Julia Albano de Barros

Estudo do papel da proteína CspD na fase
estacionária de *Caulobacter crescentus*

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

São Paulo
2017

Julia Albano de Barros

Estudo do papel da proteína CspD na fase
estacionária de *Caulobacter crescentus*

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

Área de Concentração: Microbiologia

Orientadora: Dra. Marilis do Valle Marques

Versão Parcial

São Paulo
2017

RESUMO

BARROS, J. A. **Estudo do papel da proteína CspD na fase estacionária de *Caulobacter crescentus***. 2017. 72 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

As proteínas de choque frio são caracterizadas por possuírem um domínio conservado chamado domínio de choque frio, que contem dois sítios de afinidade a ácidos nucleicos e, é proposto que sua a função principal das Csps seja como *chaperones* de RNA. Com objetivo de elucidar se CspD em *Caulobacter crescentus* possui a mesma função que em *E. coli* de inibir a replicação do DNA, foi avaliado o efeito da superexpressão de CspD em *Caulobacter crescentus*, no crescimento desta bactéria e constatamos que, diferentemente do observado em *E. coli*, não houve efeito deletério ao crescimento. Ainda, quando superexpressa em *E. coli*, CspD de *C. crescentus* não demonstrou efeito algum no crescimento da bactéria. Além disso, através da eletroforese bidimensional de extrato total do mutante deletado de *cspD*, foi possível investigar se a proteína tem efeito sob o padrão de expressão de outras proteínas. Além da protease ClpP, enzimas envolvidas no metabolismo de purinas e aminoácidos estão entre as que demonstraram expressão diferencial na ausência do gene *cspD*. Os dados obtidos na eletroforese bidimensional foram validados por meio de qRT-PCR. Um ensaio da ligação de CspD com ácidos nucleicos específicos foi realizado com dois fragmentos diferentes de DNA e de RNA, no entanto, não se observou ligação entre a proteína e o ácido nucleico. Finalmente, foi possível concluir, por meio de ensaios de western *blotting* de extratos totais de mutantes de diferentes proteases, que CspD sofre regulação pós traducional pela protease Lon.

Palavras-chave: Microbiologia. Biologia Molecular. Proteínas de choque frio. *Caulobacter crescentus*.

ABSTRACT

BARROS, J. A. **Study of the role of CspD in *Caulobacter crescentus* stationary phase.** 2017. 72 p. Master thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Cold shock proteins are characterized for having a conserved domain known as cold shock domain that possesses two nucleic acid binding motifs and it is proposed that Csp's main function is acting as RNA's chaperones. In order to elucidate if CspD in *Caulobacter crescentus* has the same role as in *E. coli*, we analyzed the effect of overexpressing CspD in bacterial growth and concluded that opposite from what its observed in *Escherichia coli*, it didn't affect growth. Yet, when over expressed in *E. coli*, CspD did not show any effect on the bacterial growth. Through two-dimensional gel electrophoresis of the *cspD* null mutant, it was possible to investigate if the protein is affecting the expression pattern of the other proteins on the cell. Along with ClpP protease, enzymes that are involved in the purine and amino acid metabolism are among those proteins that showed differential expression in the absence of *cspD*. The data obtained from the two-dimensional gel electrophoresis were validated through qRT-PCR. The binding of CspD to nucleic acids was investigated using two specific DNA and RNA fragments, however, no binding of the protein to the nucleic acids was observed. Finally through western blotting assays using total protein extracts from mutants of different proteases, it was possible to conclude that CspD is post translationally regulated by the Lon protease.

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

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Estresse térmico em bactérias

Bactérias ambientais estão susceptíveis a todo tipo de variação no seu habitat, desde mudanças de temperatura como mudanças nas concentrações de solutos (estresse osmótico) e nutrientes. Sendo assim, para sobreviver os micro-organismos precisam conseguir lidar com essas alterações. Um tipo comum de estresse para as bactérias é o estresse térmico, que pode ser o choque térmico de calor ou o choque frio.

Para bactérias mesófilas, é considerado que houve choque frio quando há o súbito decréscimo de temperatura em vários graus em um curto período de tempo, em relação a temperatura ótima de crescimento e a temperatura considerada como limite para que haja viabilidade (HORN et al., 2007).

Quando ocorre o choque frio, o padrão de síntese proteica da célula irá ser modificado e a célula sofre consequências como a redução da fluidez da membrana, a diminuição na eficiência da tradução e aumento da estabilidade de estruturas secundárias de ácidos nucléicos, que podem afetar os processos essenciais para a sobrevivência da célula: transcrição, tradução e replicação do DNA (PHADTARE, et al., 2000). Quando estruturas secundárias de mRNA estão presentes na célula, elas podem impedir a ligação do ribossomo ao seu sítio específico, prejudicando a tradução. Para compensar o efeito deletério das estruturas secundárias nos RNAs, proteínas de choque frio (*cold shock proteins* - CSPs) são produzidas e ajudam a manter o RNA funcional evitando a formação dessas estruturas.

1.2 Proteínas de choque frio (*Cold shock proteins*)

As proteínas de choque frio (CSPs) constituem uma família de proteínas caracterizadas por possuírem um domínio conservado chamado domínio de choque frio (CSD), que contem dois sítios de afinidade a ácidos nucléicos, RNP1 e RNP2. É proposto que a função principal dessas proteínas seja como *chaperones* de RNA, isto é, se liguem ao RNA nascente impedindo a formação de estruturas secundárias que possam ser prejudiciais para a célula (HORN et al., 2007; JIANG; HOU; INOUE, 1997). Por desfazerem as estruturas secundárias no mRNA que possam ter sido formadas no choque frio, as CSPs disponibilizam o sítio de ligação do ribossomo e evitam que a tradução seja interrompida nessas condições, processo crucial para a sobrevivência da célula (JIANG; HOU; INOUE, 1997).

Os genes que codificam as proteínas de choque frio estão presentes no genoma de diversas bactérias e, podem ser induzidos por diferentes fatores, não somente a diminuição na temperatura. Alguns são induzidos no início da fase estacionária do crescimento, e alguns genes são expressos constitutivamente (YAMANAKA; INOUE, 1997). Além disso, sua expressão pode ser ativada por fatores de transcrição diferentes (WANG; YAMANAKA; INOUE, 1999; YAMANAKA; INOUE, 1997).

A proteína CspA de *Escherichia coli* foi a primeira CSP a ser descrita e já foram identificadas mais oito proteínas homólogas a CspA em *E. coli* (CspB a CspI). Em *E. coli*, as proteínas CspA, CspB, CspG e CspI são induzidas pelo choque frio (YAMANAKA; FANG; INOUE, 1998). CspC e CspE são expressas constitutivamente na temperatura ideal de crescimento da bactéria, 37 °C (XIA; KE; INOUE, 2001). Já CspD é expressa na fase estacionária de crescimento, quando há baixa disponibilidade de nutrientes no ambiente (YAMANAKA; INOUE, 1997).

Estruturalmente, as proteínas de choque frio possuem cinco folhas β antiparalelas formando um barril- β que compõe uma estrutura capaz de se ligar a ácidos nucleicos com os sítios RNP1 e RNP2 razoavelmente conservados (HORN et al., 2007). Na figura 1 está demonstrada a estrutura tridimensional de CspA de *Escherichia coli* com as folhas β (SCHINDELIN et al., 1994).

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura tridimensional da proteína de choque frio A de *E. coli*. A estrutura consiste em dois subdomínios arranjados perpendicularmente que formam um barril β com cinco folhas. Os barris β estão demonstrados por setas. Fonte: Schindelin et al., 1994

Na estrutura tridimensional resolvida de CSPs de alguns organismos, como as de *E. coli*, os resíduos de aminoácidos aromáticos e básicos formam uma superfície que é capaz de reconhecer diferentes sequências de nucleotídeos (SCHRÖDER et al., 1995). A ligação de proteínas de choque frio a ácidos nucleicos fita-simples foi comprovada experimentalmente pela análise do complexo entre CspA de *E. coli* e ssDNA (NEWKIRK et al., 1994) e do complexo entre CspB de *Bacillus subtilis* e ssDNA (ZEEB; BALBACH, 2003). CspA de *E. coli* se liga a ssDNA e RNA sem aparente especificidade (JIANG; HOU; INOUE, 1997) enquanto CspB de *B. subtilis* possui preferência por sequências específicas: ATTGG- e CCAAT- (GRAUMANN; MARAHIEL, 1994). A habilidade de se ligar a fitas simples de ácidos nucleicos (DNA fita simples e RNA) é aparentemente uma função conservada dos domínios de choque frio durante toda a evolução (GRAUMANN; MARAHIEL, 1998; YAMANAKA; FANG; INOUE, 1998).

Além da função de *chaperones* de RNA que as proteínas de choque frio exercem, já foi visto que estas podem desempenhar outras funções fisiológicas importantes na célula. Em *E. coli*, CspA foi descrita como tendo função de antiterminador transcricional assim como seus homólogos CspC e CspE (BAE et al., 2000). A proteína CspD de *E. coli* foi descrita como inibidor da replicação (YAMANAKA et al., 2001). Além disso, foi proposto que CSPs podem alterar a estabilidade ou meia-vida de mRNAs, pela sua capacidade de se ligar a ácidos nucleicos (PHADTARE; INOUE, 2001; SANTOS et al., 2015).

1.3 CspD em *Escherichia coli*

Muitas proteínas que são induzidas na fase estacionária são conhecidas por possuir atividades que reduzem o metabolismo celular, já que existe uma escassez de nutrientes no meio, impossibilitando que o crescimento celular ocorra de maneira adequada e eficiente. Sendo assim, várias atividades celulares são inibidas por diferentes fatores, e CspD é descrita como um fator que bloqueia a síntese de DNA em *E. coli* (YAMANAKA et al., 2001). Nessa enterobactéria, CspD atua como inibidor de replicação do DNA para que a célula se adapte à nova condição nutricional na fase estacionária (YAMANAKA et al., 2001). No entanto, apesar de ser regulada ao nível de transcrição, não depende do fator sigma σ^S de *E. coli* (YAMANAKA; INOUE, 1997).

Além de *cspD*, *cspB* e *cspC* de *B. subtilis* e *cspC* e *cspD* de *Caulobacter crescentus* também são induzidas na fase estacionária do crescimento (GRAUMANN; MARAHIEL, 1998; LANG; MARQUES, 2004; YAMANAKA; INOUE, 1997).

A proteína CspD é distantemente relacionada a CspA de *E. coli*, com apenas 32 resíduos idênticos de 74 aminoácidos (YAMANAKA et al., 2001). No entanto, as sequências esperadas das folhas $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 3$ são semelhantes às aquelas encontradas em CspA e, mais importante, os cinco resíduos de aminoácidos que formam o centro hidrofóbico da proteína também estão conservados em ambas as proteínas. Diferentemente de CspA, que é encontrada como monômero em solução (NEWKIRK et al., 1994), CspD é encontrada apenas na forma de dímero nas condições fisiológicas, com um tamanho molecular de 15,0 kDa (YAMANAKA et al., 2001).

Em relação à ligação de CspD de *E. coli* a ácidos nucleicos, foi visto por Yamanaka et al., 2001 que esta proteína é capaz de se ligar em sequências totalmente diferentes de DNA fita simples, indicando que esta ligação ocorre sem especificidade (YAMANAKA et al., 2001). Essa ligação ocorreu mesmo na presença de cloreto de potássio (KCl) indicando que a interação que ocorre entre a proteína e o DNA é devido as forças hidrofóbicas e não forças iônicas (YAMANAKA et al., 2001). Além disso, CspD se ligou a sondas de RNA de maneira semelhante à que se ligou a ssDNA. Dessa forma, concluiu-se que CspD se liga a ssDNA e a RNA devido a interações hidrofóbicas, dependente da quantidade de ácido nucleico e sem aparente especificidade de sequência (YAMANAKA et al., 2001).

Yamanaka e colaboradores (YAMANAKA et al., 2001) também concluíram que em *E. coli*, CspD é um inibidor da replicação do DNA baseado em nos seguintes fatos: i) *cspD* não é essencial para o crescimento da célula e sua interrupção não tem efeito no crescimento ou morfologia; ii) a superprodução de CspD causa uma mudança morfológica na célula semelhante às causadas por mutações em genes que codificam proteínas essenciais para replicação; iii) CspD é capaz de se ligar a ssDNA sem especificidade de sequência e; iv) CspD inibiu a síntese de DNA nas etapas de iniciação e elongação, *in vitro*. Assim, quando altamente expresso em *E. coli*, *cspD* causa efeito letal na célula provavelmente se ligando a fitas simples de DNA e bloqueando a síntese (*single stranded* DNA – ssDNA) (YAMANAKA et al., 2001).

Quando comparada com a principal proteína de choque frio de *E. coli*, CspA, CspD tem uma expressão consideravelmente menor: CspA é produzida entre 800.000 a 1.000.000 moléculas por célula quando a célula enfrenta o choque frio (JIANG; HOU; INOUE, 1997; YAMANAKA; INOUE, 2001), enquanto que CspD é produzida aproximadamente em 2.000 dímeros/célula quando a célula entra na fase estacionária do crescimento (YAMANAKA et al., 2001). No entanto, quando CspA é super-produzida, ela não causa um efeito letal para *E. coli*, diferentemente de CspD (YAMANAKA et al., 2001).

1.4 *Caulobacter crescentus*

Caulobacter crescentus é uma bactéria gram-negativa da família das Alphaproteobactérias, oligotrófica e que vive em ambientes aquáticos. Apesar de mesófila, é psicrotolerante, e pode ser encontrada em regiões que enfrentam baixa temperatura. Sua divisão celular é assimétrica resultando na formação de duas células-filhas distintas entre si, uma célula-talo e uma célula móvel. A célula-talo é sésil e associada a superfícies por meio de adesinas na extremidade do talo, enquanto a célula móvel possui um flagelo e pili em um de seus pólos. Enquanto célula-móvel, ela não é capaz de replicar o DNA. Para que isso ocorra, é necessário que essa célula se diferencie em célula-talo por meio de modificações morfológicas, desrepressão da replicação do DNA e consequente divisão celular (CURTIS; BRUN, 2010).

O ciclo celular de *C. crescentus* está demonstrado na figura 2. A célula sésil entra na fase S da divisão celular replicando seu DNA e cresce para se tornar uma célula pré-divisional. Na fase G2, após o término da replicação do DNA, um flagelo é formado no novo polo da célula móvel formada. Ocorre então a divisão celular, e as duas células-filhas se separam, dando origem a duas células morfolologicamente diferentes; a célula-talo voltará para a fase S enquanto a célula-móvel corresponde à fase G1 do ciclo celular. Após determinado período de tempo, a célula-móvel se diferenciará em uma célula-talo novamente, reiniciando o ciclo (CURTIS; BRUN, 2010). A linhagem NA1000 de *C. crescentus* possui 4.042.929 pares de bases em seu genoma, em um único cromossomo circular, que se organizam em 4.083 genes (MARKS et al., 2010). Seu ciclo celular diferenciado pode ser importante para que ela sobreviva em condições estressantes e na busca por ambientes com maior disponibilidade de nutrientes (LANG; MARQUES, 2004).

Figura 2 – Ciclo celular de *Caulobacter crescentus*. O ciclo se inicia com a célula-talo, que irá crescer e replicar seu DNA, se tornando uma célula pré-divisional. Nesse período, ela não é mais capaz de replicar o DNA. Ao final da fase pré-divisional, um flagelo é formado no pólo oposto ao talo. Posteriormente, os pili são expelidos e ocorre a separação das células em dois tipos celulares distintos. Uma célula é a célula-talo, que irá voltar ao ciclo celular, completando o ciclo. A outra é a célula móvel (“swarmer”) que é de vida livre e não é capaz de replicar seu DNA. A seguir, a célula de vida livre se diferencia em uma célula-talo. Fonte: Schrader et al., 2016

1.5 *csp*s no genoma de *Caulobacter crescentus*

No genoma de *C. crescentus* são encontrados quatro genes que codificam proteínas contendo CSD (LANG; MARQUES, 2004). A expressão de *cspA* e *cspB* é induzida quando a bactéria sofre um choque frio enquanto *cspC* e *cspD* são expressos somente durante a fase estacionária e estão provavelmente envolvidas na adaptação da célula a longos períodos com baixa disponibilidade de nutrientes e resposta ao estresse (LANG; MARQUES, 2004).

As proteínas CspA e CspB de *C. crescentus* tem 7 kDa e são semelhantes àquelas descritas em *E. coli*. Diferentemente, a proteína CspD tem 21,5 kDa e CspC tem 18 kDa (BALHESTEROS et al., 2010; LANG; MARQUES, 2004). Em relação aos CSDs, CspA e CspB possuem somente um domínio, enquanto CspC e CspD sofreram duplicação, e possuem dois domínios de choque frio. Apesar disso, CspC e CspD não possuem muitas semelhanças em suas estruturas primárias, além dos motivos RNP conservados (BALHESTEROS et al., 2010) como demonstrado na figura .

Figura 3 – Alinhamento da sequência de aminoácidos de CspC e CspD de *C. crescentus*. Resíduos semelhantes estão marcados em preto e os domínios RNP1 e RNP2 estão indicados. Fonte: adaptado de Balhasteros, 2009.

Diferentemente de CspD de *E. coli* que possui efeito de inibidor da replicação quando altamente expressa, resultados preliminares indicaram que *cspD* aparentemente não gera o mesmo efeito quando altamente expresso em *C. crescentus*, sugerindo que seu papel na célula e sua regulação sejam diferentes do que ocorre em *E. coli* (DA SILVA et al., 2010).

O gene *cspD* é induzido quando as células entram em uma fase de crescimento lento em resposta a baixa concentração de nutrientes, particularmente fontes de carbono (DA SILVA et al., 2010). Apesar de ser induzido na fase estacionária, não é essencial para a sobrevivência nesta fase (BALHESTEROS et al., 2010; LANG; MARQUES, 2004). Muitos dos genes que afetam a expressão de *cspD* na fase estacionária estão envolvidos no transporte de nutrientes e metabolismo de compostos de carbono (como aminoácidos e glicose).

Sabe-se que células de *C. crescentus* que já estão em fase estacionária por certo período de tempo adquirem uma morfologia alongada e helicoidal e são mais resistentes a diversos estresses, como estresse oxidativo, variações drásticas de pH e choque térmico (WORTINGER; QUARDOKUS; BRUN, 1998). Em enterobactérias, como *E. coli*, essa maior resistência a fatores adversos é regulada por um fator sigma σ^S codificado pelo gene *rpoS*, que direciona a RNA polimerase a promotores específicos (HENGGE-ARONIS, 2002; MAEDA; FUJITA; ISHIHAMA, 2000). No entanto, em α -proteobactérias ainda não se sabe ao certo como essa adaptação é regulada na fase estacionária (FRANCEZ-CHARLOT et al.,

2009). Em *C. crescentus* existem fatores sigma da família ECF que estão envolvidos neste tipo de regulação global, como o fator sigma T (LOURENÇO; KOHLER; GOMES, 2011).

1.5.1 Regulação de *cspD* em *Caulobacter crescentus*

Para compreender melhor a regulação de *cspD*, Silva e colaboradores (2010) testaram a expressão desse gene em diferentes linhagens mutantes de *C. crescentus* obtidos por transposição com o transposon Tn5. No mutante em que o gene CCNA_00247, que codifica um regulador de resposta, estava interrompido, a expressão de *cspD* na fase estacionária foi menor, sendo esse gene denominado *spdR*. Além disso, o gene adjacente (*spdS*) codifica uma histidina quinase associada a *spdR*. Foi demonstrado por Silva e colaboradores, que SpdS foi capaz de fosforilar SpdR *in vitro* (DA SILVA et al., 2010). Assim, SpdS e SpdR formam um sistema de dois componentes e trabalham em conjunto regulando genes em resposta a sinais recebidos pela célula (DA SILVA et al., 2010). A análise de sua estrutura indica que o sinal para sua atividade de fosfotransferência pode ser pela ligação de uma molécula extracelular (DA SILVA et al., 2010).

Ao ser fosforilado, o regulador de resposta SpdR se liga a uma repetição invertida imperfeita posicionada *upstream* da região -35 de *cspD* (entre as posições -87 e -69) ativando sua transcrição no início da fase estacionária (DA SILVA et al., 2010). O papel de SpdR ativando a expressão de *cspD* no início da fase estacionária sugere que esse regulador pode ser ativado pela fosforilação desencadeada pela falta de nutrientes, mais provavelmente relacionada às fontes de carbono (DA SILVA et al., 2010). Além disso, a enzima SpoT, responsável pela síntese e degradação do segundo mensageiro, ppGpp, também é necessária para a indução máxima de *cspD* nesta fase. Foi proposto que SpoT é necessário para sinalizar a escassez de nutrientes no meio, enquanto SpdR pode estar envolvido em sinalizar outras mudanças fisiológicas que ocorrem no início da fase estacionária (DA SILVA et al., 2010).

1.6 Regulação pós traducional dependente de proteólise

A regulação pós-traducional dependente de proteólise é um mecanismo comum em bactérias (LANGKLOTZ; NARBERHAUS, 2011). Além de eliminar proteínas danificadas, as proteases são importantes para o controle temporal de processos celulares, regulando os níveis de proteínas específicas durante o desenvolvimento ou em resposta a uma mudança no

ambiente (GOTTESMAN, 1999). Além disso, a regulação por proteólise de proteínas contendo domínio de choque frio já foi previamente descrito (GERTH et al., 2008).

Foi descrito que em *E. coli* a degradação de CspD é realizada pela protease Lon e é coordenada com a taxa e fase de crescimento da cultura. Ou seja, quando as células estão com menor taxa de crescimento, ou entram na fase estacionária, a proteólise ocorre devagar, possibilitando que CspD aumente em concentração e cause seu efeito inibitório na replicação do DNA. Já quando a taxa de crescimento se torna maior, ou em fase exponencial, a degradação de CspD ocorre de maneira rápida e, assim, não interfere na replicação do DNA (LANGKLOTZ; NARBERHAUS, 2011). Outras proteínas de choque frio são conhecidas por sofrerem esse mesmo tipo de regulação, como CspC em *E. coli* (SHENHAR et al., 2009) e CspD em *Bacillus subtilis* (GERTH et al., 2008).

A protease Lon pertence a família de proteases AAA+, onde pelo menos uma proteína pertence a superfamília ATPases associadas a diversas atividades celulares. As proteases ClpXP e FtsH também pertencem a esta superfamília (SAUER; BAKER, 2011). Juntamente com a protease Lon, as proteases ClpP são responsáveis pela degradação de pelo menos 70% das proteínas de *E. coli* (WEICHART et al., 2003).

As proteases AAA+ possuem um anel hexamérico com um poro central axial. Um sinal de degradação é reconhecido pela protease e após diversos ciclos de hidrólise de ATP faz com que a proteína se desdobre e ocorra a translocação do substrato pelo poro central, ocorrendo a degradação da proteína (SAUER; BAKER, 2011).

Em bactérias, o reconhecimento de proteínas destinadas para degradação por proteases dessa família muitas vezes ocorre por reconhecimento de uma sequência curta de peptídeos, como por exemplo, a protease ClpXP que degradará qualquer proteína com Ala-Ala na extremidade C-terminal (FLYNN et al., 2003; SAUER; BAKER, 2011). A protease Lon reconhece normalmente resíduos aromáticos e hidrofóbicos como sinais para a degradação (GONZALEZ et al., 1998).

A protease Lon não é essencial para a célula, mas regula diversos mecanismos de resposta a estresse. Em *E. coli*, está envolvida em mecanismos importantes para a manutenção da sobrevivência da célula, como o sistema SOS (VAN MELDEREN; AERTSEN, 2009) e controla os níveis celulares de CspD (LANGKLOTZ; NARBERHAUS, 2011).

Em *C. crescentus*, a protease Lon está presente durante todo o ciclo celular e controla a degradação da DNA metiltransferase CcrM. CcrM é responsável pela remetilação do genoma. Sendo assim, está presente somente na célula pré-divisional e sua degradação ocorre logo antes da divisão celular (WRIGHT et al., 1996). Linhagens com deleção no gene *lon*

mostram diferenças quando comparadas às linhagens selvagens em relação a aspectos relacionados à metilação contínua do DNA, efeito da ausência da protease para degradar a enzima responsável por isso. Além disso, são observados efeitos aparentemente não relacionados com a metilação do DNA, como morfologia anormal da célula e alteração no crescimento. Isso indica que, apesar de não ser essencial para viabilidade celular, Lon pode ser importante para controlar os níveis de outras proteínas relevantes para o desenvolvimento normal de *C. crescentus* (WRIGHT et al., 1996).

Outra protease, ClpXP, é necessária para progressão do ciclo celular de *C. crescentus*. Linhagens que não possuem uma das duas subunidades da protease não conseguem chegar à etapa de replicação do DNA do ciclo, já que ou ClpX ou ClpP são necessárias para a degradação *in vivo* da proteína regulatória CtrA, que regula negativamente a replicação do DNA (JENAL; FUCHS, 1998). A proteína CtrA está ativa em células móveis, na fase G1 do ciclo, e é capaz de se ligar na origem de replicação e silenciar a replicação do cromossomo. Quando a degradação de CtrA ocorre, a célula consegue progredir em seu ciclo celular, passando da fase G1 para a fase S do ciclo (QUON et al., 1998).

A protease FtsH não é essencial em condições fisiológicas de crescimento de *C. crescentus*, mas é necessária para sobrevivência sob condições estressantes, sendo considerada um componente da resposta geral a estresses (FISCHER et al., 2002). Linhagens mutantes para esta protease se mostraram mais sensíveis a altas temperaturas, presença de antibióticos e altas concentrações de sal (FISCHER et al., 2002). Além disso, foi visto que a expressão de *ftsH* é induzida após choque térmico e na fase estacionária do crescimento, indicando que esta protease é necessária para a sobrevivência nessa fase (FISCHER et al., 2002).

Por apresentar diferenças em relação à CspD de *E. coli*, pelo modo como a proteína CspD de *C. crescentus* é regulada e por seu papel indeterminado como inibidora da replicação do DNA, o envolvimento de CspD com a adaptação da célula em fase estacionária ainda não está totalmente elucidado, sendo necessários mais estudos nessa área. O fato de *C. crescentus* apresentar um ciclo celular muito mais complexo que *E. coli* provavelmente requer que a regulação exercida seja também mais complexa. É essencial determinar se CspD exerce algum papel regulatório da replicação do DNA e do ciclo celular, definir quais são os efeitos de sua expressão, e se esta é regulada por proteólise como em outras bactérias.

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho, fazendo o uso de linhagens de *C. crescentus* já disponíveis no laboratório foram feitas análises do crescimento da bactéria em condições de superexpressão de CspD. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que a proteína não causa efeitos de bloqueio do crescimento da bactéria como é visto no caso de CspD em *E. coli*. Esse resultado foi constatado fazendo o uso de linhagens com diferentes vetores para superexpressão de *cspD*, uma com vanilato como indutor e outra com xilose.

Além disso, quando ocorre a superexpressão de CspD de *C. crescentus* em *E. coli*, o crescimento dessa bactéria também ocorre normalmente. Ao comparar a sequência de aminoácidos de algumas proteínas de choque frio que são induzidas na fase estacionária de crescimento de outras bactérias com CspD de *C. crescentus* é possível perceber que ela possui poucas semelhanças além dos motivos de ligação à ácidos nucleicos RNP1 e RNP2. Provavelmente estas diferenças se refletem na estrutura e, conseqüentemente na sua função na célula.

Com a eletroforese bidimensional, foi possível concluir que a proteína CspD pode alterar a expressão de outras proteínas como a protease ClpP, e outras enzimas relacionadas com a síntese proteica, a via metabólica de síntese de purinas e o metabolismo de aminoácidos. Além disso, como forma de validar os dados obtidos pela eletroforese bidimensional, os resultados da análise de qRT-PCR levaram a especular que pode ocorrer algum tipo de regulação pós-traducional de CCNA_00140 e CCNA_01946 por demonstrarem um nível de mRNA que não corresponde ao padrão proteico encontrado.

O papel da ligação de CspD com ácidos nucleicos foi testada, no entanto, não foi vista nenhuma interação. Isso pode ter ocorrido pelos fragmentos de ácidos nucleicos utilizados como sonda, por serem genes específicos dados como possivelmente relevantes para CspD. Além disso, o fragmento de DNA testado foi de fita dupla. Não foi vista ligação da proteína com RNA, o que não vai de acordo com o resultado esperado visto que ela é considerada uma *chaperone* de RNA. Novamente, a sonda utilizada pode ter influenciado no resultado, assim como a metodologia pouco sensível.

Finalmente, ensaios de western *blotting* com mutantes de diferentes proteases mostraram que a regulação pós traducional de CspD em *C. crescentus* assim como em *E. coli* é realizada pela protease Lon.

REFERÊNCIAS*

- BAE, W. et al. Escherichia coli CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 14, 2000.
- BALHESTEROS, H. **Análise do papel do gene cspC de *Caulivacter crescentus* e de sua regulação**. 2009 126 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- BALHESTEROS, H. et al. CspC and CspD are essential for Caulobacter crescentus stationary phase survival. **Archives of microbiology**, v. 192, n. 9, p. 747–758, set. 2010.
- BEDOUELLE, H.; GUEZ-IVANIER, V.; NAGEOTTE, R. Discrimination between transfer-RNAs by tyrosyl-tRNA synthetase. **Biochimie**, v. 75, n. 12, p. 1099–1108, 1993.
- CHEN, W.; KUO, T. A simple and rapid method for the preparation of gram- negative bacterial genomic DNA. v. 21, n. 9, p. 11529, 1993.
- CURTIS, P. D.; BRUN, Y. V. Getting in the loop: regulation of development in Caulobacter crescentus. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 74, n. 1, p. 13–41, mar. 2010.
- DA SILVA, C. A. P. T. et al. Transcriptomic analysis of the stationary phase response regulator SpdR in Caulobacter crescentus. **BMC microbiology**, v. 16, p. 66, 2016.
- DA SILVA, C. A P. T. et al. SpdR, a response regulator required for stationary-phase induction of Caulobacter crescentus cspD. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 22, p. 5991–6000, nov. 2010.
- ELY, B. Genetics of Caulobacter crescentus. **Methods in enzymology**, v. 204, p. 372–384, 1991.
- ELY, B.; AMARASINGHE, A. B. C.; BENDER, R. A. Ammonia assimilation and glutamate formation in Caulobacter crescentus. **Journal of Bacteriology**, v. 133, n. 1, p. 225–230, 1978.
- EVINGER, M.; AGABIAN, N. Envelope-associated nucleoid from Caulobacter crescentus stalked and swarmer cells. **Journal of Bacteriology**, v. 132, n. 1, p. 294–301, 1977.
- FISCHER, B. et al. The FtsH protease is involved in development, stress response and heat shock control in Caulobacter crescentus. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 461–478, 25 abr. 2002.

*De acordo com:

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

FLYNN, J. M. et al. Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. **Molecular Cell**, v. 11, n. 3, p. 671–683, 2003.

FRANCEZ-CHARLOT, A. et al. Sigma factor mimicry involved in regulation of general stress response. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 9, p. 3467–3472, 2009.

GERTH, U. et al. Clp-dependent proteolysis down-regulates central metabolic pathways in glucose-starved *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 1, p. 321–331, 2008.

GONZALEZ, M. et al. Lon-mediated proteolysis of the *Escherichia coli* UmuD mutagenesis protein: In vitro degradation and identification of residues required for proteolysis. **Genes and Development**, v. 12, n. 24, p. 3889–3899, 1998.

GOTTESMAN, S. Regulation by proteolysis: Developmental switches. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 142–147, 1999.

GRAUMANN, P. L.; MARAHIEL, M. A. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 23, n. 8, p. 286–290, 1998.

GRAUMANN, P.; MARAHIEL, M. A. The major cold shock protein of *Bacillus subtilis* CspB binds with high affinity to the ATTGG- and CCAAT sequences in single stranded oligonucleotides. **FEBS Letters**, v. 338, n. 2, p. 157–160, 1994.

HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of molecular biology**, v. 166, n. 4, p. 557–580, 5 jun. 1983.

HENGGE-ARONIS, R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 66, n. 3, p. 373–395, table of contents, 2002.

HORN, G. et al. Structure and function of bacterial cold shock proteins. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 64, n. 12, p. 1457–70, jun. 2007.

JENAL, U.; FUCHS, T. An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. **EMBO Journal**, v. 17, n. 19, p. 5658–5669, 1998.

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

KOHLER, C. et al. A comprehensive genomic, transcriptomic and proteomic analysis of a hyperosmotic stress sensitive α -proteobacterium. **BMC microbiology**, v. 15, p. 71, 2015.

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

LANGKLOTZ, S.; NARBERHAUS, F. The *Escherichia coli* replication inhibitor CspD is

subject to growth-regulated degradation by the Lon protease. **Molecular microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1313–1325, jun. 2011.

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

MAEDA, H.; FUJITA, N.; ISHIHAMA, A. Competition among seven *Escherichia coli* sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 18, p. 3497–3503, 2000.

MARKS, M. E. et al. The genetic basis of laboratory adaptation in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 14, p. 3678–3688, 2010.

MASCARENHAS, J.; WEBER, M. H. W.; GRAUMANN, P. L. Specific polar localization of ribosomes in *Bacillus subtilis* depends on active transcription. **EMBO Reports**, v. 2, n. 8, p. 685–689, 2001.

NEWKIRK, K. et al. Solution NMR structure of the major cold shock protein (CspA) from *Escherichia coli* : Identification of a binding epitope for DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. May, p. 5114–5118, 1994.

PHADTARE, S.; INOUE, M. Role of CspC and CspE in Regulation of Expression of RpoS and UspA , the Stress Response Proteins in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 4, p. 1205–1214, 2001.

QUON, K. C. et al. Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 1, p. 120–125, 1998.

SANTOS, J. S. et al. CspC regulates the expression of the glyoxylate cycle genes at stationary phase in *Caulobacter*. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 638, 27 dez. 2015.

SAUER, R. T.; BAKER, T. A. AAA+ proteases: ATP-fueled machines of protein destruction. **Annual review of biochemistry**, v. 80, p. 587–612, 2011.

SCHINDELIN, H. et al. Crystal structure of CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 11, p. 5119–5123, 1994.

SCHRADER, J. M. et al. Dynamic translation regulation in *Caulobacter* cell cycle control. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 44, p. E6859–E6867, 2016.

SCHRÖDER, K. et al. 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. **Molecular Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 699–708, 1995.

SHENHAR, Y. et al. Adaptation of Escherichia coli to elevated temperatures involves a change in stability of heat shock gene transcripts. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 12, p. 2989–2997, 2009.

SHEVCHENKO, A. et al. Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. **Analytical Chemistry**, v. 68, n. 5, p. 850–858, 1996.

SILVA, C. A. P. T. **Estudo da regulação do gene CspD de Caulobacter crescentus**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PUHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. **Nature biotechnology**, v. 1, n. 9, p. 784–791, 1983.

THANBICHLER, M.; INIESTA, A. A; SHAPIRO, L. A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in Caulobacter crescentus. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 20, p. e137, jan. 2007.

TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350–4354, 1979.

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

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

WEICHAERT, D. et al. Global role for ClpP-containing proteases in stationary-phase adaptation of Escherichia coli. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 1, p. 115–125, 2003.

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

WRIGHT, R. et al. Caulobacter Lon protease has a critical role in cell-cycle control of DNA methylation. **Genes and Development**, v. 10, n. 12, p. 1532–1542, 1996.

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. **Molecular Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 179–188, 21 dez. 2001.

YAMANAKA, K. et al. CspD, a novel DNA replication inhibitor induced during the stationary phase in Escherichia coli. **Molecular Microbiology**, v. 39, n. 6, p. 1572–1584, mar. 2001.

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

YAMANAKA, K.; INOUE, M. Growth-phase-dependent expression of cspD, encoding a member of the CspA family in Escherichia coli. **Journal of bacteriology**, v. 179, n. 16, p. 5126–5130, 1997.

YAMANAKA, K.; INOUE, M. Induction of CspA, an E. coli major cold-shock protein, upon nutritional upshift at 37°C. **Genes to Cells**, v. 6, n. 4, p. 279–290, 2001.

ZEEB, M.; BALBACH, J. Single-stranded DNA binding of the cold-shock protein CspB from Bacillus subtilis: NMR mapping and mutational characterization. **Protein science**, v. 12, n. 1, p. 112–123, 2003.

ZHANG, Y.; MORAR, M.; EALICK, S. E. Structural biology of the purine biosynthetic pathway. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 23, p. 3699–3724, 19 dez. 2008.