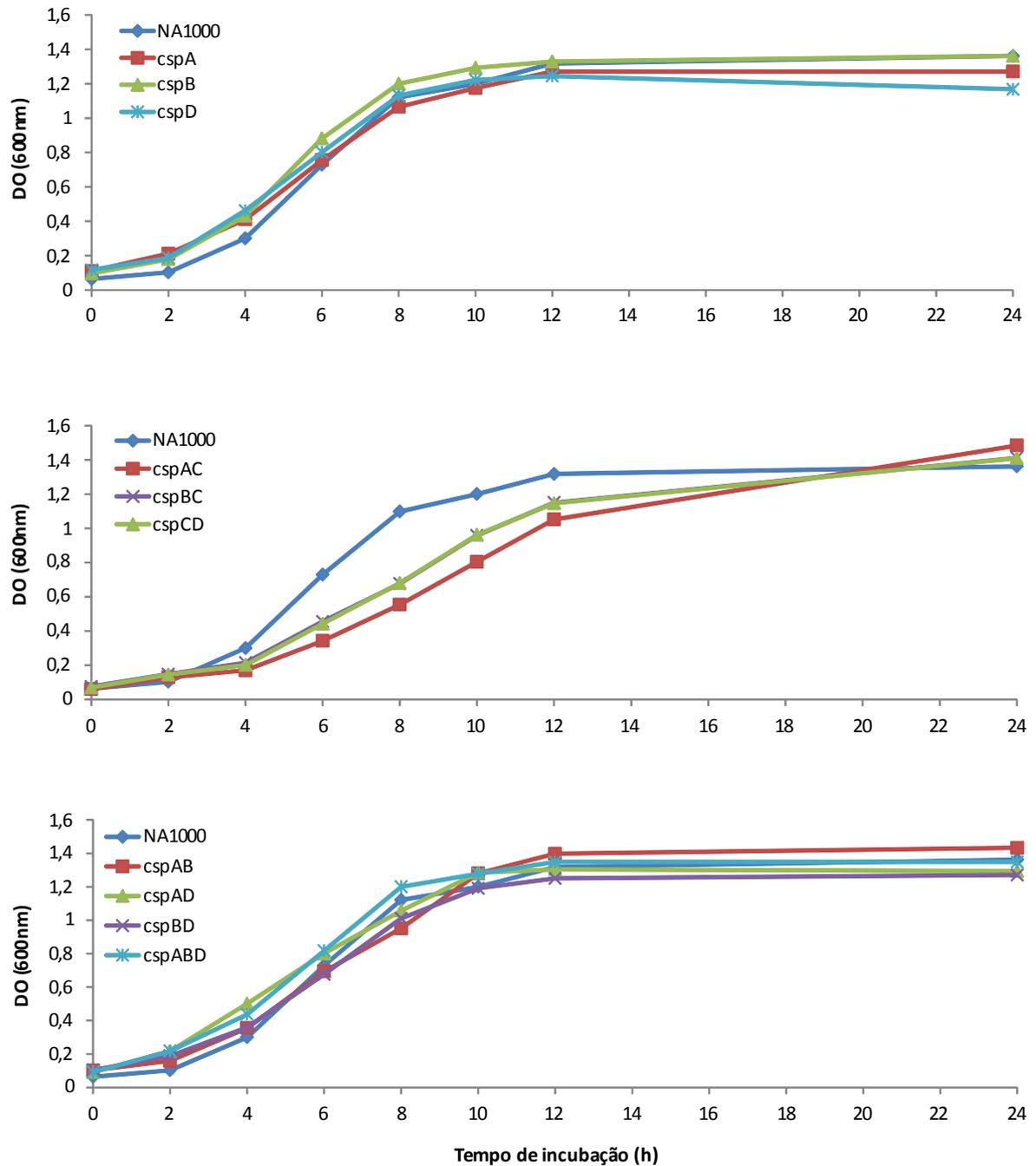


Figura 12. Curvas de crescimento das linhagens selvagem e mutantes de genes codificantes para proteínas de choque frio. As linhagens selvagem NA1000 e as linhagens mutantes ΔA , ΔB , ΔD , ΔAB , ΔAD , ΔBD , ΔABD , ΔAC , ΔBC e ΔCD foram crescidas a 30 °C e alíquotas foram retiradas a cada ponto para a determinação da densidade óptica da cultura.

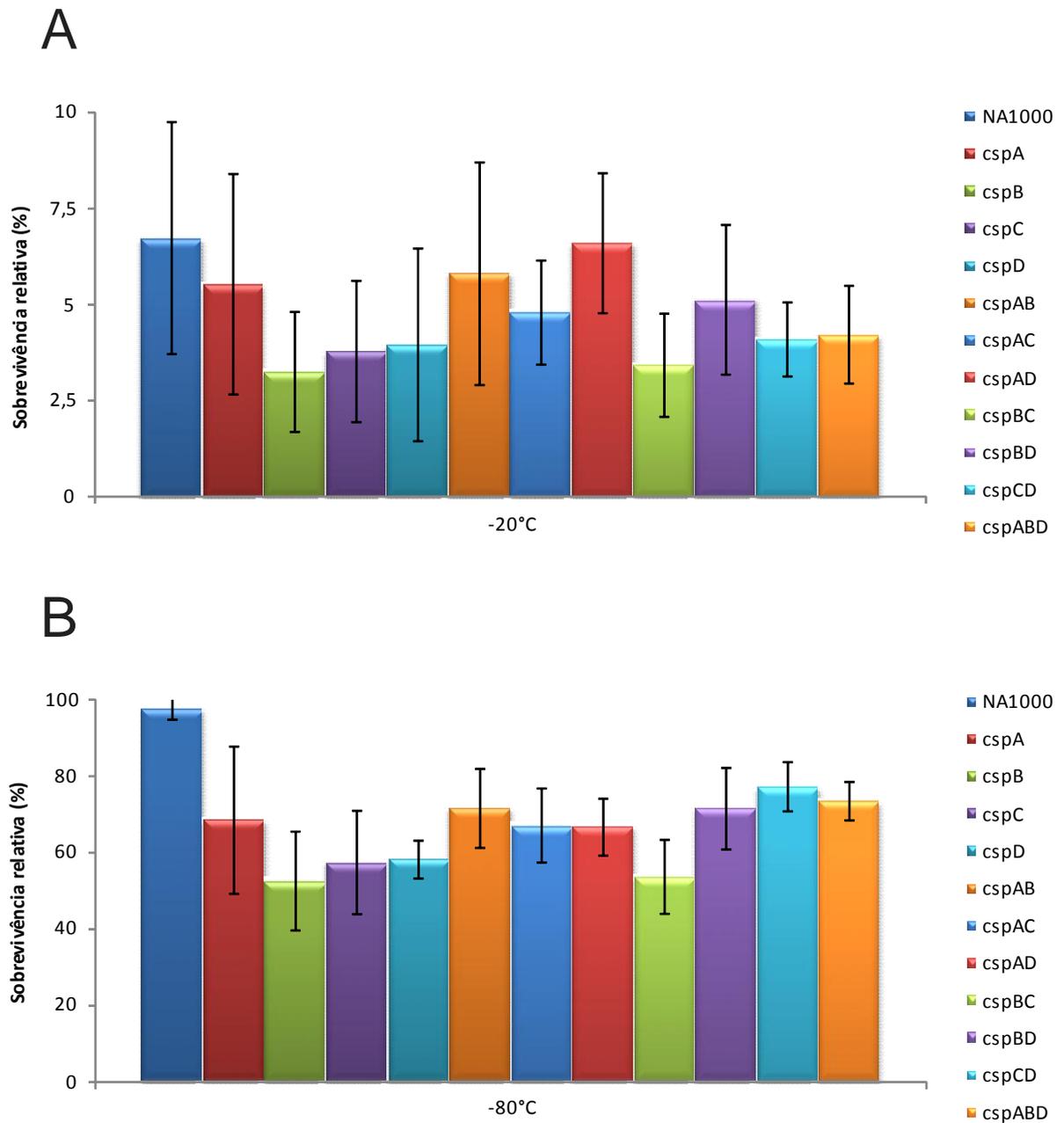


Figura 13. **Ensaio de determinação de sobrevivência a congelamento.** As linhagens NA1000, ΔA , ΔB , ΔC , ΔD , ΔAB , ΔAC , ΔAD , ΔBC , ΔBD , ΔCD e ΔABD foram submetidas a congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ (A) e $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (B). A sobrevivência relativa foi obtida comparando-se as UFCs obtidas após o congelamento em ambas as temperaturas com as UFCs obtidas antes do processo. Os resultados representam médias de triplicatas biológicas e duplicatas técnicas. As barras pretas representam o desvio padrão.

4.2.3 Caracterização dos mutantes das CSPs de *Caulobacter crescentus* em relação à fase estacionária

Além do envolvimento característico de genes desta família na resposta a baixas temperaturas, já está bem estabelecido que alguns genes codificando proteínas contendo domínios CSD não respondem à choque-frio, e podem ser constitutivos ou ainda induzidos em resposta a carência de carbono e nitrogênio, estresse osmótico, entrada em fase estacionária de crescimento, antibióticos, arsenato e peróxido de hidrogênio (CHANDA et al., 2009; DUVAL et al., 2010).

Para determinar o efeito da ausência das CSPs em fase estacionária, realizamos um ensaio de viabilidade no qual foram determinadas as UFCs no meio da fase logarítmica e 1, 2, 3, 7 e 14 dias após a inoculação.

Além de apresentar sensibilidade a baixas temperaturas, o mutante ΔAB , mas não o ΔABD , mostrou pronunciado aumento de número de células viáveis em fase estacionária precoce quando comparado à linhagem selvagem (Fig. 14A). A linhagem NA1000 possui uma acentuada queda no número de células viáveis nesta fase, quando incubada em meio PYE, com posterior retomada de crescimento, mas sem, no entanto, atingir os níveis anteriores aos da queda da viabilidade. Além disso, ao entrar na fase estacionária mais tardia a célula diferencia-se em um formato helicoidal, e se torna mais resistente a estresses (WORTINGER; QUARDOKUS; BRUN, 1998). Desta forma, optamos por avaliar as linhagens por microscopia utilizando a coloração LIVE/DEAD ao longo da fase estacionária precoce, com o intuito de verificar se esta linhagem possuía algum tipo de alteração ou adiantamento da diferenciação celular (Fig. 14B). A manutenção da integridade das membranas é um processo custoso energeticamente e, portanto, só pode ser desempenhada em células metabolicamente ativas. O corante LIVE/DEAD consiste de dois corantes de DNA, sendo um vermelho (iodeto de propídeo) que é barrado por membranas celulares, entrando apenas em células cuja integridade das membranas esteja comprometida, e o outro verde (SYTO-9) que atravessa facilmente as membranas celulares intactas. Sendo assim, células mortas coram-se em vermelho (a emissão de fluorescência deste corante é maior que a do corante verde, por isso células coradas com ambos são visualizadas apenas em vermelho) enquanto as células vivas coram-se apenas em verde. Podemos observar que ao longo da senescência da cultura, no início da fase estacionária há um aumento do número de células mortas na linhagem selvagem (vermelhas), enquanto que na linhagem mutante ΔAB este número praticamente permanece constante (Fig. 14C).

Este número fica em níveis bem mais baixos que os apresentados em quaisquer pontos amostrados da linhagem selvagem, assemelhando-se ao campo analisado da cultura em fase exponencial de crescimento, como explicitado na determinação da porcentagem de células mortas na população.

Estudos realizados com mutantes de outras bactérias onde um, dois ou três genes codificantes de CSPs são deletados, demonstram que existe um aumento da expressão das CSPs remanescentes, tanto em níveis transcricionais como em quantidade de proteínas. Este aumento na expressão das CSPs pode resultar na compensação da ausência das CSPs deletadas, impedindo assim a manifestação de fenótipos de deficiência de crescimento (XIA; KE; INOUE, 2001), o que evidencia certa redundância ou sobreposição de funções. Este inesperado fenótipo de menor redução de viabilidade na fase estacionária precoce exibido pela linhagem mutante ΔAB em comparação à selvagem, poderia ser um indício do aumento expressão das CSP remanescentes, que já são, normalmente, induzidas em fase estacionária.

A fim de verificar se a ausência de *cspA* e *cspB* estaria afetando o padrão de expressão das CSPs remanescentes, foi analisada a expressão de *cspC* e *cspD* na linhagem mutante ΔAB e na linhagem selvagem durante as 48 h primeiras horas da fase estacionária, etapa onde há a diferença de sobrevivência entre as duas linhagens.

O perfil de expressão de ambos os genes *cspC* e *cspD* mostrou-se alterado quando comparado às atividades de beta-galactosidase apresentadas pelas mesmas fusões transcricionais na linhagem NA1000 (Fig. 15). De acordo com esses resultados é possível notar que, apesar de não possuir níveis aumentados de transcrição na linhagem mutante, *cspC* atinge seus níveis máximos de expressão já em 24 h de incubação, cerca de 24 h antes do apresentado na linhagem selvagem. *cspD*, por sua vez, não mostrou diferença nos níveis de expressão em 24 h, mas um aumento de mais de 45% em sua expressão em 48 h de incubação. Estes resultados juntos, indicam que na ausência de CspA e CspB, a expressão das CSPs induzidas em fase estacionária sofre alteração temporal e também em níveis absolutos. Neste sentido, a expressão diferencial de *cspC* e *cspD* nesta linhagem poderia ser um indício de que CspA e CspB exibiriam papéis importantes também em temperatura ótima de crescimento e possivelmente em fase estacionária, a despeito de não serem induzidas nestas condições, uma vez que a ausência de ambas nesta fase altera o perfil de expressão das remanescentes.

Desta forma, assumindo que a alteração do padrão de expressão de *cspC* e *cspD* no mutante ΔAB resulte direta ou indiretamente no fenótipo de viabilidade

aumentada deste mutante, seria possível que as linhagens mutantes ΔC , ΔD e ΔCD apresentassem redução de número de células viáveis quando comparadas à linhagem NA1000. Os resultados (Fig. 16) mostram que ΔC apresenta queda de viabilidade similar à da linhagem NA1000, mas esta linhagem não é mais capaz de restaurar o número de unidades formadoras de colônia na fase estacionária tardia de crescimento, apresentando um número 10 vezes menor de UFCs que a linhagem NA1000 no ponto de 7 dias. Quando uma cópia do gene selvagem é colocada *in trans* nesta linhagem, este fenótipo é revertido, apresentando inclusive níveis de viabilidade celular maiores que os da linhagem selvagem. O mesmo acontece com a linhagem ΔCD , entretanto, nesta linhagem a queda nos níveis de sobrevivência em fase estacionária tardia é ainda maior que a apresentada por ΔC . Diferentemente do que acontece em *Bacillus subtilis* (GRAUMANN et al., 1997) a deleção das CSPs induzidas em fase estacionária não levou à lise das células quando da entrada nesta fase. ΔD , por sua vez, não apresentou alteração de sobrevivência em fase estacionária e tampouco a linhagem complementada mostrou-se diferente da NA1000. Embora em um plasmídeo de baixo número de cópias, a presença do gene *cspC* nesta construção complementada poderia estar gerando um desbalanço na quantidade final de proteína CspC devido ao número de cópias do gene, como evidenciado pelo ensaio de *immunoblot* de Balhesteros et al. (2010). Entretanto, não é possível afirmar que *cspD* estaria superexpresso na linhagem complementada porque aparentemente os níveis de proteína CspD nesta linhagem não diferem da encontrada na NA1000 (BALHESTEROS et al., 2010).

Estes resultados indicam que enquanto *cspC* sozinho é importante para o restauro do crescimento após a senescência transiente da cultura, a ausência de *cspC* e *cspD* causa uma adaptação ainda mais ineficiente à retomada do crescimento e uma pronunciada morte celular na fase estacionária tardia. Esta hipótese é apoiada pelo fato de que a linhagem mutante ΔABD apresenta o mesmo fenótipo da linhagem selvagem no que diz respeito à viabilidade em fase estacionária, indicando que *cspC* por si só não é capaz de manter os elevados níveis de viabilidade observados na linhagem ΔAB .

A morfologia e viabilidade das células de cada linhagem em fase exponencial de crescimento e após a entrada em fase estacionária foram analisadas por microscopia (Fig. 17). Após 72 h um grande número de células da linhagem NA1000 perde viabilidade, mas sem alterações morfológicas, o mesmo fenótipo observado para a linhagem ΔD . Entretanto, a linhagem ΔC apresenta células alongadas em fase estacionária, com algumas células com morfologia curva, muitas das quais não

mais viáveis. Esta morfologia já havia sido reportada por Balhesteros (2009) indicando que a introdução de uma cópia selvagem do gene *cspC* era capaz de restaurar a morfologia selvagem. A linhagem ΔCD possui morfologia ainda mais aberrante em fase estacionária, apresentando um número muito maior de células filamentosas cuja viabilidade fora perdida. Em Balhesteros et al. (2010), através de microscopias com corantes de membrana, foi evidenciado que estas células em forma de ferradura apresentadas pela linhagem ΔC possuíam um septo visível de membrana, indicando que algumas células ainda são capazes de continuar a divisão celular a despeito de sua morfologia anômala. Provavelmente a ausência destas CSPs de fase estacionária causam um efeito pleiotrópico na fisiologia das células, de modo a interferir no crescimento e nas mudanças morfológicas que acontecem em *C. crescentus* em fase estacionária (WORTINGER et al., 1998), dificultando mas não impedindo por completo o processo de divisão celular. As células filamentosas apresentadas em fase estacionária pela linhagem ΔCD não são resultado de comprometimento na replicação e partição dos cromossomos durante a replicação celular, uma vez que é possível visualizar pontos individualizados ao longo da célula correspondente aos nucleóides corados com iodeto de propídeo e, além disso, assim como observado para as células em formato de ferradura de ΔC , as células filamentosas de ΔCD também apresentam septos de membrana, mas neste caso possivelmente as células não são capazes de prosseguir no processo de divisão, eventualmente culminando na morte celular.

Lang e Marques (2004) descreveram que *CspC* e *CspD* são as duas CSPs de *C. crescentus* induzidas em fase estacionária, embora ainda restassem dúvidas a respeito da expressão de *cspB* em fase estacionária. Se *cspB* se tratar de um gene induzido em fase estacionária além de baixas temperaturas, este fato poderia explicar a diferença encontrada em relação a *Bacillus subtilis*, espécie na qual a deleção das duas únicas CSPs induzidas em fase estacionária leva a lise parcial da cultura após a entrada nessa fase do crescimento. Portanto, neste caso, *cspB* poderia estar impedindo este fenótipo.

Recentemente, no trabalho de da Silva et al. (2010) foi descrito o sistema de regulação de *cspD*, gene regulado transcricionalmente de forma direta por *SpdR*, um regulador de resposta de sistema de dois componentes responsável pela indução em fase estacionária deste parólogo. Outro componente transcricional da indução de *cspD* seria o segundo mensageiro ppGpp produzido por *spoT*, uma vez que na linhagem mutante *spoT* a expressão de *cspD* também fica comprometida. Por outro lado, *cspC*, o gene codificante para proteína de choque frio mais expresso

em fase estacionária, não se mostrou direta ou indiretamente regulado por SpdR (BALHESTEROS, 2009), tampouco por ppGpp, indicando que este gene sofre regulação diferente de *cspD* (DA SILVA, 2010, comunicação pessoal²).

A expressão de *cspB* em fase estacionária foi avaliada na linhagem selvagem e nas linhagens mutantes $\Delta spdR$, $\Delta spoT$ e $\Delta cspC$ a fim de averiguar se *cspB* seria induzido em fase estacionária e, em caso afirmativo, se esta indução seria dependente dos mesmos fatores que regulam *cspD*. Como podemos observar, *cspA*, usado como controle deste experimento, não sofre alteração de sua expressão quando comparamos os níveis transcricionais obtidos em fase exponencial de crescimento e fase estacionária (Fig. 18). O gene *cspB*, ao contrário mostrou uma indução de cerca 1,8 vez após 48 h da entrada em fase estacionária. Essa indução de *cspB* em fase estacionária aparentemente é dependente do regulador de resposta SpdR, uma vez que neste mutante os níveis de expressão de *cspB* ficam inalterados na fase estacionária, similares aos observados na fase exponencial de crescimento. Aparentemente ppGpp possui efeito menor na indução deste gene, apenas alterando sutilmente os níveis de expressão atingidos nesta fase. Surpreendentemente, a expressão de *cspB* na linhagem mutante ΔC , mostrou-se alterada de forma a apresentar a metade dos níveis absolutos de expressão da linhagem selvagem (dado não mostrado) mas ainda mantém a indução de fase estacionária (Fig. 18). É possível que o efeito de CspC sobre a expressão de *cspB* seja resultado da ação de CspC sobre o mensageiro de *cspB*, de forma a alterar sua estabilidade independente da fase de crescimento, ou agindo como antiterminador de transcrição de *cspB*.

² DA SILVA, A. P. T. São Paulo, 2010.

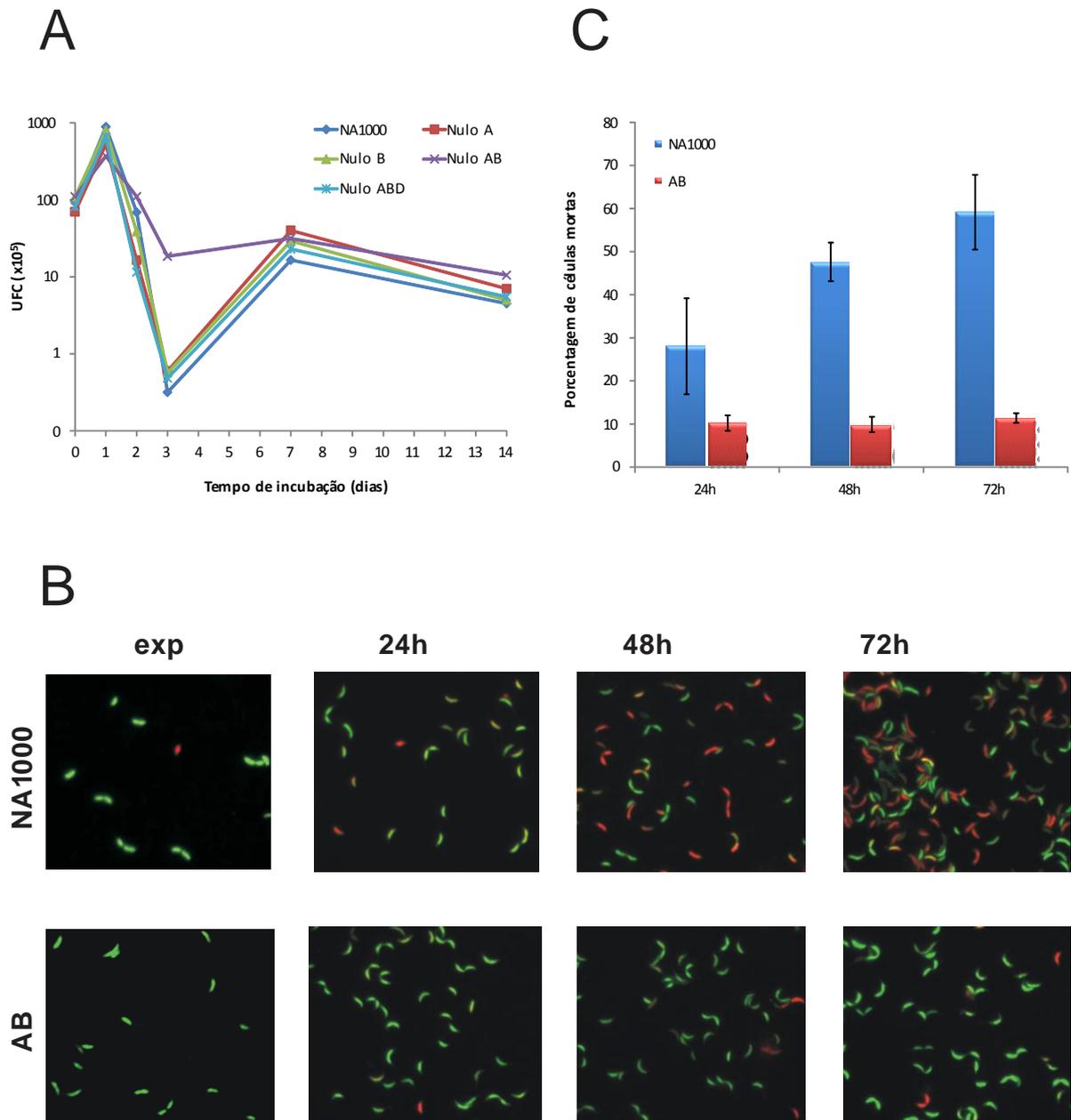


Figura 14. Avaliação da sobrevivência em fase estacionária das linhagens mutantes de CSPs induzidas em frio. (A) As linhagens selvagem NA1000 e mutantes ΔA , ΔB , ΔAB e ΔABD foram crescidas a 30 °C por 14 dias e alíquotas foram retiradas em cada ponto para a determinação das UFCs. (B) Aliquotas de culturas de NA1000 e ΔAB em fase exponencial de crescimento e de cada 24 h do início da fase estacionária foram observadas em microscópio com a utilização da coloração LIVE/DEAD. (C) Contagem de células coradas por iodeto de propídeo sobre o total de células do campo. Os resultados representam médias 5 campos de triplicatas biológicas (microscopias) ou médias de triplicatas biológicas e duplicatas técnicas (viabilidades). As barras pretas representam o desvio padrão.

FONTE: modificado de Balhesteros et al. (2010).

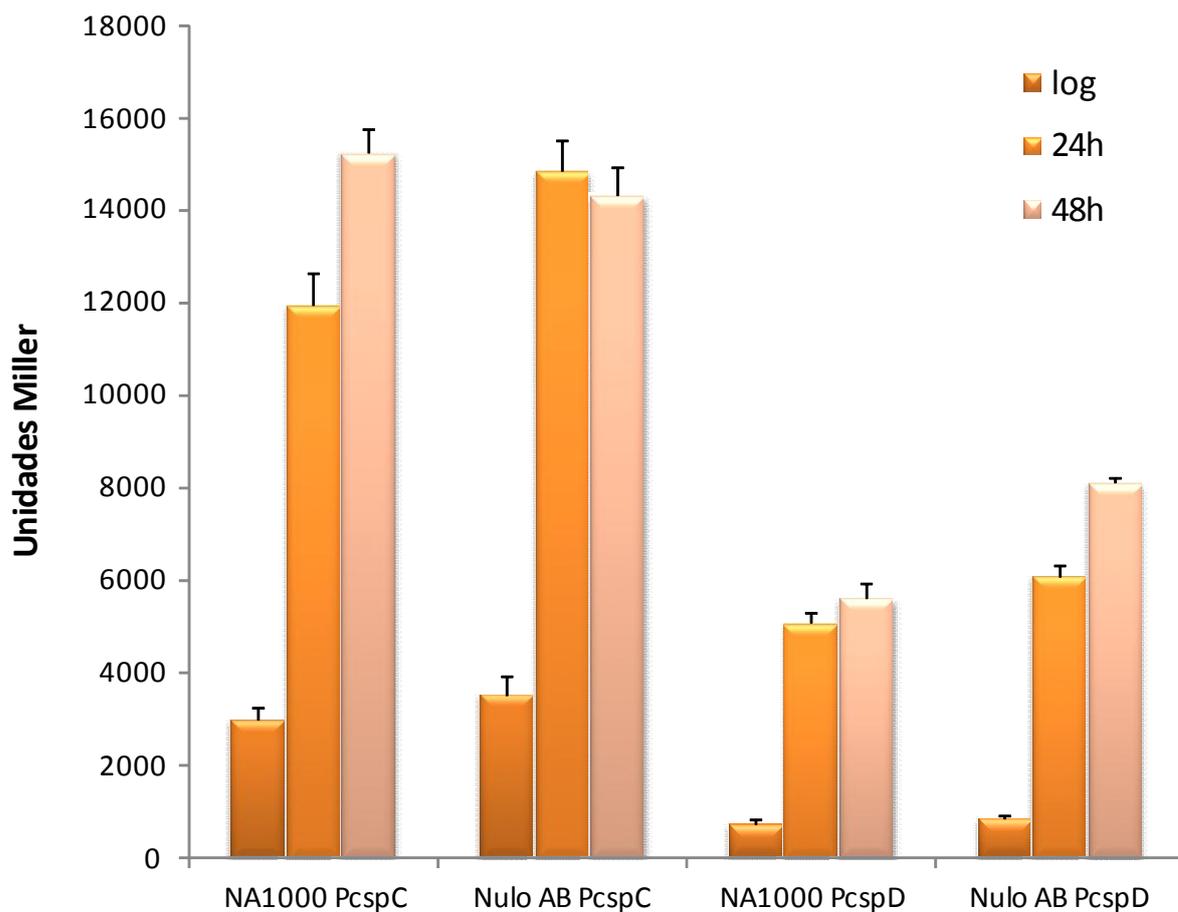


Figura 15. Ensaio de atividade de beta-galactosidase para determinação da expressão de *cspC* e *cspD* na linhagem mutante ΔAB . Culturas de NA1000 e ΔAB carregando o *PcspC/lacZ* e *PcspD/lacZ* foram crescidas em meio PYE a 30 °C. As culturas foram utilizadas para a determinação da atividade de beta-galactosidase em fase exponencial e após 24 h e 48 h de incubação. Os resultados representam médias de triplicatas biológicas e duplicatas técnicas. As barras pretas representam o desvio padrão.

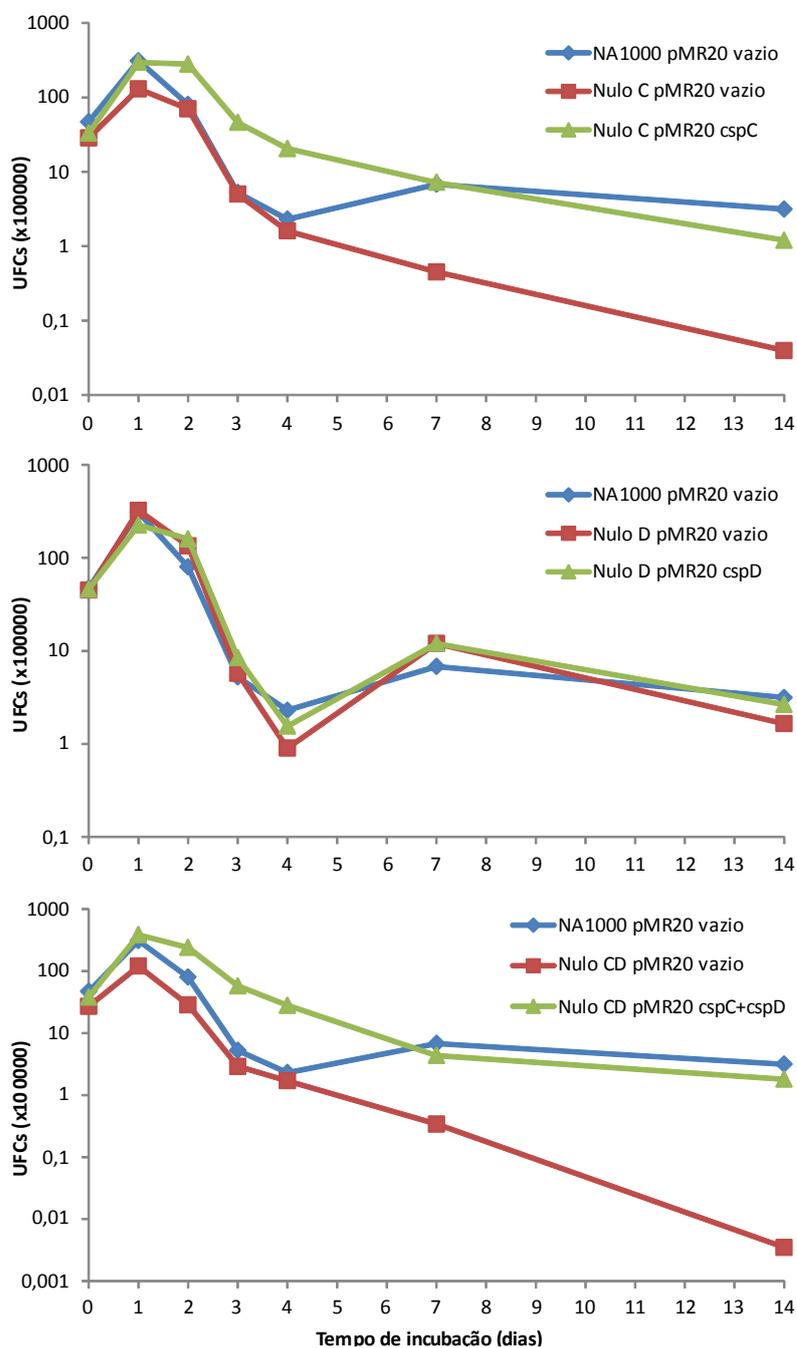


Figura 16. Ensaio de determinação de viabilidade ao longo da fase estacionária. As linhagens NA1000+pMR20, ΔC +pMR20, ΔC +pMR20cspC, ΔD +pMR20, ΔD +pMR20cspD, ΔCD +pMR20 e ΔCD pMR20cspC+cspD foram incubadas em meio PYE a 30 °C por 14 dias e alíquotas foram retiradas a cada 24 h nos primeiros 4 dias e outras duas no sétimo e décimo quarto dia de incubação para tomada das UFCs das culturas. FONTE: modificado de Balhesteros et al. (2010).

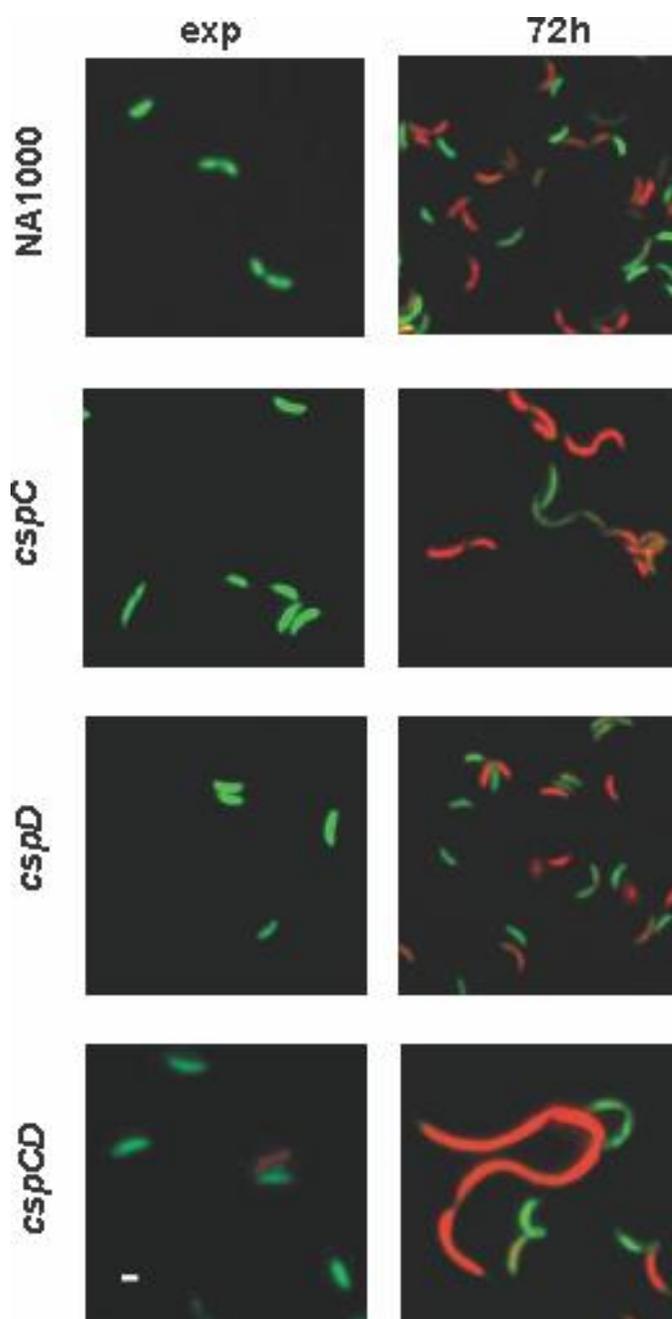


Figura 17. Visualização das morfologias das linhagens mutantes de genes codificantes para proteínas de choque frio induzidas em fase estacionária. Culturas de NA1000 e mutantes ΔC , ΔD e ΔCD em fase exponencial de crescimento e após 72 h de entrada na fase estacionária foram visualizados em microscópio utilizando a coloração LIVE/DEAD a fim de determinar as morfologias das células viáveis. A barra branca na figura representa 1 μ m de comprimento.

FONTE: modificado de Balhesteros et al. (2010).

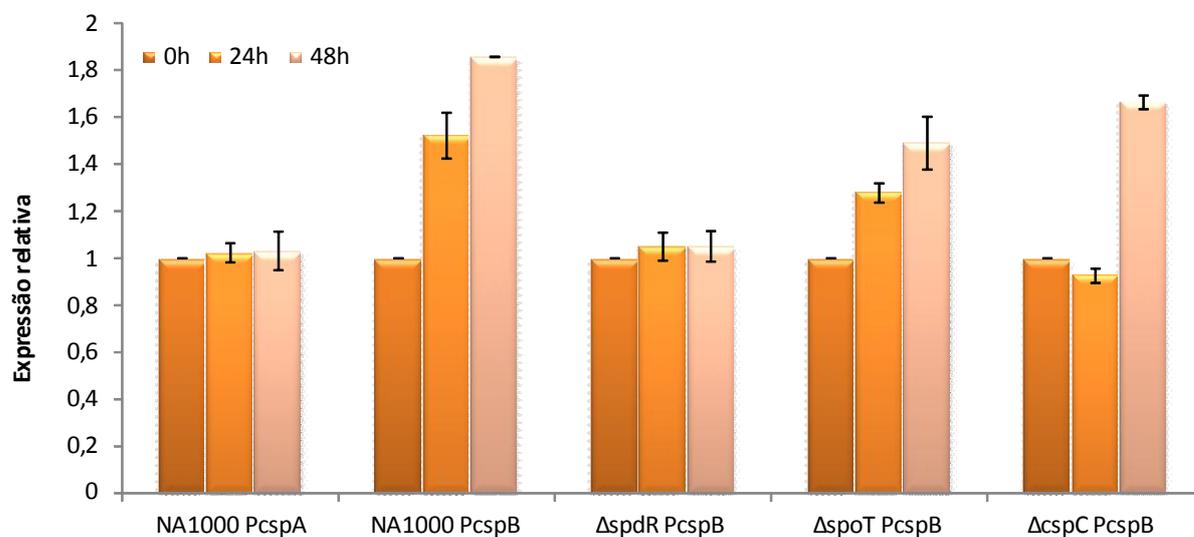


Figura 18. Ensaio de atividade de beta-galactosidase para a determinação do padrão de expressão de *cspA* e *cspB* em fase estacionária de crescimento. A linhagem NA1000 carregando a fusão *PcspA/lacZ* e as linhagens NA1000, Δ *spdR*, Δ *spoT* e Δ *cspC* carregando a fusão *PcspB/lacZ* foram crescidas meio PYE a 30 °C e utilizadas para a determinação da atividade de beta-galactosidase em fase exponencial e após 24 h e 48 h da entrada das culturas em fase estacionária. Os valores representam a média de experimentos com duas replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam os desvios padrão obtidos.

4.2.4 Estudo da regulação das CSPs induzidas em baixas temperaturas

A queda de temperatura resulta na inibição do crescimento e proliferação das células, além da alteração do padrão de expressão das proteínas, sendo que a síntese da maioria das proteínas é inibida após a queda de temperatura (JONES; VANBOGELEN; NEIDHARDT, 1987). A expressão de grande parte das proteínas de choque-frio ocorre durante a fase de adaptação chamada aclimatação. Depois desta fase, o nível de expressão das CSPs diminui e um novo padrão geral de expressão de proteínas é estabelecido (INOUYE e PHADTARE, 2004). Estudos realizados com mutantes de várias bactérias onde um, dois ou três genes codificantes de CSPs foram deletados, demonstraram que existe um aumento da expressão das CSPs remanescentes, tanto em níveis transcricionais como em quantidade de proteínas. Este aumento na expressão das CSPs pode resultar na compensação da ausência das CSPs deletadas, impedindo assim a manifestação de fenótipos de deficiência de crescimento (XIA; KE; INOUYE, 2001).

De forma semelhante, foi observado em *Caulobacter* que a deleção de apenas uma CSP não é suficiente para a manifestação de fenótipo exclusivo de sensibilidade a frio, apenas a deleção dupla das CSPs induzidas em frio ou das duas CSPs mais abundantes da célula (CspA e CspC) são capazes de alterar a adaptabilidade da bactéria, sendo que na segunda combinação o crescimento em temperatura ótima também fica comprometido. O mutante ΔC possui deficiência de crescimento mesmo em temperatura ótima e, portanto, não é possível determinar se o fenótipo de sensibilidade a frio desta linhagem é resultado de uma condição pleiotrópica ou da ausência de resposta específica desempenhada por CspC nesta condição. De posse destes dados, resolvemos verificar as condições de expressão em que se encontravam as CSPs remanescentes em algumas linhagens mutantes. Para tanto, utilizamos os promotores de *cspA* e *cspB* em fusões de transcrição com o gene repórter *lacZ*, para determinar através de ensaios de atividade de β -galactosidase a atividade dos promotores nas condições testadas. A fusão *PcspA::lacZ* foi inserida nas linhagens NA1000, ΔA , ΔB , ΔC , ΔD , ΔBC , ΔBD e ΔCD (Fig. 19A) e a fusão *PcspB::lacZ* nas linhagens ΔA , ΔB , ΔC , ΔD , ΔAC , ΔAD e ΔCD (Fig. 19B). Foi realizada a medida de suas atividades em fase logarítmica a 30 graus e depois de 1 h, 2 h e 5 h de incubação a 10 graus. Segundo este experimento podemos observar que não existem grandes diferenças quanto a expressão de *cspA* após o choque frio nas linhagens mutantes ΔA , ΔB , ΔD e ΔBD comparados à NA1000. Bae et al. (1997) e Brandi et al. (1999) mostraram que CspA de *E. coli* atua

em sua própria região 5'-UTR com o intuito de desestabilizar seu mensageiro e promover uma alça de retroalimentação negativa após a fase de aclimação. Como podemos ver, CspA aparentemente não é autorregulado em *C. crescentus*, na medida em que os níveis de expressão de sua fusão transcricional (que carrega a região 5'-UTR completa) não se mostra diferente na linhagem ΔA dos apresentados pela linhagem selvagem. Tampouco *cspA* mostra-se mais expresso no mutante ΔB indicando que na ausência de uma CSP induzida no frio, a expressão da outra não é aumentada.

Quando analisamos a expressão de *PcspA/lacZ* no mutante ΔCD , podemos notar que *cspA* apresenta-se mais expresso na fase inicial do choque-frio, sendo essa diferença perdida após 5 horas de incubação a 10 °C. Nos mutantes ΔC e ΔBC os níveis de expressão apresentados por *cspA* estão ligeiramente diminuídos quando comparados à linhagem NA1000.

No que diz respeito à expressão de *cspB*, podemos observar que nos mutantes ΔC , ΔAC e ΔCD a expressão deste gene encontra-se cerca de 50% menor já em 30 °C, sendo que sua indução em nível transcricional após o choque frio também aparenta estar parcialmente comprometida. A expressão de *PcspB/lacZ* na linhagem mutante ΔB não se mostrou diferente da apresentada pela linhagem NA1000, indicando que, assim como *cspA*, *cspB* não é autorregulado em *C. crescentus*. A expressão de *cspB* aparece ligeiramente menor nos mutantes ΔD e ΔAD apenas após 5 h de incubação em baixa temperatura. Estes resultados sugerem que CspC desempenhe algum papel importante na expressão de ambas *csp*s de frio, com maior importância na expressão de *cspB* e afetando *cspA* apenas durante o choque frio.

Não foi descrito, até o momento, nenhuma regulação transcricional das CSPs através da associação com elementos *in trans* na resposta a choque-frio, sendo que a indução dos genes envolvidos nesta resposta se dá principalmente via estabilização do mRNA (FANG et al., 1997; GIULIODORI et al., 2010) e tradução preferencial (GIULIODORI et al., 2004; GIULIODORI et al., 2007; GUALERZI; GIULIODORI; PON, 2003). Em *E. coli*, *cspA* é regulado transcionalmente pelos fatores Fis e H-NS de forma antagônica apenas a 37 °C e não durante o choque frio (BAE; JONES; INOUE, 1997; BRANDI et al., 1999). CspE (primordialmente a 37 °C) e CspA (durante a fase de aclimação) também regulam a expressão de *cspA*, porém não através de estabilidade de mRNA e sim aumentando o tempo de pausa da RNA polimerase na região da chamada *Cold box*, no início da região 5'-UTR, o que diminuía a expressão de *cspA* na ordem de 5 vezes (BAE et al. 1999). Em *E. coli*

deleções na porção 5'-UTR de *cspA* não comprometem a estabilidade da mensagem a 37 °C, mais uma vez indicando que possivelmente esta região esteja envolvida na terminação prematura da transcrição deste gene e não na repressão do gene por desestabilização do mRNA a 37 °C (FANG; XIA; INOUE, 1999). Assim, o envolvimento de CspC na expressão de *cspA* possivelmente esteja relacionado à estabilidade do mRNA deste gene e não à atividade antiterminadora uma vez que o efeito de sua ausência é observado apenas em frio, condição onde a indução se dá por estabilização de mensagem e não via ativação de promotor. Entretanto, para *cspB* a hipótese de atividade antiterminadora de CspC não pode ser descartada, uma vez que o efeito em sua expressão é observado independente da temperatura, o que possibilitaria a ação sobre a transcrição e não exclusivamente na estabilização de mensageiro. De forma similar à descrita para CspC em relação a *cspA*, CspD poderia ter alguma influência menor sobre a estabilidade da mensagem de *cspB* no frio. Por fim, notamos que, na ausência das duas *csp*s induzidas em fase estacionária, quando as células são submetidas ao choque frio *cspA* apresenta uma expressão maior que na NA1000, o que não acontece com *cspB* nas mesmas condições. O aumento dos níveis de expressão de *cspA* na linhagem mutante ΔCD , mais uma vez sugere que os papéis desempenhados pelas CSPs de fase estacionária e de resposta a frio sejam ao menos parcialmente sobrepostos.

Como mencionado anteriormente, a expressão de *cspC* e *cspD* na linhagem mutante ΔAB em fase estacionária mostrava-se alterada, mostrando mais uma vez compensação de expressão por parálogos supostamente envolvidos em respostas fisiológicas distintas. Desta forma, resolvemos avaliar se também sob choque-frio a expressão de *cspC* e *cspD* estaria alterada na linhagem mutante ΔAB (Fig. 20) e, como podemos observar, a expressão de *cspC* mostra-se aumentada na linhagem ΔAB quando comparada à NA1000 apenas após o choque-frio e não em temperatura ótima de crescimento, enquanto *cspD* não mostrou alteração no seu perfil de expressão entre as duas linhagens. Este resultado sugere que CspC tenha alguma sobreposição de funções com CspA e/ou CspB na resposta às baixas temperaturas, entretanto, como relatado anteriormente no experimento de viabilidade (Fig. 11), este aumento transcricional da expressão de *cspC* não é capaz de suprir a ausência de CspA e CspB, de modo que a linhagem ΔAB apresenta fenótipo de sensibilidade a baixas temperaturas.

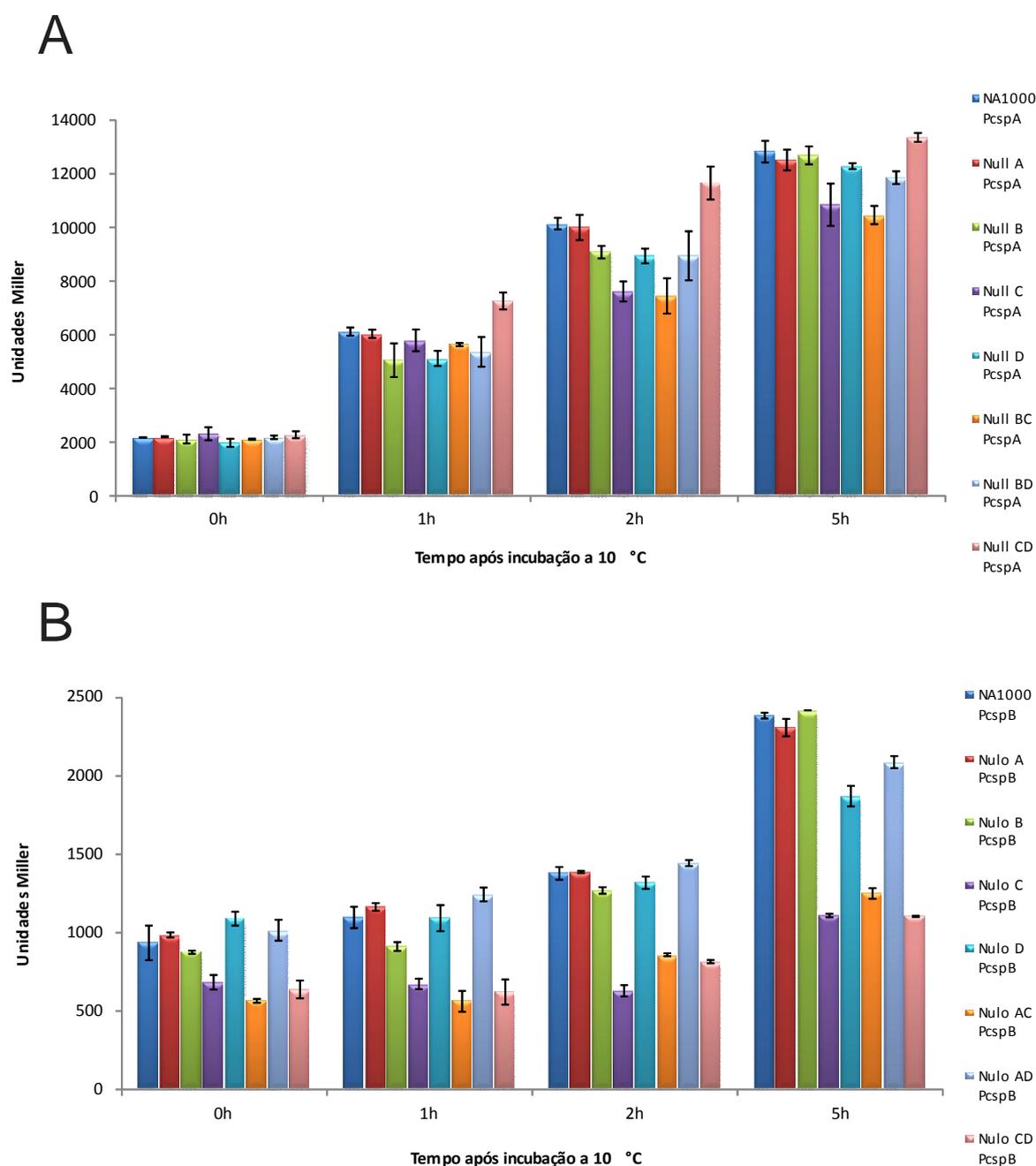


Figura 19. Ensaio de atividade de beta-galactosidase para determinação do perfil de expressão de *cspA* e *cspB* nas linhagens mutantes durante a adaptação ao frio. (A) as linhagens NA1000, ΔA , ΔB , ΔC , ΔD , ΔBC , ΔBD e ΔCD carregando a fusão *PcpsA/lacZ* e (B) NA1000, ΔA , ΔB , ΔC , ΔD , ΔAC , ΔAD e ΔCD carregando a fusão *PcpsB/lacZ* foram crescidas em meio PYE a 30 °C até atingirem o meio da fase exponencial quando então foram transferidas para 10 °C por 5 h. Aliquotas foram retiradas imediatamente antes da mudança de temperatura de incubação e após 1 h, 2 h e 5 h de incubação em baixa temperatura para a determinação da atividade de beta-galactosidase. Os valores representam a média de experimentos com duas replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam os desvios padrão obtidos.

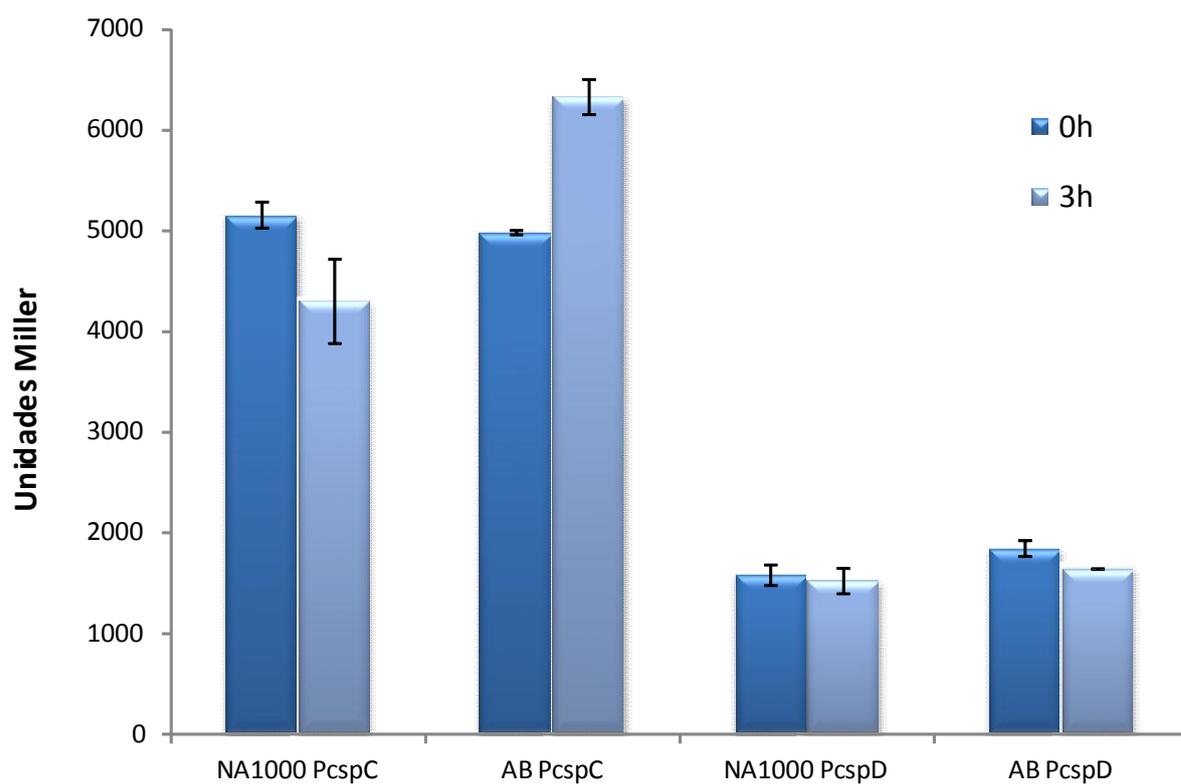


Figura 20. Ensaio de atividade de beta-galactosidase para a determinação do perfil de expressão de *cspC* e *cspD* nas linhagens NA1000 e Δ AB após o choque-frio. As linhagens NA1000 e Δ AB carregando as fusões transcricionais *PcspC/lacZ* e *PcspD/lacZ* foram crescidas em meio PYE a 30 °C até atingirem o meio da fase exponencial quando então foram transferidas para 10 °C por 3 h. Aliquotas foram retiradas imediatamente antes da mudança de temperatura de incubação e após 3 h de incubação em baixa temperatura para a determinação da atividade de beta-galactosidase. Os valores representam a média de experimentos com duas replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam os desvios padrão obtidos.

4.2.5 Estudo da indução de *cspA* e *cspB* em baixa temperatura

Como mencionado anteriormente o mecanismo pelo qual os genes são induzidos após o choque-frio baseia-se na estabilização do mRNA (FANG et al., 1997; GIULIODORI et al., 2010) e tradução preferencial (GIULIODORI et al., 2004; GIULIODORI et al., 2007; GUALERZI; GIULIODORI; PON, 2003).

A fim de determinar a meia-vida dos mensageiros de *cspA* e *cspB* em 30 graus e 10 graus, experimentos de PCR em tempo real foram realizados com cDNAs obtidos de RNAs de culturas tratadas com rifampicina por 20 minutos. A rifampicina é um antibiótico de bloqueia a transcrição de novos RNAs. Deste modo, neste experimento a síntese de RNA é bloqueada, mas não sua degradação e, a meia-vida dos mensageiros pode ser obtida analisando-se a abundância dos mesmos ao longo de um período de tempo. Os mensageiros de *cspA* e *cspB* sofrem estabilização quando as células são submetidas ao frio passando de cerca de 2,3 minutos (*cspA*) e 2 min (*cspB*) a 30 °C para 40 minutos (*cspA*) e 27,3 minutos (*cspB*) a 10 °C (Fig. 21). A diferença nos níveis de estabilização dos mensageiros de *cspA* e *cspB* refletem os níveis de indução nas fusões transcricionais. Nos ensaios de beta-galactosidase com as fusões transcricionais a expressão relativa de *cspA* após o choque-frio mostra-se na ordem de 1,5 vez a apresentada por *cspB*, e da mesma forma, a meia-vida do mensageiro de *cspA* é cerca de 1,5 vez maior que a de *cspB*.

A estabilização nos mRNA dos genes codificantes para as CSPs sugere que a indução destes genes seja similar ao descrito para outras espécies mais bem estudadas como *Escherichia coli*. Entretanto, é possível notar que os tempos de meia-vida dos mensageiros das CSPs de *Caulobacter* são maiores em condições ótimas de crescimento quando comparados aos apresentados por *cspA* de *E. coli*, cujo mRNA possui meia-vida de 12 segundos a 37 °C e 15 minutos a 15 °C (FANG et al., 1997), o que sugere que as CSPs de *Caulobacter* sejam, normalmente, mais expressas em temperatura ótima de crescimento que CspA de *E. coli*. Isto poderia ser uma diferença resultante do metabolismo de cada uma das bactérias, que apresentam tempos de geração de 2 h (*C. crescentus*) e 20 min (*E. coli*). Não podemos descartar, no entanto, que as temperaturas ótimas de crescimento para cada uma destas bactérias é distinta, sendo 30 °C para *Caulobacter* e 37 °C para *E. coli* e, esta diferença na temperatura pode se tratar de um importante fator físico na estruturação dos mRNAs afetando diretamente suas meia-vidas.

Yamanaka et al. (1999) realizaram uma análise mutacional na porção 5'-UTR do mRNA de *cspA* de *E. coli*, de modo a determinar regiões que seriam responsáveis

pelo aumento da estabilidade do mRNA. Ainda neste estudo foram determinadas duas regiões responsáveis pela regulação pós-transcricional positiva da expressão de CspA. A primeira está no início do transcrito, e foi descrita como um grampo formando uma estrutura secundária no mRNA responsável pela indução de CspA através da estabilização da mensagem em baixas temperaturas e repressão de CspA a 37°C. A segunda região chamada *Upstream box*, parecia com o rRNA 16S, levando a um aumento de afinidade pelo ribossomo e conseqüentemente recrutamento dos ribossomos de maneira mais eficiente em relação aos demais mRNAs celulares. Outros estudos, como de Mitta et al. (1997) e Etchegaray e Inouye (1999), demonstraram que a indução de *cspA* e *cspB* de *E. coli* só era completamente alcançada na presença de uma região chamada *Downstream box*, localizada nos 13 primeiros nucleotídeos da região codificante, que possivelmente atua como um facilitador da tradução. Estes dados a respeito do processo de indução das CSPs em baixa temperatura e da composição do 5'-UTR das mesmas, foram utilizados como base para a obtenção de construções que permitiram o estudo da expressão de *cspA* e *cspB* de *C. crescentus* durante o choque-frio.

A fim de identificar sequências na região promotora e também nas regiões não traduzidas do mRNA de *cspA* e *cspB* que pudessem fornecer indícios de uma regulação em comum, foi feito um alinhamento utilizando as sequências de aproximadamente 250 pares de base a montante dos inícios de tradução de ambos os genes como anotados no genoma (Fig. 22A). Outra região, constituída de 12 pares de bases (GTArAATTCGCG, onde r = G ou A) também bastante conservada entre as duas sequências e localizada cerca de 35 pares de bases a montante da região -35 predita para os promotores dos dois genes, foi incluída nas construções a serem estudadas. Esta região está posicionada sobre uma pequena repetição direta (AATkCG-5N-AATTCG, onde k= G ou T. Segundo este alinhamento, na porção 5' não traduzida dos mensageiros de *cspA* e *cspB* existe uma região de cerca de 13 nucleotídeos (UB) que apresenta um grau de conservação bastante alto (apenas uma base de divergência). A sequência de 13 nucleotídeos conservada no 5'-UTR mostrou pareamento com a sequência do gene do rRNA 16S de *Caulobacter crescentus* (Fig. 22B) assim como acontece em *E. coli* (Fig. 22C), mostrando-se parcialmente complementar a uma porção terminal do rRNA 16S entre a 1041^a e a 1053^a base da sequência, e configurando-se como uma possível região *Upstream box*. Portanto, esta região tornou-se um alvo em potencial para o estudo da regulação da expressão das CSPs e foi chamada de UB pela possibilidade de constituir esse elemento *in cis* de regulação. A potencial região *Upstream box* de

cspA e *cspB* de *C. crescentus*, aparentemente mostra-se restrita a estes genes, uma vez que uma busca *in silico* realizada com a sequência NAATTTGATCGT levando em consideração as regiões -1 a -80 do início de tradução dos genes anotados no genoma trazem apenas *cspA* e *cspB*. Entretanto, não é possível afirmar que este mecanismo seja restrito a estes genes, sendo possível que outras sequências sejam utilizadas para a interação com diferentes regiões do 16S rRNA. Além destas regiões descritas acima, os primeiros 26 pares de bases da região codificante de *cspA* e *cspB* foram incluídos como alvo de estudo para determinar se aí se encontra uma região *Downstream box* como a descrita em *E. coli*. Jiang et al. (1996) descreveram uma sequência de 11 nucleotídeos localizada na região dos primeiros 25 nucleotídeos do transcrito que esta envolvida na regulação de *cspA*, *cspB* e *csdA*. Esta região chamada de *Cold box* foi proposta como sendo um sítio de parada da polimerase promovido por *cspE* e *cspA* (BAE et al., 1999). O alinhamento das regiões 5'-UTR de *cspA* e *cspB* não indicou uma região clara de conservação no início do transcrito como ocorre em *E. coli*. Desta forma, a ausência de uma *Cold box* característica como a encontrada em *E. coli* seria uma explicação possível para a ausência de autorregulação dos genes *cspA* e *cspB* por seus produtos após a fase de aclimação (Fig. 19).

As regiões *Upstream box* e *Downstream box* em *E. coli* foram descritas como regiões de interação entre o rRNA 16S da subunidade ribossomal e o mRNA das CSPs, de modo a aumentar a afinidade do ribossomo pelo mensageiro, aumentando assim, a síntese das proteínas codificadas por estes mRNAs. Desta forma, os genes codificantes para o rRNA 16S de *Escherichia coli* e *Caulobacter crescentus* foram alinhados e, as regiões de interação com a sequência Shine-Dalgarno (SD) nos mRNAs das *csps*, as sequências *anti-upstream* (anti-UB) e *anti-downstream* (anti-DB) foram localizadas (Fig. 23). Esta comparação foi necessária para que fosse possível localizar as regiões de interação no modelo de estruturas secundária e terciária do 16S rRNA (Fig. 24). Podemos notar que a região de interação com a sequência Shine-Dalgarno nos mRNAs das CSPs de *Caulobacter* difere ligeiramente da anti-SD de *cspA* no rRNA 16S de *E. coli*, que apesar de estarem posicionadas no mesmo domínio 5' da estrutura descrita, situam-se em posições próximas, mas distintas. Da mesma maneira, as regiões anti-UB de *C. crescentus* e *E. coli* diferem em suas localizações, mas encontram-se no mesmo domínio estrutural 3' maior. A UB descrita para as CSPs de *E. coli* encontra-se apenas entre 4 e 11 nucleotídeos da sequência SD de seus mRNAs (Fig. 22C), diferentemente do que observamos em *Caulobacter*, onde esta distância é de cerca de 30 a 35 nucleotídeos (Fig. 22A). Esta

diferença poderia, no entanto, ser minimizada pela estruturação do mensageiro, o que poderia aproximar tridimensionalmente as regiões, possibilitando sua interação com as regiões específicas nos domínios apropriados do 16S rRNA.

De posse dos alinhamentos e dos pareamentos das sequências descritas acima, foi realizado um estudo da contribuição de cada uma destas regiões para a expressão de *cspA* e *cspB*, por meio de ensaios de atividade de β -galactosidase com fusões de transcrição e de tradução com o gene repórter *lacZ*.

Na figura 25 estão apresentados os dados obtidos pelas fusões transcricionais para o estudo da regulação de *cspA*. De acordo com os resultados, podemos notar que a atividade de beta-galactosidase nas fusões de BR4 e R5R4 tendem a aumentar com o tempo de incubação em baixa temperatura mantendo, porém, níveis relativamente constantes em temperatura ótima de crescimento. Ao compararmos os níveis de expressão após 5 h de incubação a 10 °C, notamos que na construção R5R4 estes se apresentam aumentados em relação à BR4. A construção BR4 difere de R5R4 pela ausência da porção a montante da região -45 dos promotores – com conteúdo AT elevado, incomum em *C crescentus*, e que inclui a sequência de 12 nucleotídeos comum à *cspA* e *cspB*. Sendo assim, aparentemente esta região não desempenha papel na expressão a 30 °C, mas interfere negativamente na expressão deste gene na fase de aclimatação.

Mitta et al. (1997) observaram através de fusões transcricionais e traducionais que a região com alto conteúdo AT compreendida entre as posições -37 e -47, chamada de elemento-UP, quando deletada compromete em cerca de 80% a expressão de *cspA* de *E. coli* após 5 h de choque-frio. Acredita-se que o envolvimento deste elemento-UP esteja relacionado à sua interação com a subunidade alfa da RNA polimerase e, que de alguma forma, essa importância seja de maior relevância em baixa temperatura.

Sendo assim, diferentemente do que foi descrito para *E. coli*, a sequência rica em AT a montante do promotor de *cspA* de *Caulobacter* não contribui para a indução da expressão deste gene em baixa temperatura e, tampouco parece ser uma zona de contato com a RNA polimerase, já que em sua ausência os níveis transcricionais são aumentados.

Desta forma, ainda que discretamente, este resultado sugere que a indução de *cspA* no choque-frio possui um componente transcricional de síntese *de novo*. Para averiguar esta hipótese, o promotor de *cspA* foi clonado em fusão de transcrição, sem a adição da porção 5'-UTR deste gene e esta construção (*placZ*-BR8) foi utilizada em ensaio de atividade de beta-galactosidase. De acordo com os

resultados obtidos neste experimento, o aumento da expressão de CspA em baixas temperaturas é completamente independente de seu promotor, sendo portanto, pós-transcricional. Desta forma, a diferença dos níveis de expressão apresentados por BR4 e R5R4 após o choque-frio permanecem não esclarecidos.

Em *E. coli*, *cspA* é regulado transcricionalmente pelas proteínas associadas ao nucleóide Fis e H-NS de forma antagônica, ativando e reprimindo respectivamente, apenas a 37 °C e não durante o choque frio (BAE; JONES; INOUE, 1997; BRANDI et al., 1999). Através de microarranjos de DNA verificou-se que H-NS sofre indução transitória de cerca de 5 vezes durante o choque frio e mostra ligeira redução de expressão após 5 h nesta condição, enquanto CspA sofre indução de 4 vezes retornando aos níveis iniciais de mRNA após 5 h de incubação em baixa temperatura (PHADTARE E INOUE, 2004). Apesar de induzida em baixa temperatura, H-NS aparentemente não regula a expressão de CspA nesta condição (BAE; JONES; INOUE, 1997; BRANDI et al., 1999). H-NS (*Histone-like Nucleoide Structuring protein*) são proteínas que se ligam ao DNA e promovem a compactação do cromossomo e, de maneira geral, embora tenham preferência de ligação por regiões ricas em AT (FANG e RIMSKY, 2008), regulam a transcrição de diversos genes de maneira não específica (ALTLUNG e INGMER, 1997). Embora H-NS seja um importante regulador global, trata-se de uma proteína associada ao nucleóide restrita ao grupo das enterobactérias, não apresentando um homólogo no genoma de *C. crescentus* (NIERMAN et al., 2001). Desta forma, a regulação negativa desempenhada pela região à montante do -35 dos genes *cspA* e *cspB* não se deve à H-NS. Não é possível descartar que haja alguma proteína associada ao nucleóide, não homóloga a H-NS (como por exemplo HU) e que também tenha preferência por ligação a regiões ricas em AT, que esteja desempenhando papel similar ao de H-NS como regulador global reprimindo a expressão de genes diversos durante o choque-frio.

Quando comparamos os níveis de expressão obtidos pelas fusões de tradução contendo o 5'-UTR completo (BR2) ou 5'-UTR completo + *Downstream box* hipotética (BR4) não notamos diferenças significativas, tanto em temperatura ótima de crescimento quanto após 5 h de incubação a 10 °C. Nestas fusões de tradução que são integradas ao cromossomo, apenas diferenças na porção 3' dos fragmentos que estão clonados em fase com o gene *lacZ* surtem efeitos, uma vez que na integração ao genoma as porções a montante da construção ficam íntegras. O fragmento BR2 clonado no pJBZ281 se estende desde 200 pb a montante do promotor até o códon de início de tradução de *cspA*, não possuindo os 160 pb a jusante do início de

tradução presentes em BR4. Essa diferença na extremidade dos 154 pb da região codificante poderiam conter uma região chamada *Downstream box*, que fora descrita anteriormente para *cspB* de *E. coli* como essencial para a indução deste gene no choque frio. Em ambas as fusões, os níveis de expressão permanecem constantes ao longo das 5 h de incubação a 30 °C, porém, quando incubadas a 10 °C, as culturas carregando estas fusões apresentaram cerca de 6 vezes de aumento de expressão após 5 h nesta condição. Portanto, ao compararmos a fusão transcricional BR4 e a fusão traducional BR2, é possível especular quantitativamente a respeito dos componentes da expressão de *cspA* após 5 h de incubação a 10 °C, que seriam a estabilização do mensageiro responsável pelas 2,5 vezes de indução e o aumento na tradução pelas 3,5 vezes remanescentes observadas na fusão traducional.

Na figura 26 estão apresentados os dados obtidos pelas fusões transcricionais para o estudo da regulação de *cspB*. De acordo com os resultados, podemos notar que a atividade de beta-galactosidase nas fusões de FR4 e R1C tendem a aumentar com o tempo de incubação em baixa temperatura mantendo, porém, níveis relativamente constantes em temperatura ótima de crescimento. Ao compararmos os níveis de expressão após 5 h de incubação a 10 °C, notamos que na construção R1C estes se apresentam bastante aumentados em relação à FR4, de maneira ainda mais pronunciada que a observada para a fusão R5R4 de *cspA*. Assim como BR4 e R5R4, FR4 e R1C diferem na ausência da porção a montante da região -45 do promotor em R1C – região esta com o mesmo conteúdo AT elevado incomum observado para *cspA*, na qual situa-se a sequência de 12 nucleotídeos conservada no mensageiro de *cspA* e *cspB*. Mais uma vez o experimento aponta para um papel negativo desta região na expressão do gene em questão a 10 °C, sem aparente contribuição na expressão a 30 °C.

Quando comparamos os níveis de expressão obtidos pelas fusões de tradução carregando AR2 e FR4 não notamos diferenças significativas, nem mesmo no perfil de indução após o choque frio. O fragmento AR2 clonado no pJBZ281 se estende desde 180 pb a montante do promotor até o códon de início de tradução de *cspB*, não possuindo os 154 pb a jusante do início de tradução nem os primeiros 375 pb no 5' de FR4. Essa diferença na extremidade 5' não surtiria efeito na fusão de tradução integrada e, portanto, foi ignorada na comparação, entretanto, os 154 pb da região codificante poderiam conter uma região *Downstream box*. Na fusão de tradução pJBZ-FR3, observamos níveis de absolutos de expressão após o choque

frio bastante similares aos apresentados pela fusão de transcrição pRK*lacZ*-FR4 (dado não mostrado).

Há tempos tem sido atribuída função termosensora aos ribossomos, sendo o seu estado um dos fatores responsáveis pela indução de resposta a baixa temperatura (VANBOGELEN e NEIDHARDT, 1990). Após a queda de temperatura os ribossomos se tornam não funcionais para mRNA celulares, exceto para os mRNA codificando proteínas de choque frio. Em seguida, os ribossomos não adaptados ao frio são convertidos para ribossomos adaptados pela incorporação de fatores ribossomais que alteram suas propriedades funcionais (JONES e INOUE, 1996). Giuliodori et al. (2004; 2007) demonstraram que em baixas temperaturas os fatores IF1, IF2 e IF3 que estão envolvidos na iniciação da tradução são induzidos, e que IF3 direciona fortemente e de maneira seletiva a tradução de mRNAs de choque-frio. A diferença entre as induções apresentadas pelas fusões de transcrição e de tradução nos experimentos mostrados nas figuras 25 e 26 indicam que a regulação da expressão de *cspA* e *cspB* possui um componente pós-transcricional adicional à estabilização do mRNA. Este componente possivelmente está envolvido com o processo de tradução, tendo em vista que quando a tradução é direcionada pelos elementos *in cis* do mRNA de *cspB*, a atividade de beta-galactosidase é bastante aumentada em relação à que ocorre quando a tradução é direcionada através do RBS do próprio gene *lacZ*, que não se trata de um gene de resposta ao frio e, portanto, não é preferencialmente traduzido na condição estudada.

Ainda, como a fusão de tradução de pJBZ-AR2 não contém nucleotídeos da região codificante de *cspB* fusionado ao *lacZ*, e esta construção apresentou os mesmos níveis de expressão observados em pJBZ-FR4 que possui esta região, é possível concluir que para a indução de *cspB*, assim como visto para *cspA*, não é essencial a presença de uma região DB ao contrário do que foi descrito para *cspB* em *E. coli* (ETCHEGARAY e INOUE, 1999). No entanto, no que diz respeito ao padrão de expressão da construção pJBZ-FR3, onde a possível região *Upstream box* fora deletada, é possível notar que este se assemelha ao da construção pRK*lacZ*-FR4. Esta semelhança entre a expressão das fusões de tradução (pJBZ-FR3) e de transcrição (pRK*lacZ*-FR4) sugere que na primeira, a porção responsável pelo caráter traducional da indução foi completamente extinto e que possivelmente neste caso apenas a estabilização da mensagem atue na indução em baixa temperatura (de maneira similar ao que usualmente é visto nas fusões transcricionais).

Não é possível descartar a hipótese de que a deleção desta porção do 5'-UTR de *cspB* tenha comprometido parcialmente a estabilidade da mensagem e que desta

forma a expressão do gene tenha sido afetada. Jiang et al. (1996), Yamanaka et al. (1999) e Xia et al (2001) propuseram que a principal porção responsável pela estabilização da mensagem de *cspA* de *E. coli* encontra-se na região das primeiras 50 bases do 5'-UTR (que possui 159 bases) onde é formado um grampo de estrutura secundária. De acordo com as predições de dobramento do mRNA de *cspB* obtidas com a utilização do programa GeneQuest do pacote LaserGene® DNASTAR, esta região se mantém intacta mesmo na construção pJBZ-FR3 (Fig. 27). Desta forma, a mais provável explicação para a redução dos níveis de indução desta fusão traducional, que atingem apenas os níveis apresentados pelas fusões de transcrição, seria a ausência do componente traducional nesta construção. Interessantemente, de acordo com as estruturas preditas para a região 5'-UTR de *cspB*, próximo à região Shine-Dalgarno forma-se na estrutura secundária um grampo contendo duas regiões de pareamento intercaladas por uma zona sem pareamento do mRNA, a qual poderia tratar-se de um sítio de clivagem por RNase III. Este sítio, no entanto, forma-se apenas a 30 °C, sendo que na região 5'-UTR de pJBZ-FR3/*lacZ* este sítio não está presente. A principal ribonuclease envolvida na degradação do mensageiro de *cspA* em *E. coli* é a RNase E, uma vez que a sua inativação *in vivo* causa aumento da meia vida do mRNA de *cspA* (FANG et al., 1997). Entretanto, RNase E aparentemente cliva mais eficientemente ssRNA que dsRNA, enquanto que RNase III cliva dsRNA, sendo outra endonuclease chave no decaimento de mRNAs em bactérias (GRUNBERG-MANAGO, 1999; TANAKA; IZUHARA; AKIYAMA, 1992). Sendo assim, a RNase III poderia também ser importante na degradação rápida dos mensageiros de CSPs.

A fim de verificar se a deleção da porção do 5'-UTR de *cspB* que contem a provável região UB, comprometeu a estabilidade do mensageiro, ensaios de determinação de meia-vida de RNA foram realizados através de reação de RT-PCR usando oligonucleotídeos que hibridam na região codificante do gene *lacZ*. Como podemos observar na figura 28, ambas as construções AR2 e FR3 sofrem estabilização dependente de temperatura tendo seus tempos de meia-vida médios aumentados cerca de 8 vezes a 10 °C. Sendo assim, aparentemente a deleção da *Upstream box* não acarreta grande desestabilização da mensagem a 10 °C, mas deve ocorrer uma diminuição da eficiência da tradução do mensageiro nesta temperatura, comprometendo a indução das CSPs na resposta ao frio. Ainda, a porção deletada do 5'-UTR de pJBZ-FR3/*lacZ* torna o decaimento de seu mensageiro mais lento que a construção contendo o 5'-UTR íntegro, nos primeiros minutos após a adição da rifampicina. De acordo com os ensaios de beta-

galactosidase, os valores absolutos em Unidades Miller obtidos para a fusão pJBZ-FR3/*lacZ* mostram-se cerca de 3 vezes maiores que os da fusão pJBZ-AR2/*lacZ* (resultados não mostrados). Isto poderia ser resultado da ausência de um possível sítio de clivagem por RNase III no mRNA de FR3, que seria responsável pelo decaimento rápido nos primeiros minutos após a síntese do mensageiro, tornando nesta fase o mRNA de FR3 mais estável que o de AR2 no qual o sítio de RNase III encontra-se presente. A diferença de estabilidade é reduzida nos períodos maiores após a adição de rifampicina, o que acreditamos ser resultado de menor competição dos mRNA pelo degradossomo resultante da diminuição do *pool* de RNAs totais celulares, possibilitando a degradação mais efetiva de mRNA estruturados como este em questão.

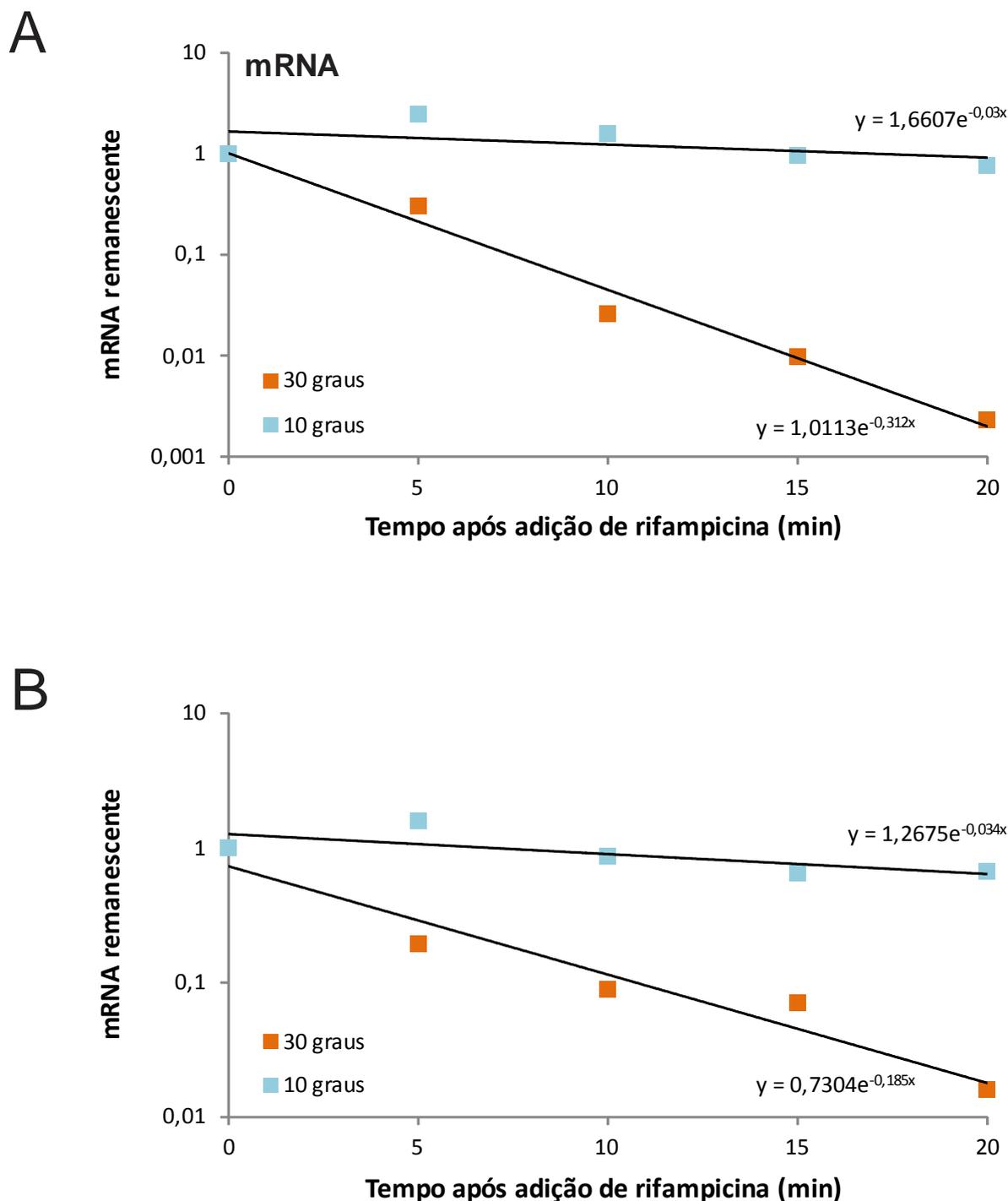


Figura 21. Ensaio de determinação da meia-vida dos mensageiro de *cspA* e *cspB*. Culturas de *C. crescentus* NA1000 foram inoculadas em meio PYE a 30 °C e, quando no meio da fase exponencial de crescimento uma alíquota foi transferida para 10 °C por 2 h. As culturas advindas de ambas condições de incubação foi adicionada rifampicina e RNAs foram extraídos após 5, 10, 15 e 20 minutos da adição do antibiótico. Depois de tratados com DNase I, os RNAs foram convertidos em cDNAs e utilizados em experimento de PCR em tempo real. As concentrações relativas de mRNA de *cspA* (A) e *cspB* (B) foram obtidas normalizando cada ponto em relação ao ponto imediatamente antes da adição de rifampicina.

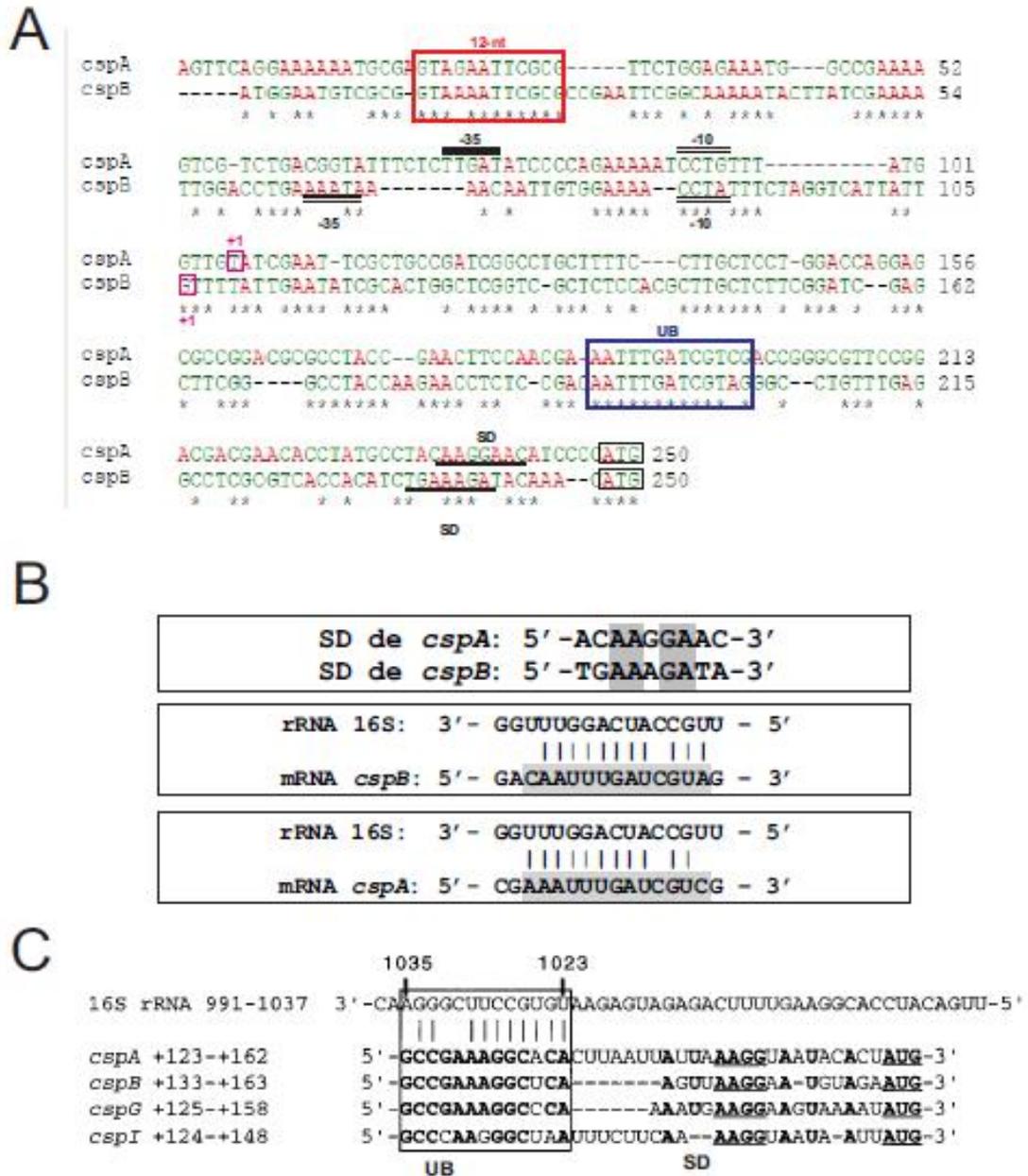


Figura 22. Alinhamentos para a determinação de possíveis alvos de estudos de regulação de *cspA* e *cspB*. (A) Alinhamento de 250 pares de base a montante dos genes *cspA* e *cspB*. Os quadros azul e vermelho mostram, respectivamente, uma provável *Upstream box* e uma região de 12 nucleotídeos comum à região promotora dos dois genes. As barras duplas representam as regiões -35 e -10 dos promotores, enquanto as barras simples representam as sequências Shine-Dalgarno de cada gene. Os inícios de transcrição e tradução estão representados por quadros rosa e preto, respectivamente. Em (B) estão os alinhamentos sequências Shine-Dalgarno de *cspA* e *cspB* além dos pareamentos da UB de *cspA* e de *cspB* contra o rRNA 16S de *C. crescentus*. (C) Alinhamento dos 5'-UTR das quatro CSPs de *E. coli* induzidas no frio, mostrando a UB do mensageiro destes genes pareada com o rRNA 16S desta bactéria. FONTE: YAMANAKA e YNOUYE (1999).

Figura 23. Alinhamento das sequências dos genes codificantes para rRNA 16S de *Caulobacter crescentus* e *Escherichia coli*. As regiões codificantes para o rRNA 16S de *C. crescentus* e *E. coli* foram alinhadas de modo a permitir a posterior localização em estrutura secundária do rRNA 16S das estruturas envolvidas na regulação da expressão de *cspA* e *cspB*. Os quadrados azul, laranja, vermelho e verde representam, respectivamente, a região de pareamento da sequência Shine-Dalgarno de *cspA* de *E. coli*, a região de pareamento das sequência *Upstream box* de *E. coli*, a região de pareamento das sequência *Upstream box* de *C. crescentus* e a região de pareamento das sequência *Downstream box* de *E. coli*. A linhas azul e verde representam, respectivamente, as regiões de pareamento das sequências Shine-Dalgarno de *cspB* e *cspA* de *C. crescentus*. O alinhamento entre as bases 481 e 1018 foram omitidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

| | | |
|-------------|---|------|
| Caulobacter | -----AGCGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAA | 33 |
| Escherichia | AAATTGAAGAGTTTGTATCATGGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAA | 60 |
| | * ***** | |
| Caulobacter | GTCGAACGGA-----TCCTTCGG-GATTAGTGGCGGACGGGTGAGTAA | 75 |
| Escherichia | GTCGAACGGTAACAGGAAGCAGCTTGCTGCTTCGCTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAA | 120 |
| | ***** * ***** | |
| Caulobacter | CACGTGGGAACGTGCCCTTTGGTTCGGAACAACCTCAGGGAAACTTGAGCTAATACCG--- | 132 |
| Escherichia | TGCTGGGAAGCTGCCTGATGGAGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCAT | 180 |
| | ***** ** * * * * * ***** | |
| Caulobacter | GATGT-----GCCCTTCGGGGGAAA-----GATTATCGCCATTGGAGCGGCCCGCGTC | 181 |
| Escherichia | AATGTCGCAAGACCAAAGAGGGGGACCTTCGGGCTCTTGCCATCGGATGTGCCAGATG | 240 |
| | **** * * * * * * * * * * * * * * * * | |
| Caulobacter | TGATTAGCTAGTTGGTGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGA | 241 |
| Escherichia | GGATTAGCTTGTGGTGGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGA | 300 |
| | ***** ***** ***** ***** ***** | |
| Caulobacter | GGATGATCAGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG | 301 |
| Escherichia | GGATGACCAGCCACACTGGAACCTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGG | 360 |
| | ***** ***** * * * ***** | |
| Caulobacter | GGAATCTTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGCAGCCATGCCGCGTGAATGATGAAGGTCT | 361 |
| Escherichia | GGAATATTCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCT | 420 |
| | ***** * * * ***** ***** ***** * * * * * * | |
| Caulobacter | TAGGATTGTAAAAATCTTTCCACCGGGGACGA-----TAA-----T | 396 |
| Escherichia | TCGGGTTGTAAAGTACTTTTCAGCGGGGAGGAAGGGAGTAAAGTTAATACCTTTGCTCATT | 480 |
| | * * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * | |
| Caulobacter | TGTGGTTTTCCCTTCGGGGACTGGGACACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTC | 991 |
| Escherichia | TGAGAAATGTGCCTTCGGGAACCGTGAGACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTT | 1077 |
| | * | |
| Caulobacter | GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTCGTGATTAATGCCCATCAGGT | 1051 |
| Escherichia | GTGAAATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGC-GGT | 1136 |
| | ***** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * | |
| Caulobacter | TTGGCTGGGCACTCTAATCATACTGCCGAGTTAATCCGGAGGAAGGCGGGGATGACGTC | 1111 |
| Escherichia | CCGGCCGGAACTCAAAGGAGACTGCCAGTGATAAACTGGAGGAAGTGGGGATGACGTC | 1196 |
| | * | |
| Caulobacter | AAGTCCTCATGGCCCTTACAAGGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGACTACAGAGGG | 1171 |
| Escherichia | AAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGCATACAAAGAG | 1256 |
| | ***** ***** * * * ***** | |
| Caulobacter | CTGCAATCCCGCGAGGGGGAGCCAATCCCTAAAAGT-CGTCTCAGTTCGGATTGTTCTCT | 1230 |
| Escherichia | AAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACCTCATAAAGTGCCTCGTAGTCCGGATTGGAGTCT | 1316 |
| | * | |
| Caulobacter | GCAACTCGAGAGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAA | 1290 |
| Escherichia | GCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGTGGATCAGAATGCCACGGTGAA | 1376 |
| | ***** ***** ***** ***** ***** | |
| Caulobacter | TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTTGGCTTTACCCGAAG | 1350 |
| Escherichia | TACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGGGAGTGGGTTGCAAAAAGAAG | 1436 |
| | ***** ***** * * * * * * * * * * * * * * * * | |
| Caulobacter | GCGCTGCGCTAACCGCAAGGGGGCAGGCGACCACGGTAGGGTCAGCGACTGGGGTGAAGT | 1410 |
| Escherichia | TAGGTAGCTTAACCTTCGGGAGGGCGCTTACCACTTTGTGATTCATGACTGGGGTGAAGT | 1496 |
| | * | |
| Caulobacter | CGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGC----- | 1439 |
| Escherichia | CGTAACAAGGTAACCGTAGGGGAACCTGCGGTTGGATCACCTCCTTA | 1543 |

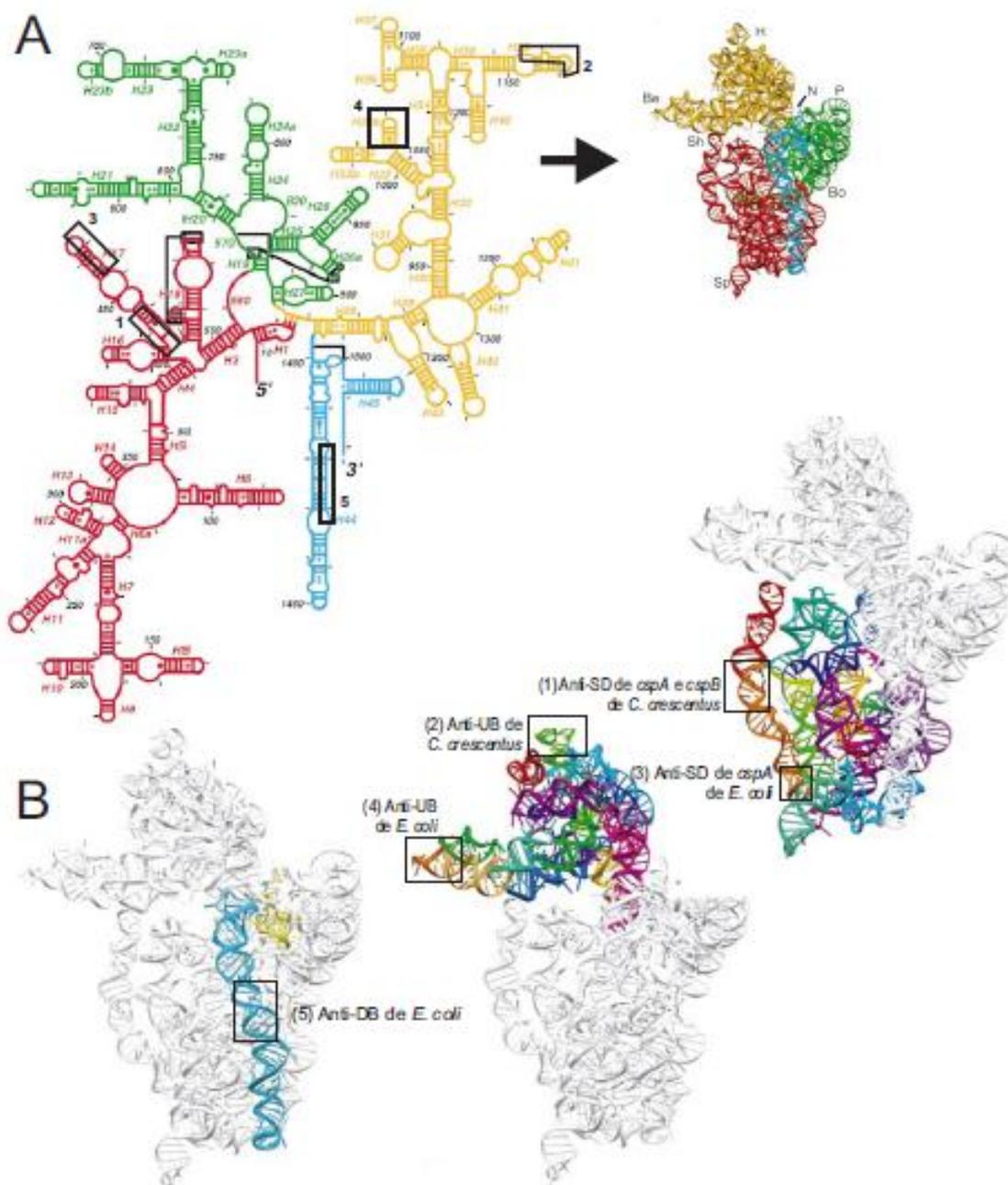


Figura 24. Ilustração esquemática das estruturas secundária e terciária propostas para rRNA 16S de *E. coli* – (A) No esquema de estrutura secundária do rRNA 16S de *E. coli* estão representadas as regiões de interação com as sequências Shine-Dalgarno (1) e *Upstream box* (2) de *cspA* e *cspB* de *C. crescentus* e, *Upstream box* (4), *Downstream box* (5) e Shine-Dalgarno *cspA* (3) de *E. coli*. Em (B) as regiões mostradas em (A) estão localizadas na estrutura terciária do rRNA 16S de modo a permitir a real proporcionalidade de distância entre as regiões. FONTE: modificado de Winberly et al. (2000).

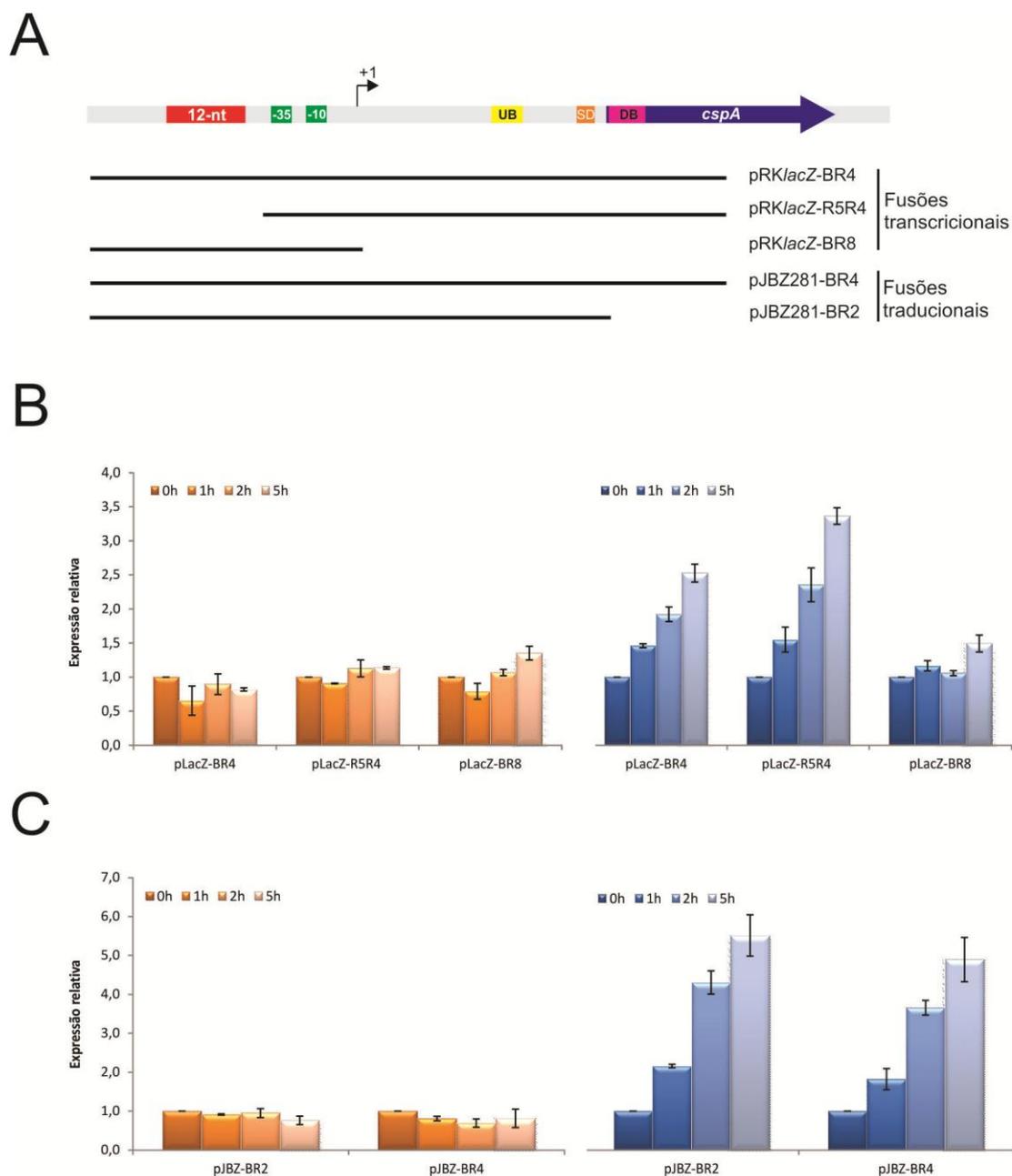


Figura 25. Mapeamento do promotor e região 5'-UTR de *cspA*. A ilustração esquemática em (A) mostra a composição das fusões transcricionais (B) e traducionais (C) utilizadas nos ensaios de atividade de beta-galactosidase. Culturas carregando as fusões foram inoculadas em meio PYE a 30 °C e ao atingirem o meio da fase exponencial de crescimento foram divididas em duas partes, das quais uma permaneceu a 30 °C (barras alaranjadas) e a outra foi transferida para 10 °C (barras azuladas). Aliquotas foram tomadas para a determinação da atividade de beta-galactosidase imediatamente antes da separação e após 1 h, 2 h e 5 h de incubação nas diferentes temperaturas. Os valores de expressão relativa foram obtidos dividindo o número de unidade Miller de cada ponto pelo número obtido no ponto 0 h e, representam a média de experimentos com três replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam os desvios padrão obtidos.

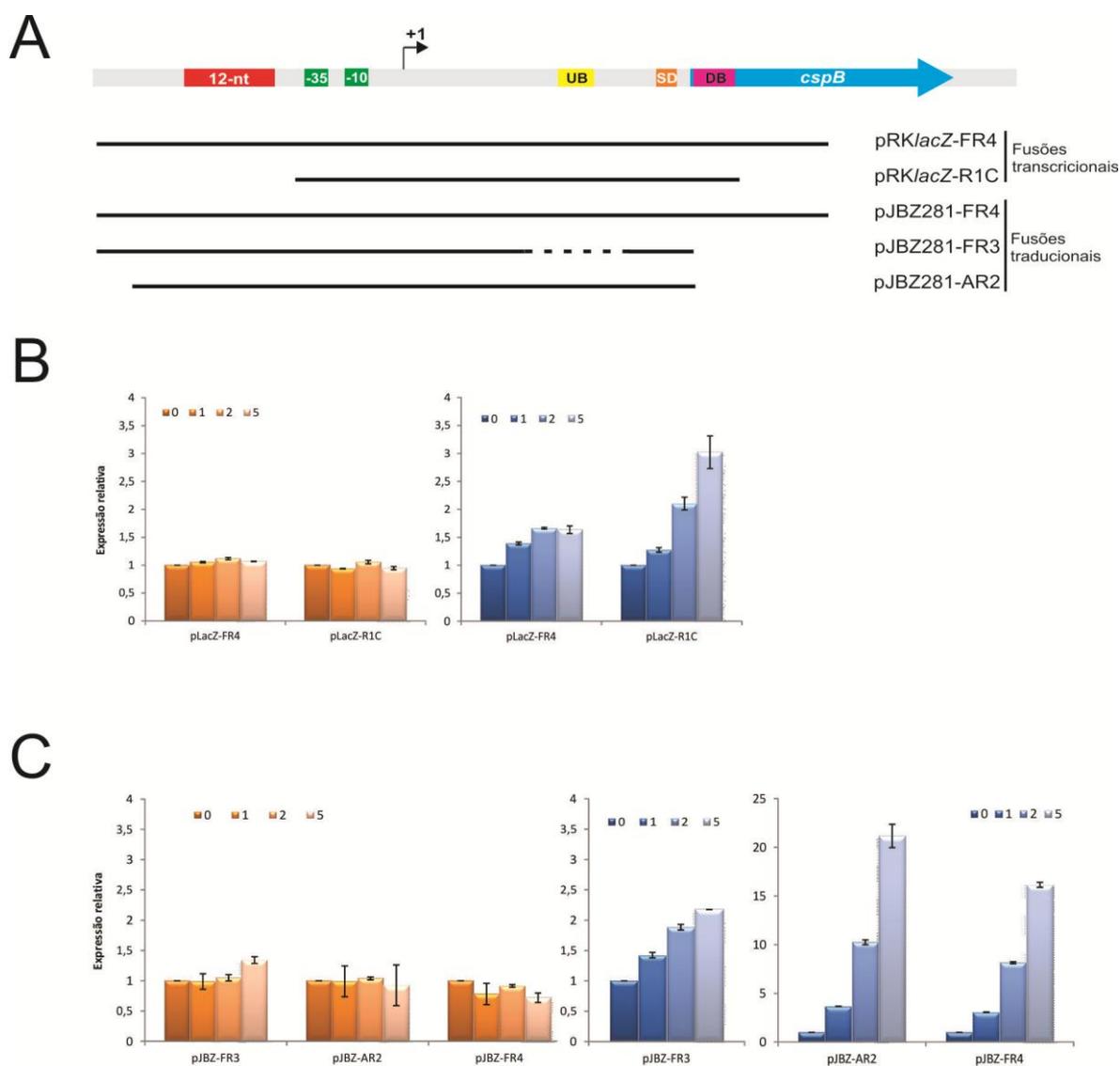
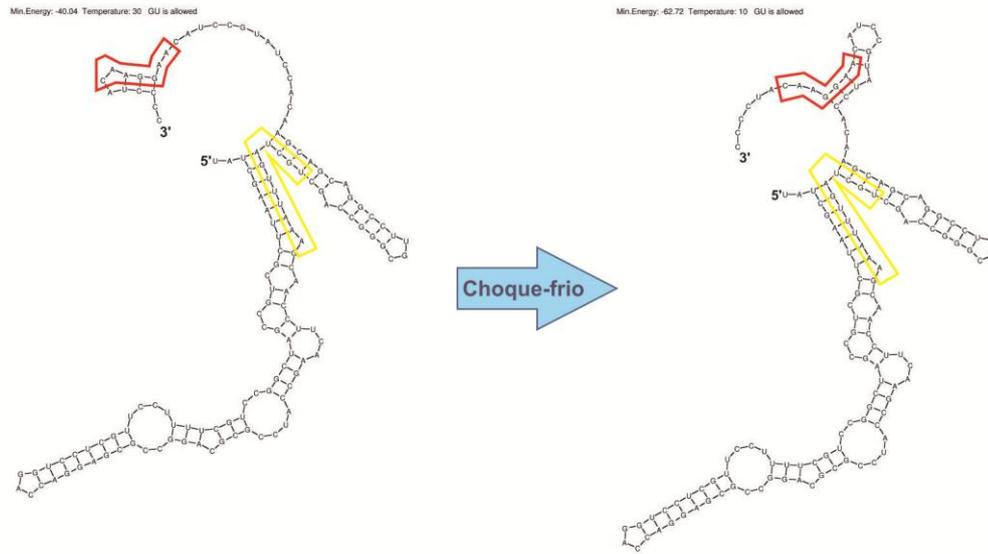
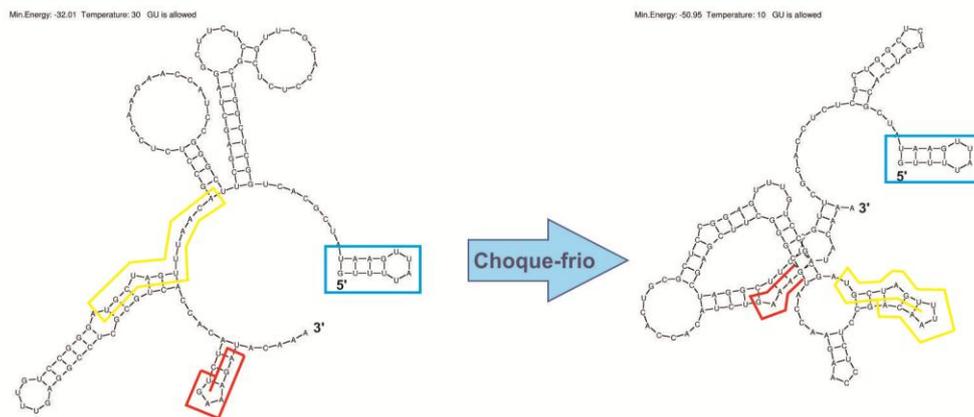


Figura 26. Mapeamento do promotor e região 5'-UTR de *cspB*. A ilustração esquemática em (A) mostra a composição das fusões transcricionais e traducionais utilizadas nos ensaios de atividade de beta-galactosidase. Em (B) estão os ensaios realizados usando as fusões transcricionais a 30 °C e 10 °C. Em (C) estão os ensaios realizados usando as fusões traducionais a 30 °C e 10 °C. Culturas carregando as fusões foram inoculadas em meio PYE a 30 °C e ao atingirem o meio da fase exponencial de crescimento foram divididas em duas partes, das quais uma permaneceu a 30 °C e a outra foi transferida para 10 °C. Aliquotas foram tomadas para a determinação da atividade de beta-galactosidase imediatamente antes da separação e após 1 h, 2 h e 5 h de incubação nas diferentes temperaturas. Os valores de expressão relativa foram obtidos dividindo o número de unidade Miller de cada ponto pelo número de obtido no ponto 0 h e, representam a média de experimentos com três replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam os desvios padrão obtidos.

5'-UTR mRNA *cspA* (BR8)



5'-UTR mRNA *cspB* (AR2)



5'-UTR mRNA *cspB* (FR3)

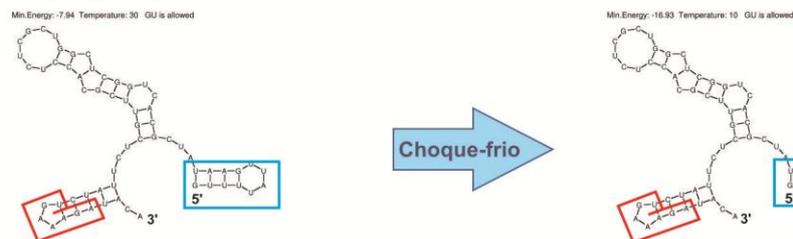


Figura 27. Estrutura secundária predita para a região 5'-UTR dos mensageiros de pJBZ-BR8/*lacZ*, pJBZ-AR2/*lacZ* e pJBZ-FR3/*lacZ*. As regiões 5'-UTR presentes nas construções pJBZ-BR8, pJBZ-AR2 e pJBZ-FR3 tiveram suas estruturas secundárias preditas através da utilização do programa GeneQuest do pacote LaserGene® DNASTAR, usando parâmetros como temperatura de 30 °C e 10 °C, permitindo pareamento de G e U. Os quadrados amarelos, vermelhos e azuis representam as regiões *Upstream box*, Shine-Dalgarno e alça de estabilização do mensageiro, respectivamente.

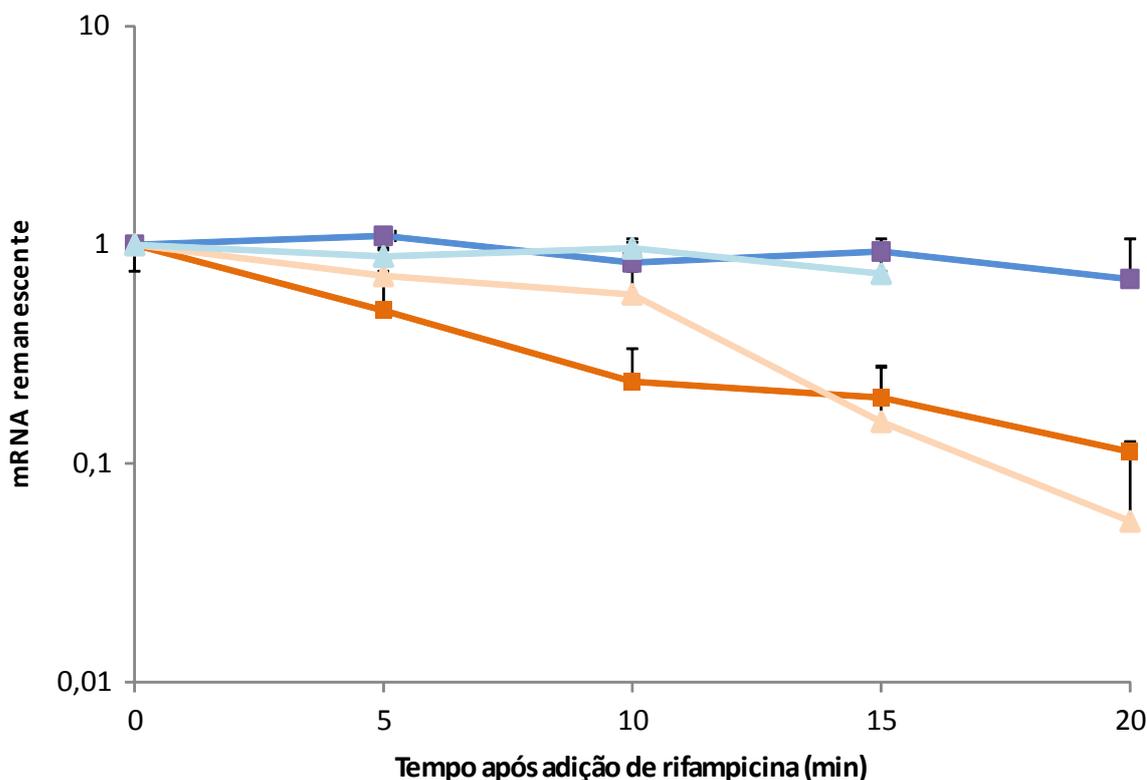


Figura 28. Ensaio de determinação da meia vida dos mensageiros de pJBZ-AR2/lacZ e pJBZ-FR3/lacZ. Culturas de *C. crescentus* NA1000 contendo as construções pJBZ-AR2/lacZ e pJBZ-FR3/lacZ integradas ao genoma foram inoculadas em meio PYE a 30 °C e, quando no meio da fase exponencial de crescimento uma alíquota foi transferida para 10 °C por 2 h. Às culturas advindas de ambas condições de incubação foi adicionada rifampicina e RNAs foram extraídos após 5, 10, 15 e 20 minutos da adição do antibiótico. Depois de tratados com DNase I, os RNAs foram convertidos em cDNAs e utilizados como molde para reação de PCR por 15 ciclos para cDNAs advindos de RNAs extraídos de culturas incubadas a 10 °C e 22 ciclos para cDNAs advindos de RNAs extraídos de culturas incubadas a 30 °C. Os produtos das reações foram separados por eletroforese e a intensidade das bandas quantificada através do programa ImageJ. As concentrações relativas de mRNA de AR2/lacZ e FR3/lacZ foram obtidas normalizando cada ponto em relação ao ponto imediatamente antes da adição de rifampicina. Os tons alaranjados e azulados são mRNAs de 30 °C e 10 °C, respectivamente. Os quadrados são mRNAs de AR2/lacZ e os triângulos de FR3/lacZ. Os valores representam a média de experimentos com três replicatas biológicas e duas replicatas técnicas. As barras pretas indicam os desvios padrão obtidos.

4.2.6 Estudo da atividade das CSPs *in vivo*

A fim de determinar se as CSPs de *C. crescentus* possuem atividade antiterminadora de transcrição, bem como se existe uma preferência de ligação a alguma espécie de ácido nucleico, uma colaboração com pesquisadores da Rutgers University em New Jersey, Estados Unidos foi estabelecida. Os professores Dra. Sangita Phadtare e Dr. Konstantin V. Severinov padronizaram métodos de purificação para as CSP de *E. coli* bem como métodos de estudo para determinação da atividade antiterminadora das proteínas dessa família através de ensaios *in vivo* e bioquímicos (PHADTARE; SEVERINOV; INOUYE, 2003).

As regiões codificadoras de *cspA*, *cspB*, *cspC* e *cspD* foram amplificadas e clonadas no vetor pINIII, e estas construções foram utilizadas para os ensaios de expressão heteróloga, mutagênese sítio-dirigida e antiterminação *in vivo*.

Como descrito por Xia et al. (2001) em *E. coli* a adição de uma cópia *in trans* de genes codificantes para proteínas de choque frio pode em alguns casos ser tóxico para a célula, impedido a formação de colônias, e em outros casos, apenas quando superexpressos em vetores de expressão como o pINIII esse efeito é observado. A fim de verificar o efeito da presença dos genes codificantes para as *csps* de *Caulobacter* na sobrevivência da linhagem RL211 de *E. coli* foram realizadas medidas de crescimento (Fig. 29) com e sem a adição de IPTG. Como podemos verificar através das curvas, a introdução de qualquer gene codificante para proteínas de choque frio de *Caulobacter crescentus* na linhagem RL211 não interfere no crescimento da mesma, ainda que superexpresso através da adição de IPTG à cultura, enquanto que CspE_{ec} reduz a taxa de crescimento da linhagem apenas quando superexpresso após a adição de IPTG à cultura. Estes dados evidenciam que as CSPs de *Caulobacter* aparentemente não apresentam a mesma toxicidade para o maquinário celular de *E. coli* que é apresentada por CspE_{ec}. Outros relatos similares de inibição de crescimento foram descritos para *E. coli* quando CspB_{ec}, CspC_{ec}, CspD_{ec} e CspH_{ec} são superexpressos (XIA; KE; INOUYE, 2001). Estes resultados poderiam sugerir que as CSPs de *C. crescentus*, por não se assemelhar suficientemente às CSPs de *E. coli*, não desempenhem as mesmas funções na célula ou que sejam inativas neste organismo. Outra possível explicação seria a de que essas proteínas de *Caulobacter* não estivessem sendo expressas na linhagem RL211. Para tentar determinar se esta segunda hipótese estaria ocorrendo, cada uma das culturas carregando o plasmídeo pINIII com os genes das *csps* foi inoculada e induzida com IPTG e os extratos totais de proteína foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 17,5% e,

embora de forma sutil, todas as linhagens apresentaram indução das proteínas codificadas pelos genes clonados (resultados não mostrados). Desta forma, a ausência de fenótipo na curva de crescimento quando as CSPs são superexpressas e a certeza de que elas estão sendo expressas neste organismo, fortalecem a hipótese de que elas sejam inativas neste organismo.

As proteínas de choque frio são caracterizadas pela presença de um domínio chamado Cold Shock Domain (CSD), no qual duas regiões são bastante conservadas e tratam-se de dois motivos de ligação à ácidos nucleicos, RNP-1 e RNP-2 (LANDSMAN, 1992), essenciais para a ligação à RNA e DNA fita simples (SCRODER et al., 1995). Phadtare et al. (2002) determinaram que três aminoácidos aromáticos presentes nos motivos RNP-1 e RNP-2 do domínio CSD de CspE em *E. coli* eram essenciais para a atividade antiterminadora desta proteína. Neste estudo, a fenilalanina na posição 17 (RNP-1) e a fenilalanina e histidina nas posições 30 e 32 (RNP-2) foram trocadas por arginina, de modo que a habilidade da proteína se ligar a ácidos nucleicos não foi alterada (determinado pelo K_d), mas a capacidade desta de desfazer estruturas secundárias nos ácidos nucleicos foi abolida. Como é possível notar através do alinhamento e a predição das estruturas dos domínios de CspA, CspB e CspC de *Caulobacter* feita com base na estrutura de CspA de *E. coli* mostrados na figura 30, os dois aminoácidos críticos para a atividade de antiterminação de CspE_{ec} estão conservados no motivo RNP-2 de todas as CSPs de *Caulobacter*. Entretanto, as fenilalaninas dos motivos RNP-1 e RNP-2 não estão presentes em todos os motivos dos domínios CSD de CspD_{cc}, estando em seu lugar uma tirosina no RPN-1 (de ambos domínios) e uma Leucina no RPN-2 do segundo domínio. Se estes aminoácidos descritos como essenciais para a função de CspE também forem importante para a atividade destas proteínas em *C. crescentus*, é possível que esta alteração em CspD não tenha efeito deletério no primeiro motivo dos domínio, uma vez que o resíduo de tirosina assemelha-se bastante estruturalmente à fenilalanina, ambos sendo aminoácidos aromáticos diferindo entre si essencialmente pela presença de um radical hidroxila ligado ao anel. O segundo motivo do primeiro domínio CSD desta proteína pode, no entanto, ter sua função antiterminadora comprometida, uma vez que o aminoácido leucina difere estruturalmente da fenilalanina por não possuir um anel aromático.

A fim de determinar se estes aminoácidos conservados nos motivos RNP-1 e RNP-2 de *Caulobacter* são críticos para a atividade das proteínas CSP desta bactéria que possuam atividade antiterminadora, o plasmídeo pINIII com os genes *cspA*, *cspB*, *cspC* e *cspD* foi utilizado como molde para a metodologia de mutagênese sítio-

dirigida descrita na seção 3.7 do material e métodos. Esse processo de mutagênese foi aplicado com sucesso à CspA, CspB e aos dois domínios de CspC individualmente e combinados, mas CspD não apresentou colônias em nenhuma das cinco tentativas de mutagênese. Os plasmídeos originados por este método de mutagênese foram, juntamente com as cópias selvagens, utilizados para ensaios *in vivo* de funcionalidade.

Xia et al. (2001) obtiveram um mutante quádruplo (BX04) para genes que codificam CSPs em *E. coli* (entre os nove parálogos existentes no genoma desta bactéria) e observaram que esta linhagem apresentava defeito de divisão celular quando exposta à baixa temperatura e que este defeito não era devido à não-separação cromossomal e sim à uma falha na formação do septo de divisão celular. Neste mesmo trabalho, foi verificada que a inserção de uma cópia *in trans* de *cspB*, *cspC*, *cspG*, *cspH* ou *cspI* eram suficientes para complementar o fenótipo de deficiência de crescimento dessa linhagem a 15°C, enquanto, *cspA*, *cspE* e *cspF* só suprimiam esse fenótipo na presença de IPTG. Alguns parálogos como *cspB*, *cspC* e *cspH*, embora complementassem o fenótipo ao serem introduzidos na linhagem, eram tóxicos quando superexpressos e impediam a formação de colônias. CspD foi a única proteína que foi incapaz de complementar BX04. Essas diferenças quanto a dose de cada CSP, indicam que embora elas compartilhem grande similaridade de sequências possivelmente desempenhem papéis específicos que podem ser apenas parcialmente sobrepostos ou compensados em condições específicas.

De forma a verificar a hipótese de que as CSPs de *Caulobacter* não desempenham as mesmas funções no metabolismo de *Escherichia coli*, um ensaio de complementação através de expressão heteróloga foi realizado na linhagem BX04 (Fig. 31A). Como podemos observar neste experimento, nenhuma das proteínas de choque frio de *Caulobacter* foi capaz de restaurar a capacidade desta linhagem de formar colônias em baixas temperaturas, mesmo quando superexpressas. Como controles, a linhagem carregando uma cópia selvagem de *cspE_{ec}* (apenas na presença de IPTG) apresentou colônias nesta temperatura, enquanto a linhagem carregando a cópia mutante, na qual a histidina na posição 32 foi trocada por uma arginina, não apresentou colônias nesta condição, corroborando a hipótese de que a atividade antiterminadora de CspE é essencial para a adaptação em baixa temperatura, como já descrito anteriormente por Phadtare et al. (2002). Neste sentido, os parálogos presentes em *Caulobacter* aparentemente não possuem atividade antiterminadora ou então, as funções necessárias para a restauração da habilidade de BX04 formar colônias em baixas temperaturas podem não depender

exclusivamente de antiterminação e, neste caso, estas demais funções podem não estar sendo supridas pelas CSPs heterólogas.

4.2.7 Ensaio de atividade antiterminadora de CSPs *in vivo*

De posse dos resultados obtidos pelo ensaio de complementação heteróloga, foi realizado um ensaio *in vivo* com a linhagem RL211 de modo a verificar se as CSPs de *Caulobacter* possuem atividade antiterminadora. A linhagem de *E. coli* RL211, apresenta em seu genoma um gene *cat* codificante para a enzima cloranfenicol acetiltransferase, que confere resistência a cloranfenicol. Esta linhagem possui ainda um forte terminador *trpL* independente de Rho precedendo o gene *cat*. Sendo assim, durante a transcrição deste gene, imediatamente antes do início de tradução forma-se uma alça terminadora que impede a expressão da enzima CAT. Assim o gene somente é expresso quando esta alça terminadora é desfeita permitindo a passagem da RNA polimerase.

Phadtare et al. (2003) introduziram o vetor pINIII de expressão controlada contendo uma cópia do gene *cspE_{ec}* na linhagem RL211 descrita acima e a incubaram em meio contendo cloranfenicol na presença e na ausência de IPTG. Segundo seus resultados (Fig. 31B), a superexpressão de CspE nesta linhagem é suficiente para desfazer a alça terminadora que precede o gene *cat*, permitindo assim o crescimento da cultura na presença de cloranfenicol. Apenas a presença de uma cópia extra do gene *cspE* não foi suficiente para provir a célula com a quantidade necessária de CspE para a desestruturação do terminador *trpL*.

De maneira similar à executada pelos autores, o plasmídeo pINIII carregando as cópias selvagens e mutantes dos genes que codificam para proteínas de choque frio de *Caulobacter* foram introduzidas na linhagem RL211. Foram usados como controle negativo o plasmídeo pINIII vazio e positivo o plasmídeo carregando o gene *cspE_{ec}*. Como podemos observar na figura 31C, aparentemente todas as CSPs de *Caulobacter* foram capazes de desfazer a alça terminadora que impede a expressão de CAT, uma vez que todas as culturas (exceto aquela carregando o pINIII vazio) foram capazes de crescer na presença de cloranfenicol. Surpreendentemente, as mutações que substituíram o resíduo de histidina por arginina no RNP-2 não comprometeram a capacidade dessas proteínas de desfazer a estrutura de terminação. Phadtare et al. (2002) mostraram que a substituição do resíduo de histidina do RNP-2 por uma arginina abolia completamente a capacidade de esta proteína desfazer estruturas de terminação. Sendo assim, esse resultado sugere que

todas as CSPs de *Caulobacter* são terminadores de transcrição, entretanto, ao menos nas proteínas CspA, CspB e CspC, essa função não é dependente da histidina do RNP-2, diferentemente do reportado para CspE de *E. coli*.

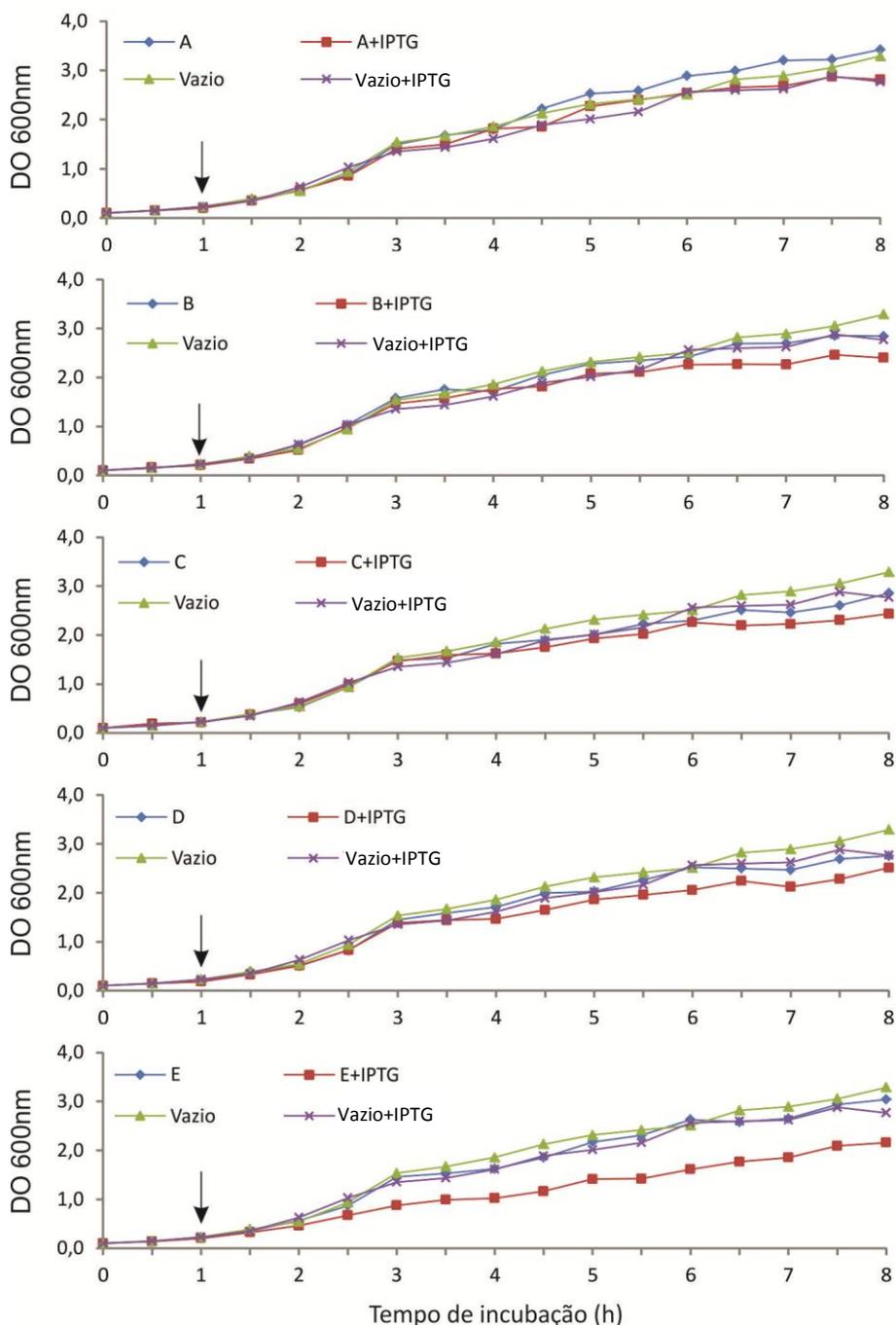


Figura 29. Curvas de crescimento da linhagem de *E. coli* RL211 carregando cópias dos genes codificantes para CSPs de *C. crescentus*. Os genes codificantes para CSPs de *Caulobacter crescentus* foram clonados em um plasmídeo de expressão controlada por IPTG e transformados na linhagem de *Escherichia coli* RL211. As culturas foram incubadas em meio LB a 37 °C e, após 1 h da diluição foram divididas em duas partes, sendo que a uma foi adicionado IPTG para promover a superexpressão dos genes clonados. Foram utilizados como controles o plasmídeo vazio e o plasmídeo carregando uma cópia do gene *cspE* de *E. coli*.

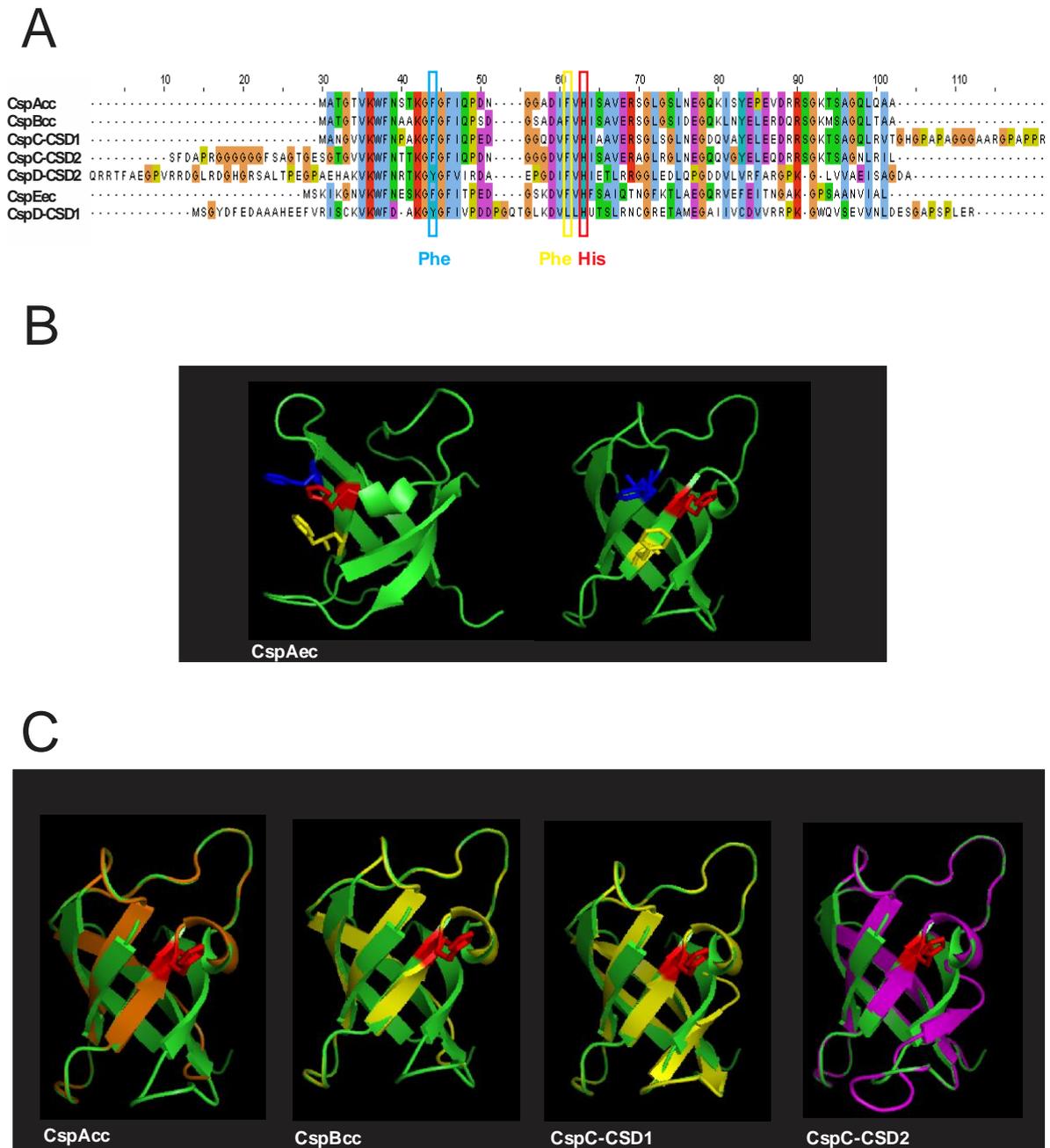
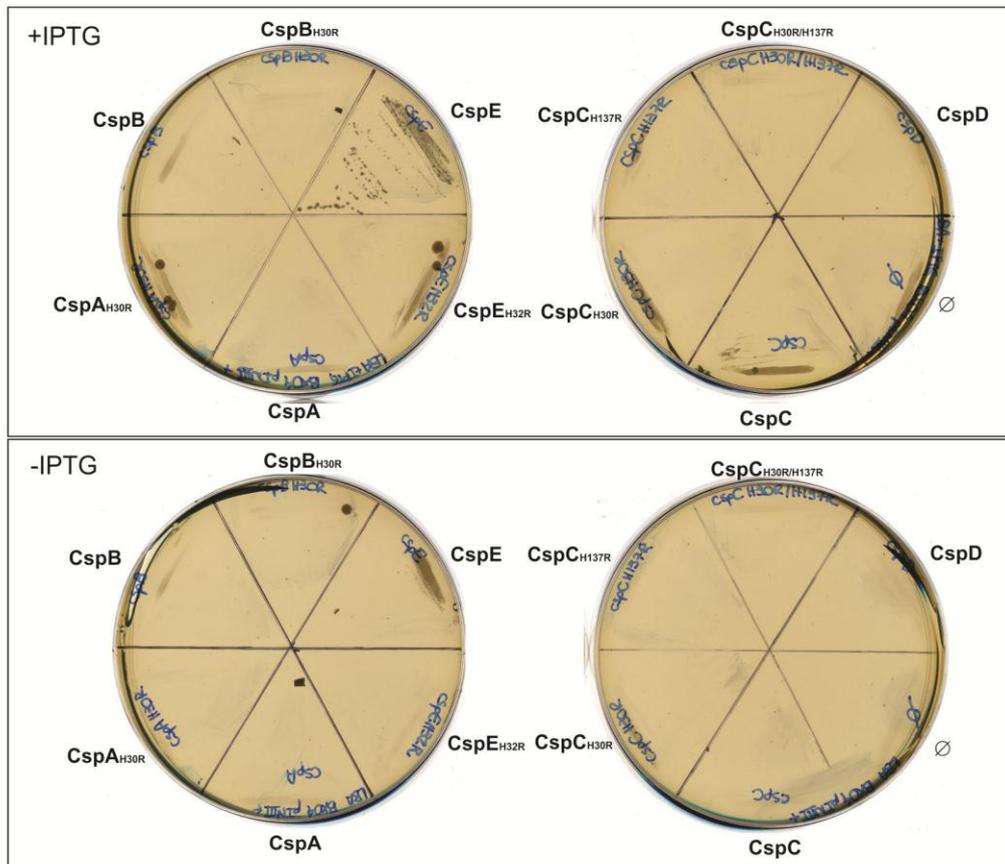


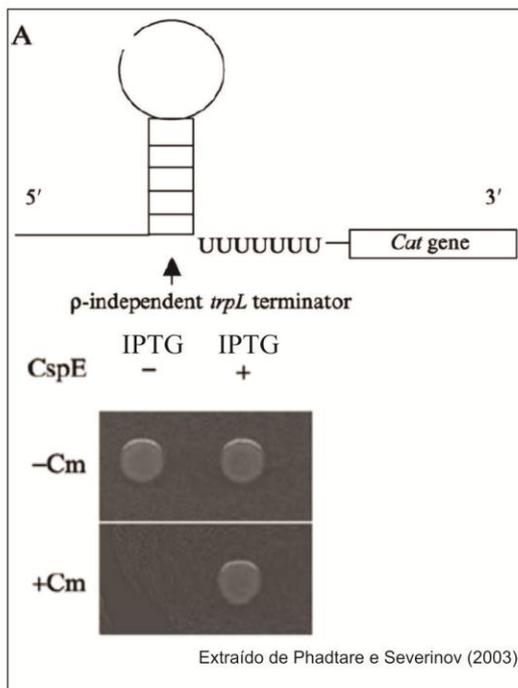
Figura 30. Alinhamento das CSPs de *C. crescentus* e CspE de *E. coli*, com localização de resíduos em estrutura terciária. Em (A) a sequência da proteína CspE de *E. coli* foi alinhada com as CSPs de NA1000 para a identificação dos resíduos críticos para a atividade antiterminadora descrita para CspE, os quais estão destacados em azul, amarelo e vermelho - Phe17, Phe30 e His32, respectivamente. (B) Estrutura predita de CspA de *E. coli* com os resíduos Phe17, Phe30 e His32 destacados. (C) Sobreposição de estruturas preditas para CspA, CspB e CspC (ambos domínios) de *C. crescentus* com a estrutura de CspA de *E. coli*. O resíduo de histidina escolhido para a mutagênese sítio-dirigida encontra-se destacado em vermelho.

Figura 31. Ensaio de atividade *in vivo* das CSPs de *Caulobacter crescentus*. Em (A) estão mostrados os resultados do ensaio de complementação heteróloga da linhagem mutante de *E. coli* BX04 ($\Delta cspA\Delta cspB\Delta cspE\Delta cspG$). Neste experimento plasmídeos de expressão controlada por IPTG vazio, carregando cópias do gene *cspE* selvagem e mutante His-Arg de *E. coli* e carregando cópias dos genes codificantes para as quatro CSPs selvagens e mutantes His-Arg de *C. crescentus* foram introduzidos na linhagem RL211 que foi semeada em placa LB com e sem IPTG e incubadas a 15°C. (B) Estratégia desenvolvida por Phadtare et al (2003) para a determinação de atividade antiterminadora *in vivo* de proteínas CSPs. FONTE: Modificado de Phadtare et al. (2003). (C) Ensaio de antiterminação *in vivo* com as proteínas de choque frio selvagens e mutantes His-Arg de *C. crescentus*.

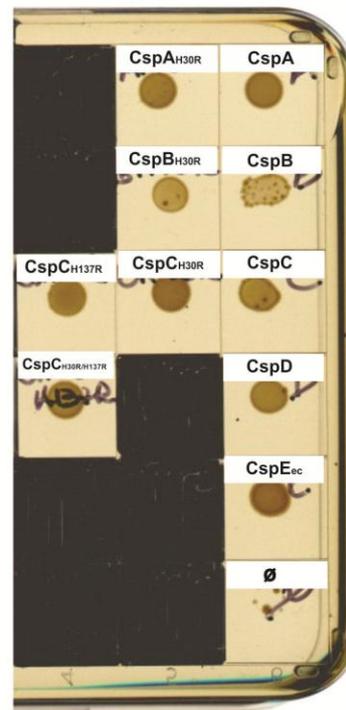
A



B



C



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*.

REFERÊNCIAS³

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.

³ 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 H₂O₂ 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 prokaryotes. **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 brings 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 Ca²⁺ - 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 *Eschericia 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 H₂O₂ 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.

STAROŃ, A.; MASCHER, T. General stress response in α -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.; AUFFRAY, 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.