Angel Alfonso Aguirre Durán

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE LINHAGENS MUTANTES DAS RNA HELICASES DEAD-
box DE *Caulobacter crescentus* EM CONDIÇÕES DE BAIXA TEMPERATURA

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

2017

Angel Alfonso Aguirre Durán

CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE LINHAGENS MUTANTES DAS RNA
HELICASES DEAD-box DE *Caulobacter crescentus* EM CONDIÇÕES DE BAIXA
TEMPERATURA

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. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo

2017

RESUMO

AGUIRRE, D. A. A. **Caracterização fenotípica de linhagens mutantes das RNA helicases DEAD-box de *Caulobacter crescentus* em condições de baixa temperatura.** 2017. 150 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

As RNA helicases da família DEAD-box são enzimas que alteram as estruturas secundárias do RNA e auxiliam a formação de complexos ribonucleoproteicos, e são muito importantes em processos basais como a degradação dos RNAs e a biogênese dos ribossomos. A α -proteobactéria criotolerante *Caulobacter crescentus* é um modelo experimental interessante para compreender o papel destas enzimas em baixa temperatura. A caracterização fenotípica de linhagens mutantes simples de quatro RNA helicases DEAD-box permitiu demonstrar que a RNA helicase RhIE é necessária para o crescimento em baixa temperatura. Os mutantes duplos mostraram redução do crescimento à temperatura normal e em baixa temperatura, com perda de viabilidade e alterações morfológicas. Através de ensaios de complementação cruzada mostrou-se que seus papéis fisiológicos são até certo ponto redundantes. O mutante *rhIE* também apresentou redução na formação de biofilme. A medida da expressão relativa dos genes que codificam as RNA helicases mostrou um aumento na expressão de três destes genes em estresse frio, e a análise dos perfis ribossomais mostrou a possível participação destas três RNA helicases na biogênese do ribossomo.

Palavras-chave: *Caulobacter crescentus*. RNA helicases DEAD-box. estresse frio. ribossomos.

ABSTRACT

AGUIRRE, D. A. A. **Phenotypic characterization of mutant lines of DEAD-box RNA helicases from *Caulobacter crescentus* under low temperature conditions.** 2017. 150 p. Ph. D thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

The RNA helicases of the DEAD-box family are enzymes that modify RNA secondary structures and help the formation of ribonucleoprotein complexes, and are very important in basal processes such as RNA degradation and ribosome biogenesis. The cryotolerant α -proteobacterium *Caulobacter crescentus* is an interesting experimental model to understand the role of these enzymes at low temperature. The phenotypic characterization of strains with single mutations of four DEAD-box RNA helicases showed that RNA helicase RhlE is required for growth at low temperature. The double mutants showed reduction in growth at both normal and low temperatures, with loss of viability and morphological changes. Through cross-complementation assays it has been shown that their physiological roles are to some extent redundant. The *rhlE* mutant also showed reduction in biofilm formation. The relative expression of the genes encoding the RNA helicases showed an increase in the expression of three of these genes under cold stress, and the analysis of the ribosomal profiles showed the possible participation of these three RNA helicases in ribosome biogenesis.

Keywords: *Caulobacter crescentus*. DEAD-box RNA helicases. cold stress. ribosomes.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Caulobacter crescentus*

Caulobacter crescentus é um organismo modelo utilizado para estudar diferenciação celular em bactérias, devido ao seu ciclo celular complexo (LAUB et al 2007; QUIÑONES-VALLES et al., 2014). As bactérias do gênero *Caulobacter* são Gram-negativas do grupo das alfa-proteobactérias, que habita meios ambientes aquáticos pobres em nutrientes, um estilo de vida facilitado por seu ciclo de desenvolvimento dimorfo e morfologia de bastão-curvado (WOLDEMESKEL; GOLEY, 2017). As alfa-proteobactérias compartilham mecanismos moleculares similares para controlar o seu ciclo celular, e *C. crescentus* é o modelo mais bem estudado por permitir a sincronização do ciclo (COLLIER, 2012).

Este ciclo de vida dimorfo em *Caulobacter* pode ter evoluído para permitir a exploração de estratégias distintas para a aquisição de nutrientes, e inclui tipos celulares móveis e sésseis (células-talo) com uma progressão obrigatória do ciclo celular (ASH et al., 2014). A célula móvel é uma célula não-competente para a replicação do DNA; após perder seu flagelo, se diferencia em uma célula-talo antes de replicar seu cromossomo e dividir. A célula-talo é aderente aos diversos substratos sub-aquáticos através de uma adesina na ponta do talo, enquanto a célula móvel quimiotaticamente ativa pode ativamente buscar micro-habitats ideais do ponto de vista nutricional (ASH et al., 2014). A célula móvel é incapaz de iniciar a replicação do DNA e dividir-se, e primeiro necessita diferenciar-se em uma célula-talo (Figura 1). Este passo inclui uma transição morfológica caracterizada pela ejeção de seu flagelo, retração de seus pili e crescimento no mesmo polo de uma extensão de seu envoltório celular chamada talo. A célula-talo se alonga, replica seu DNA, e um flagelo é montado no polo oposto do talo, produzindo uma célula pré-divisional. Finalmente, ocorre a compartimentalização e separação celular produzindo duas células-filhas bioquímica e morfológicamente distintas: uma célula-talo que pode imediatamente entrar em divisão e uma célula móvel que vai diferenciar-se em uma célula-talo antes de dividir-se. Em resumo a morfologia celular bacteriana é adaptável a mudanças nas condições ambientais (WOLDEMESKEL; GOLEY, 2017).

Cada morfotipo celular expressa um único conjunto de genes que codificam funções específicas do tipo celular, por exemplo, a célula móvel expressará genes para motilidade e quimiotaxia, a célula-talo para a replicação. Estes processos são estritamente regulados por um conjunto de reguladores transcricionais globais que possuem atividade restrita tanto temporal como espacialmente, mas que são interdependentes (COLLIER, 2012; KIRKPATRICK; VIOLLIER, 2012; RICCI et al., 2016). No entanto, não se conhece quais fatores exercem o controle sobre mais do 40% de promotores regulados no ciclo celular (RICCI et al., 2016; ZHOU et al., 2015;).

Embora o ciclo celular e seus mecanismos de controle sejam muito estudados em *C. crescentus*, outro aspecto importante de sua fisiologia é como seu ciclo celular responde às condições ambientais. Como *Caulobacter* é encontrada em regiões aquáticas tanto de água doce como marinhas, e em solos úmidos, deve responder adequadamente às condições nutricionais e de temperatura. Estudos anteriores de nosso grupo mostraram que *C. crescentus* NA1000 é altamente resistente ao congelamento, e alguns dos sistemas regulatórios e fisiológicos envolvidos foram identificados (BALHESTEROS et al., 2010; LANG; MARQUES, 2004; MAZZON et al., 2008; MAZZON et al., 2012). Os trabalhos anteriores levaram ao estudo de um grupo de proteínas importantes para a resposta a baixa temperatura, dentre as quais se encontram as enzimas helicases de RNA (RNA helicases).

Figura 1 – Ciclo celular de *Caulobacter crescentus*. A célula móvel precisa diferenciar-se em célula-talo para iniciar o ciclo. A célula-talo replica o DNA e no polo oposto sintetiza um flagelo. A célula alongada é chamada pré-divisional, e depois da citocinese são geradas duas células diferentes morfológica e fisiologicamente, que voltam ao ciclo em pontos distintos. Fonte. Modificado de Wingrove, Gober, 1995.

1.2 Helicases de RNA: Estrutura e Função

Quase todos os aspectos do metabolismo do RNA, desde a transcrição e tradução até a sua degradação, envolvem helicases de RNA (daqui em diante chamadas de RNA helicases neste trabalho), enzimas que usam a energia do ATP para alterar estruturas secundárias, unir ou remodelar RNAs e complexos RNA-proteínas (complexos ribonucleoproteicos) (JANKOWSKY et al., 2011; LINDER; JANKOWSKY, 2011). As RNA helicases encontram-se nos três domínios da vida e alguns vírus também codificam uma ou mais destas proteínas (FAIRMAN-WILLIAMS et al., 2010; GORBALENYA et al., 1993; LINDER; JANKOWSKY, 2011).

As RNA helicases estão divididas, junto com as DNA helicases e as DNA ou RNA translocases, em 6 superfamílias que se podem distinguir por sua sequência de aminoácidos (KHEMICI; LINDER, 2016; SINGLETON et al., 2007). As superfamílias SF1 e SF2 possuem uma região central com atividade helicase que possui dois domínios de helicase repetidos *in tandem* estruturalmente similares à proteína recombinase A bacteriana (FAIRMAN-WILLIAMS et al., 2010; JANKOWSKY et al., 2007; OWTTRIM, 2013). A superfamília 2 (SF2) das helicases compreende várias famílias de RNA helicases (DEAD, DEAH/RhA, Ski2-like, DExH viral), e incluem também DNA helicases (Rad3/XPD, RecQ, RecG) e as translocases (enzimas de restrição tipo 1; proteínas SWI/Snf-like) (FAIRMAN-WILLIAMS et al., 2010; KHEMICI; LINDER, 2016). Esta superfamília é definida pela presença de dois domínios centrais característicos, DEAD e Helicase_C, correspondendo aos dois domínios RecA-like (FAIRMAN-WILLIAMS et al., 2010).

É interessante notar que algumas famílias da SF2 incluem tanto RNA como DNA helicases, mas a família DEAD-box parece conter apenas RNA helicases (FAIRMAN-WILLIAMS et al., 2010). As RNA helicases DEAD-box compreendem uma grande família com a característica de ter um núcleo RNA helicase contendo no mínimo 12 motivos de aminoácidos conservados (Figura 2) (JANKOWSKY et al., 2007; OWTTRIM, 2013). Este núcleo catalítico comum de aproximadamente 400 resíduos de aminoácidos participa na ligação e desestabilização do dúplice de RNA em uma reação que depende de sua atividade de ATPase. Além disso, o núcleo catalítico de algumas proteínas tem domínios adicionais, ou realizam interações com proteínas acessórias, conferindo-lhe especificidade na função biológica (HARDIN et al., 2010).

É importante denotar que a maioria das RNA helicases também possuem extensões Amino (N)-terminal e ou Carboxi (C)-terminal que podem determinar a especificidade a RNA ou proteína (LINDER; JANKOWSKY, 2011; OWTTRIM, 2013) (Figura 2). Em vários casos, estas regiões formam domínios de dobramento específico que definem suas funções, como nucleases ou domínios ligantes de DNA ou RNA. Em bactérias, a maioria das proteínas DEAD-box não possuem domínios claros na região C-terminal, com exceção do grupo das RNA helicases similares a DbpA,

que possuem o domínio DbpA, que aparentemente é necessário para o intermediar o reconhecimento específico do rRNA 23S (KOSSEN et al., 2002; TSU et al., 2001;).

Figura 2 - Estrutura das RNA helicases DEAD-box. A. O núcleo da helicase DEAD-box consta de dois domínios parecidos com RecA e que contêm no mínimo 12 motivos de aminoácidos conservados característicos da família. O domínio II contém o motivo DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp). As RNA helicases DEAD-box frequentemente contêm extensões N-terminal e C-terminal que proporcionam interações específicas com RNA ou proteínas. Fonte: Modificado de Owttrim, 2013.

1.3 As RNA helicases como chaperones e remodeladoras de RNA

A principal atividade bioquímica das enzimas DEAD-RNA helicases é sua capacidade de remodelar o RNA, em um ciclo estimulado por sua ligação a RNA de cadeia simples ou dupla (ssRNA ou dsRNA) (JARMOSKAITE; RUSSEL, 2011), desenrolando uns poucos pares de bases do RNA dúplice, já que a atividade helicase não é efetiva quando se aumenta a estabilidade e comprimento da hélice entre 10-15 e 20-25 pares de bases (CARPOUSIS, 2007).

As RNA helicases DEAD-box ligam-se diretamente a uma região duplex de um RNA, assistida por regiões de fita simples ou regiões estruturadas. A ligação da RNA helicase pode envolver vários protômeros da helicase, mas também pode ser mediada por uma helicase simples que tem domínios proteicos acessórios. A ligação da RNA helicase sobre a hélice de RNA pode ocorrer nos extremos ou internamente em uma ou outra fita de RNAs com estrutura secundária (LINDER; JANKOWSKY, 2011; YANG et al., 2007). Algumas proteínas DEAD-box, como DbpA de

E. coli ou YxiN em *Bacillus subtilis*, possuem ligação específica ao RNA ribossômico 23S; outras proteínas DEAD-box como CYT-19, Mss116p, Ded1p, SrmB e Hera de *Thermus thermophilus* têm domínios de ligação a RNA não específicos. Algumas proteínas se unem ao RNA por dimerização, onde um monômero reconhece o RNA interagindo com ele, e o outro monômero o desenrola (JARMOSKAITE; RUSSEL, 2011).

Analisando a ligação de algumas DEAD-RNA helicases ao RNA, por exemplo, a helicase de *E. coli* DbpA, observou-se que ela interage com seu substrato biológico por meio de um motivo de reconhecimento carboxila-terminal, que constitui um domínio de ligação específico à forquilha 92 do centro peptidil-transferase no RNA ribossômico (rRNA) 23S (FULLER-PACE et al., 1993; NICOL; FULLER-PACE, 1995; TSU et al., 2001). Esta proteína liga-se a uma série de regiões do rRNA, como as hastes H90, H91 e H92. Na proteína YxiN de *B. subtilis* se observa um modo de reconhecimento diferente para o motivo que interage com o RNA. A análise cristalográfica do complexo da proteína YxiN confirmou que o domínio de ligação a RNA tem um motivo de reconhecimento com estrutura terciária similar ao motivo da proteína do spliceossomo U1A (HARDIN et al., 2010).

O mecanismo utilizado pelas proteínas DEAD-box para abrir e desenrolar o RNA é muito diferente das helicases convencionais, devido ao fato que a separação da hélice implica em pouca ou nenhuma translocação da proteína (JARMOSKAITE; RUSSEL, 2011). O ciclo de ligação-hidrólise de ATP pode induzir mudanças na conformação das proteínas DEAD-box. A atividade ATPásica destas proteínas é estritamente dependente de RNA, e a extensão do RNA pode afetar sua eficiência (REDDER et al., 2015). Os domínios relacionados a RecA do núcleo helicase movem-se com relativa liberdade em ausência de RNA e ATP. Os dados disponíveis sobre a estrutura e mecanismo de ação propõem um modelo coerente da conformação que as proteínas DEAD-box têm durante o ciclo de ligação e hidrólise de ATP, ainda que a transição estrutural relacionada com a atividade helicase não seja clara. No entanto a ligação a RNA dependente de ATP e o desenrolamento de dúplice estão implicados no mesmo ciclo de mudança de conformação (LINDER; JANKOWSKY, 2011). Também são propostos outros modelos para demonstrar a atividade helicase das proteínas DEAD-box (CORDIN et al., 2006).

Uma vez ligada, a helicase DEAD-box pode servir como um centro de nucleação para recrutar proteínas adicionais e estabelecer um grande complexo ribonucleoprotéico. A ligação da proteína DEAD-box com um RNA de fita dupla pode abrir localmente a fita duplex; este passo precisa de ATP, mas não necessariamente sua hidrólise (LINDER; JANKOWSKY, 2011; LIU et al., 2008). Entretanto, a hidrólise de ATP é importante na liberação de ADP, que promove a liberação da proteína DEAD-box do RNA, reciclando a enzima para outros substratos. A abertura localizada da hélice limita o número de pares de bases desenoveladas, no entanto os pares de bases

restantes são dissociados mais adiante pela ação da enzima. Como uma consequência, a taxa constante de desenovelamento diminui com o comprimento e estabilidade do duplex RNA. A hidrólise do ATP pode ter pouco efeito na separação das fitas, que pode ocorrer antes e depois do passo de clivagem químico reversível (LINDER; JANKOWSKY, 2011).

As funções das RNA helicases provavelmente não se limitam à alteração de estruturas no RNA, mas também podem participar da nucleação de interações proteína-proteína e manutenção de complexos ribonucleoprotéicos em uma configuração estável (OWTTRIM, 2013). A atividade das proteínas DEAD-box pode ser modulada por proteínas associadas que atuam nos mesmos processos biológicos e estimulam a sua atividade (REDDER et al., 2015). Por exemplo, a atividade da RNA helicase RhlB é estimulada por RNase E (CHANDRAN et al., 2007). A atividade da helicase Dbp5 em levedura é estimulada por sua interação com pequenas moléculas ou proteínas associadas, que suprimem o efeito inibitório da sua extensão N-terminal (MONTPETIT et al., 2011). Em *E. coli*, o inibidor da RNase E RraA pode inibir a atividade ATPásica dependente de RNA das RNA helicases RhlB e SrmB (PIETRAS et al., 2013).

1.4 As RNA helicases e o estresse frio

A resposta à baixa temperatura envolve mudanças em vários processos celulares para contrapor dois efeitos principais: a diminuição na fluidez da membrana e a maior estabilização de estruturas secundárias nos RNAs. A alteração na composição lipídica da membrana é feita aumentando a produção de ácidos graxos insaturados (SINENSKY, 1974). A estabilização de estruturas secundárias dos ácidos nucleicos, particularmente nos mRNAs, impedem que a tradução seja eficiente. Para facilitar a tradução dos mRNAs, novas proteínas ribossomais favorecem a adaptação dos ribossomos e pequenas proteínas induzidas por choque frio (*Cold Shock Proteins*; CSPs) são mais expressas para alterar a estabilidade das estruturas secundárias dos RNAs (PHADTARE; SEVERINOV, 2010).

No meio ambiente as células estão expostas a mudanças regulares na temperatura em intervalos repetitivos, e estas flutuações de temperatura podem afetar dramaticamente a fisiologia das culturas bacterianas (IVANCIC et al., 2013). Durante estresse frio a proteína CspA e seus parálogos CspB, CspG, e CspI desempenham papéis essenciais na adaptação a baixas temperaturas em *E. coli* (PHADTARE; INOUE, 2004; YAMANAKA et al., 1999). Por exemplo, CspA e CspB se ligam aos mRNAs e facilitam a sua tradução evitando a formação de estruturas secundárias (IVANCIC et al., 2013; JIANG et al., 1997; PHADTARE; INOUE, 1999). CspA tem outros papéis importantes na regulação da transcrição, como ativador de transcrição e como antiterminador (BAE et al., 2000; JIANG et al., 1997; JONES et al., 1992; LA TEANA et al., 1991;

PHADTARE; INOUE, 2004). Como a tradução de CspA e CspB não precisa de ribossomos adaptados ao frio (JONES et al., 1996), as células respondem rapidamente ao estresse, já que sua regulação é principalmente pós-transcricional (BRANDI et al., 1996).

Caulobacter crescentus tem quatro CSPs: CspA, CspB e CspD são induzidas no frio, e CspC e CspD são induzidas em fase estacionária (LANG; MARQUES, 2004; VICENTE, 2017). A síntese de CspA e CspB alcança os máximos níveis na fase de aclimação inicial. A deleção do gene *cspA* causa uma diminuição do crescimento em baixa temperatura, enquanto a cepa com uma deleção de *cspB* tem um fenótipo de crescimento relacionado com o frio mais sutil. O mutante *cspA/cspB* tem um fenótipo de crescimento em baixa temperatura mais severo que o mutante *cspA*, o que sugeriu que CspA pode ser mais importante para a adaptação ao frio que CspB. Ambos os genes são regulados em níveis transcricional e pós-transcricional, mediada pela região não traduzida 5' de cada gene, provavelmente por maior eficiência da tradução (MAZZON et al., 2012).

A atividade de RNA helicase é necessária para funções celulares normais nas temperaturas abaixo da ótima do crescimento já que rearranja estruturas secundárias no RNA que são termodinamicamente estabilizadas em baixa temperatura (CHAROLLAIS et al., 2003; OWTTRIM, 2013; TAMURA et al., 2012). O desenovelamento de estruturas secundárias geralmente não percorre distâncias longas, apenas uma ou duas voltas da hélice, mas, como descrito acima, também é possível que a interação com outros fatores acessórios aumente a processividade *in vivo* (LINDER et al., 2011; OWTTRIM, 2013).

Evidências da importância das proteínas DEAD-box na adaptação ao frio foram identificadas em muitos casos, geralmente através do estudo de mutantes nulos para os genes codificadores. A inativação dos genes das proteínas DEAD-box em bactérias leva a um fenótipo de sensibilidade ao frio (por exemplo, $\Delta srmB$ ou $\Delta csdA$ em *E. coli*; $\Delta cshA$, $\Delta cshB$ em Firmicutes; $\Delta crhC$ em cianobacteria) o qual indica que em baixa temperatura estas proteínas são importantes para evitar ou desenovelar estruturas secundárias estabilizadas (JAGESSAR; JAIN, 2010). Enquanto a deleção simples de *dbpA*, *rhIB*, *rhIE* ou *srmB* em *E. coli* não mostrou defeitos de crescimento a 37 °C, *csdA* apresentou um tempo de geração mais longo. Em baixa temperatura 25 °C, tanto o mutante *csdA* como *srmB* mostraram grande redução da taxa de crescimento (CHAROLLAIS et al., 2003, 2004; JAGESSAR; JAIN, 2010). Deve-se esclarecer que o gene *csdA* de *E. coli* também foi descrito com o nome *deaD*, mas para evitar confusão neste trabalho utilizaremos apenas o nome *csdA*.

Embora seja conhecida a presença em procariotos de muitas RNA helicases induzidas por estresse frio, os mecanismos pelos quais elas são reguladas por mudanças na temperatura ainda não são bem estudados (ROSANA et al., 2012). O gene *csdA* em *E. coli*, *rhIE* de *Psychrobacter* e o gene *cshA* de *B. subtilis* são induzidos em baixa temperatura, mas não se conhecem os

mecanismos regulatórios (BECKERING et al., 2002; BERGHOLZ et al., 2009; HUNGER et al., 2006; JONES et al., 1996). Os únicos sistemas bem estudados de regulação dos genes de RNA helicases no frio são os das cianobactérias (KHEMICI; LINDER, 2016).

A expressão da RNA helicase *crhR* da cianobactéria *Synechocystis* é induzida no frio, sendo autorregulada por uma combinação de mecanismos transcricionais e pós-transcricionais. A mudança na temperatura leva a uma acumulação inicial do transcrito *crhR*, e aumento da meia-vida do transcrito *crhR* e da proteína (ROSANA et al., 2012). Enquanto o gene da outra RNA helicase em cianobactéria *chrC* é regulado apenas em resposta a baixa temperatura, o gene *crhR* de *Anabaena* também é regulado pelo estado redox da cadeia transportadora de elétrons, com aumento de expressão por estresses que causam redução da cadeia como por exemplo baixa temperatura, estresse osmótico e transição entre luz-sombra (CHAMOT; OWTTRIM, 2000; KUJAT; OWTTRIM, 2000; ROSANA et al., 2012; VINNEMEIER; HAGEMANN, 1999).

1.5 Processos em bactérias em que as RNA helicases DEAD-box participam

As anomalias causadas pelas mutações nos genes das RNA helicases é explicada por deficiências em três principais processos celulares que requerem as proteínas DEAD-box: biogênese do ribossomo, iniciação da tradução e função do degradossomo (REDDER et al., 2015). Além disso, também foi reportado para *Staphylococcus aureus* que a carência de uma RNA helicase DEAD-box leva a uma diminuição na formação de biofilme (OUN et al., 2013).

1.5.1 RNA helicases na Biogênese do ribossomo

O ribossomo é um complexo ribonucleoproteico responsável por um dos processos-chave nas células, a síntese de proteínas. O ribossomo de bactérias sedimenta durante ultracentrifugação como uma partícula 70S composta de uma subunidade menor (30S) e uma subunidade maior (50S). A subunidade menor contém 21 proteínas ribossomais (designadas S1-S21) e um RNA ribossomal 16S (rRNA, com 1542 nucleotídeos), enquanto a subunidade maior contém 36 proteínas (designadas L1-L36), e dois rRNAs, o 23S (2904 nucleotídeos) e o 5S (120 nucleotídeos). A montagem do ribossomo é um processo altamente complexo e coordenado, mas pode seguir caminhos alternativos para que os precursores sejam montados na estrutura de forma correta (MULDER et al. 2010; SHAJANI et al., 2011; TALKINGTON et al., 2005).

Os passos básicos da montagem do ribossomo envolvem inicialmente a transcrição, processamento e modificação do rRNA, a tradução das proteínas ribossomais e a montagem correta do rRNA com as proteínas. Vários eventos estão acoplados e ocorrem em paralelo já durante a transcrição dos rRNAs. O processo da montagem segue gerando uma série de mudanças na conformação do RNA e eventos de ligação de proteínas, por meio dos quais os RNAs são estabilizados pela ligação de proteínas ribossomais, levando os RNAs até uma estrutura final (SHAJANI et al., 2011). As RNA helicases da família DExD/H-box têm papel importante nestes processos, desenovelando estruturas locais de RNA, agindo como chaperones de RNA em seu dobramento correto e facilitando sua interação com as proteínas do complexo (JANKOWSKY et al., 2001; LINDER, 2006; MOHR et al., 2002).

A participação das RNA helicases DEAD-box na biogênese do ribossomo foi primeiro descrita para *E. coli* (JONES et al., 1996; KHEMICI; LINDER, 2016; TOONE et al., 1991). Ainda que nenhuma das cinco RNA helicases DEAD-box encontradas em *E. coli* são indispensáveis, quatro delas se mostraram diretamente envolvidas na montagem do ribossomo, particularmente em baixa temperatura (MARTIN et al., 2013). Duas destas, SrmB e CsdA (chamada originalmente DeaD), foram originalmente isoladas como supressores multicópia das mutações sensíveis à temperatura nos genes das proteínas ribossomais L24 e S2, respectivamente (JONES et al., 1996; NISHI et al., 1988; TOONE et al., 1991). Desde então SrmB e CsdA foram identificadas como necessárias para a montagem da subunidade 50S em *E. coli* em baixa temperatura (CHAROLLAIS et al., 2003; CHAROLLAIS et al., 2004).

Os mutantes *csdA* têm uma redução na formação da ligação peptídica, sugerindo o envolvimento direto de CsdA na montagem do ribossomo. O perfil ribossomal da cepa mutante $\Delta csdA$ em baixa temperatura mostrou uma quantidade reduzida de polissomos e subunidades livres 50S, assim como uma acumulação de partículas 40S (PEIL et al., 2008). Estas partículas possuem uma composição proteica distinta das partículas normais 50S, com menor quantidade das proteínas montadas mais tardiamente (SHAJANI et al., 2011). No entanto a quantidade da subunidade 30S é igual à da cepa selvagem (CHAROLLAIS et al., 2004). CsdA interage com uma variedade de proteínas de ligação a ácidos nucleicos, incluindo as proteínas ribossomais, as metilases de DNA e RNase R, de uma maneira não dependente do RNA, sugerindo que pode executar papéis adicionais à montagem do ribossomo (BUTLAND et al., 2007).

A deleção do gene *srmB* causa um fenótipo de crescimento lento em baixa temperatura, e a análise do perfil ribossomal também mostrou uma acumulação de partículas 40S. A análise do RNA ribossômico e das proteínas ribossomais na partícula 40S mostrou que é uma subunidade ribossomal 50S que teve uma montagem incompleta. Em particular ocorre a ausência da proteína ribossomal L13, essencial para o primeiro passo na montagem do ribossomo. As frações nos gradientes de sacarose da cepa selvagem mostram também que SrmB está associada com

partículas precursoras da subunidade 50S. Estes resultados mostraram que SrmB está envolvida no primeiro passo da montagem da subunidade 50S, que é necessário para a união da proteína L13. Este passo pode ser um rearranjo estrutural, o qual em baixa temperatura não pode ocorrer sem a assistência desta RNA helicase (CHAROLLAIS et al., 2003). SrmB interage com as proteínas ribossomais L4 e L24 e o domínio localizado próximo da extremidade 5' do rRNA 23S sugerindo que estas dirigem SrmB para seu RNA alvo correto *in vivo*; este complexo ribonucleoproteico é estável *in vitro*, e SrmB auxilia que o rRNA 23S mantenha uma estrutura correta até que a montagem seja completada (TRUBETSKOY et al., 2009). As interações entre SrmB e o rRNA foram reveladas quando foram identificadas mutações no rRNA no mutante da RNA helicase SrmB. Estas mutações potencialmente impedem o pareamento das bases entre os rRNAs 23S e 5S, sugerindo que SrmB resolve estruturas impróprias nos rRNAs 23S e 5S que podem inibir a montagem da subunidade 50S. Estas interações indicam que SrmB é necessária para produzir o arranjo da estrutura secundária, fornecendo um sítio de nucleação para a proteína ribossomal L13 e os subsequentes passos no começo da montagem do ribossomo (PROUX et al., 2011).

A RNA helicase RhIE participa na montagem da subunidade 50S antes de CsdA e SrmB, cooperando com estas helicases na biogênese do ribossomo. *rhIE* quando em múltiplas cópias suprime parcialmente o efeito da mutação $\Delta csdA$ mas exacerba o fenótipo de sensibilidade ao frio no mutante $\Delta srmB$. Foi observado que o duplo mutante *csdA/rhIE* apresenta um maior número de subunidades precursoras de 50S que o mutante simples *csdA*, mas *srmB/rhIE* apresenta menos que *srmB* apenas. O modelo proposto foi de que RhIE regula a maturação do precursor da subunidade 50S através de duas vias de maturação separadas, nas quais níveis altos de RhIE dirigem para a via de CsdA, e níveis baixos de RhIE para a via de SrmB. A expressão de CsdA é induzida no frio e então nesta condição RhIE seleciona a CsdA para a montagem da subunidade 50S contribuindo na formação de um ribossomo adaptado ao frio. RhIE pode ter outras atividades na biogênese do ribossomo em *E. coli* já que foi mostrado que esta RNA helicase pode associar-se com as subunidades 50S, 30S e os ribossomos 70S (JAIN, 2008). O mecanismo que regula os níveis de expressão ou como RhIE interage ou dirige a atividade de outras helicases não é conhecido (OWTTRIM, 2013).

O gene que codifica a RNA helicase DbpA não é essencial e a cepa mutante não mostra um defeito no crescimento em meio rico a 37°C ou 25 °C. Não foi possível mostrar indícios conclusivos para a participação de DbpA na biogênese do ribossomo a 25°C em meio rico (OWTTRIM, 2013; PEIL et al., 2008;). Uma conexão desta helicase com a biogênese do ribossomo foi estudada na resposta do mutante R331A de DbpA. Esta mutação produz um fenótipo dominante de colônia pequena a 37°C e que foi mais severo a 22 °C. DbpA é uma das poucas helicases cuja sequência específica do RNA com o qual ela interage para ativar sua atividade de desenovelamento dependente do RNA é conhecida. Esta sequência é a hélice 92 do rRNA 23S, o

que sugere que sua função é mudar a estrutura deste domínio durante a biogênese do ribossomo (FULLER-PACE et al., 1993; NICOL et al., 1995; OWTTRIM, 2013). As células do mutante R331A acumularam partículas aberrantes 45S, e também mostraram carência de proteínas ribossomais L mais tardias na montagem do ribossomo (ELLES; UHLENBECK, 2008; OWTTRIM, 2013; SHARPE ELLES et al., 2009;). Estes resultados juntos sugerem que DbpA age em um passo tardio na montagem da subunidade 50S, provavelmente evitando a conformação incorreta do rRNA 23S e favorecendo mudanças estruturais que permitem a ligação das proteínas ribossomais L tardias (DIGES; UHLENBECK, 2001., REDDER et al., 2015).

Owttrim, (2013) propõe o seguinte modelo para explicar a ordem de participação das RNA helicases na biogênese do ribossomo em *Escherichia coli* (Figura 3).

Figura 3 - RNA helicases na biogênese do ribossomo em *Escherichia coli*. Ordem relativa da função de cada RNA helicase na montagem do ribossomo e os tamanhos das partículas intermediárias da subunidade 50S que são acumuladas nos mutantes das RNA helicases. RhIE funciona primeiro no processo da biogênese e dirige se a montagem continua com a via específica da RNA helicase SrmB ou DeaD (CsdA). DbpA participa mais tardiamente no processo. DeaD também é necessária em um passo tardio na montagem da subunidade 30S envolvendo o rRNA 16S. Fonte: Owttrim, 2013.

1.5.2 RNA helicases na regulação pós-transcricional

Alguns estudos implicaram a RNA helicase CsdA na desestabilização de estruturas secundárias de RNAs mensageiros, as quais impedem a união do ribossomo com as regiões do início da tradução (JONES et al., 1996; KABERDIN; BLÄSI, 2013), e afetando assim sua regulação pós-transcricional. Por exemplo, a liberação da repressão dos genes de choque térmico *dnaK* e *groEL*, induzidos após uma longa exposição a baixa temperatura, foi reduzida no mutante *csdA* (JONES et al., 1996). O mRNA de *rpoH* que codifica o fator sigma 32, o qual é necessário para a transcrição destes genes de estresse calor, contém estruturas secundárias que parcialmente sequestram o sítio de início da tradução (MORITA et al., 1999). Assim, a expressão diminuída dos genes de estresse de calor a 15°C na ausência de CsdA poderia ser o resultado de uma tradução reduzida do mRNA de *rpoH* estruturado (KABERDIN; BLÄSI, 2013). Entretanto, isso não se confirmou para o sistema de *Synechocystis*, onde a RNA helicase ChrR foi implicada apenas na estabilização dos transcritos de *groEL* 1/2 (PRAKASH et al., 2010).

Tamura et al (2012) demonstraram que a mutação no gene *csdA* pode parcialmente restaurar o crescimento em *E. coli* de um mutante *rne*, com ausência da RNase E funcional. Esta supressão é dependente da atividade de RNA helicase, sugerindo um papel importante no desenovelamento de estruturas secundárias neste processo. A superexpressão do gene *csdA* em *E. coli* aumentou a tradução do mRNA de *cat* construído com uma estrutura secundária que oculta a sequência Shine-Dalgarno, indicando que a RNA helicase CsdA em baixa temperatura deve desestabilizar a estrutura secundária inibitória favorecendo o início da tradução (BUTLAND et al., 2007; KABERDIN; BLÄSI, 2013).

Estudos dos pequenos RNAs regulatórios (sRNA), associados com a proteína Hfq têm colaborado para um conhecimento maior do controle pós-transcricional em bactérias (MIYAKOSHI et al., 2015; STORZ et al., 2011). Uma grande classe de sRNAs, através do pareamento de bases com seus mRNAs-alvo, agem inibindo ou ativando a tradução por bloqueio ou exposição do sítio de ligação ao ribossomo (GOTTESMAN et al., 2011; PENG et al., 2014).

Um sistema modelo bem estudado em *E. coli* é a ativação da tradução do mRNA de *rpoS*, o qual codifica o fator sigma de fase estacionária, RpoS, pelo sRNA DsrA em baixa temperatura (REPOILA et al., 2003; SLEDJESKI et al., 1996). O sítio de ligação do ribossomo no mRNA de *rpoS* em *E. coli* é ocultado por uma estrutura secundária do RNA, e a ativação da tradução do

mRNA *rpoS* é feita pela formação de duplex entre *rpoS* e DsrA por mediação da chaperone de RNA Hfq, que libera o RBS, e estabiliza o transcrito (SLEDJESKI et al., 2001). CsdA foi identificada como um fator auxiliar em baixa temperatura necessário para a ativação da síntese do fator sigma RpoS por Hfq/DsrA. A diminuição da síntese de RpoS no mutante *csdA* em baixa temperatura pode ser devida a um defeito no pareamento entre o mRNA *rpoS* e DsrA (KABERDIN; BLÄSI, 2013; RESCH et al., 2010). Assim, surgiu a hipótese que CsdA estaria envolvida na reestruturação de DsrA e/ou na abertura da estrutura secundária inibitória do mRNA *rpoS* em baixa temperatura, mas ainda não há comprovação experimental.

1.5.3 Participação das RNA helicases nos complexos de degradação do RNA

Em todos os organismos os transcritos têm um tempo de duração limitado, e sua instabilidade permite que a expressão da informação genética seja regulada em intensidade e duração para permitir a homeostase e uma resposta oportuna às mudanças no meio ambiente (BANDYRA et al., 2013). As Ribonucleases (RNases) têm um papel importante na regulação funcional, estabilidade e decaimento do RNA, e a ação combinada de endoribonucleases e exoribonucleases é necessária para regular a degradação dos mRNAs. Uma das enzimas-chave no processamento e decaimento do RNA em muitas espécies bacterianas é a endoribonuclease RNase E. Sua atividade endonucleásica ocorre preferencialmente com substratos contendo um monofosfato na extremidade 5', já que em bactérias os transcritos primários possuem um grupo trifosfato no 5', que protegem contra degradação (MACKIE, 1998).

Em adição à sua bem caracterizada atividade nucleace hidrolítica, a RNase E atua também como arcabouço molecular que coordena a formação de um complexo multienzimático chamado de degradossomo de RNA. O degradossomo de RNA de *Escherichia coli* tem sido o mais estudado e é composto pela RNase E, a RNA helicase DEAD-box RhlB, a enzima glicolítica enolase e a polinucleotídeo fosforilase (PNPase). O complexo catalisa a degradação a partir de uma clivagem inicial pela RNase E, com a PNPase exercendo sua atividade exonucleolítica 3'-5', e a RNA helicase desfazendo as estruturas secundárias que impedem a função (COBURN et al., 1999). Em várias espécies bacterianas não existe RNase E, como por exemplo em *Bacillus subtilis*, e nestes organismos o degradossomo de RNA se organiza sobre a endonuclease RNase Y (HARDWICK; LUISI, 2013). A RNase E possui o domínio catalítico na região amino-terminal, e um domínio C-terminal não-estruturado que possui sítios específicos para a ligação de outras enzimas, e em *E. coli* se liga à membrana citoplasmática pela sua extremidade C-terminal (HARDWICK; LUISI, 2013).

A composição do degradossomo varia um pouco em outras bactérias, e muitas outras proteínas têm sido associadas dinamicamente ou em níveis subestequiométricos (BANDYRA et al., 2013; VOSS et al., 2014). Mesmo em *E. coli*, por exemplo, foi demonstrado que outras enzimas como a RNA helicase de estresse frio CsdA isolada de degradossomos de RNA em baixa temperatura, pode substituir a RNA helicase RhlB *in vitro* (PRUD'HOMME-GÉNÉREUX et al., 2004). Também foi mostrado que a 15 °C, o degradossomo de RNA de estresse frio mostrou as mesmas funções que seu complexo equivalente a 37°C (MALFAVÓN et al., 2013; PRUD'HOMME-GÉNÉREUX et al., 2004). A RNase E pode ligar outras RNA helicases DEAD-box como SrmB e RhlE utilizando um sítio de ligação específico diferente ao sítio de ligação de RhlB; além disso, é possível reconstruir *in vitro* um degradossomo de RNA que contém a RNA helicase RhlE, obtendo degradação estimulada por ATP de fragmentos de mRNAs estruturados (KHEMICI et al., 2004). Outros estudos mostraram como componentes do degradossomo de RNA em *E. coli* a polifosfato quinase, as *chaperones* GroEI, DnaK (MICZAK et al., 1996; VANZO et al., 1998) e os reguladores da atividade ribonucleásica RraA, RraB e Hfq (KABERDIN; LIN-CHAO, 2009).

As interações físicas entre os componentes do degradossomo de RNA e outras RNases foi demonstrado usando diferentes técnicas (MALFAVÓN et al., 2013). A interação da RNase P, RNase E e a polinucleotídeo fosforilase (PNPase), foi inicialmente proposta por meio de análise de extratos celulares por gradiente de sacarose (JAIN et al., 1982). Ensaios de duplo híbrido em levedura, *western blotting* e coimunopurificação suportam um modelo para a interação da RNase E, PNPase, a helicase RhlB e enolase (VANZO et al., 1998;). Um complexo degradossomo funcionalmente ativo foi reconstituído a partir de RNase E, PNPase e RhlB purificadas e demonstrada sua função *in vitro* com ensaios de imunoprecipitação e *western blots* (COBURN et al., 1999; KHEMICI et al., 2004). As interações da RNase E, PNPase, Enolase e RhlB foram demonstradas em frações purificadas analisadas por espectrometria de massas (BUTLAND et al., 2005). As interações específicas entre PNPase e RNase E foram demonstradas também *in vivo* utilizando ensaios de cromatografia de afinidade e duplo híbrido em bactéria (DURÁN-FIGUEROA et al., 2006). A interação entre RhlB e RNase E em *E. coli* tem sido alvo de diversos estudos, e o sítio de reconhecimento para a RNA helicase foi mapeado em um curto segmento do domínio não catalítico C-terminal da RNase E (AIT-BARA; CARPOUSIS, 2010; HARDWICK et al., 2011) (Figura 4).

Em outras bactérias a composição do degradossomo pode variar até certo ponto (REDDER et al., 2015). Em *Pseudomonas syringae*, ligada à RNase E está RhlE, em menor escala SrmB, e em lugar da PNPase aparece a RNase R (PURUSHARTH et al., 2005). Em *Rhodobacter capsulatus* estão presentes duas DEAD-box RNA helicases, e o fator de terminação de transcrição Rho, mas não a PNPase nem enzimas metabólicas (JÄGER et al., 2001). Em *Helicobacter pylori*, a DEAD-box helicase RhpA e a proteína RNase J formam um degradossomo associado aos ribossomos (REDKO et al., 2013).

O degradossomo de *C. crescentus* é semelhante ao de *E. coli*, e seus componentes basais são a RNase E, uma RNA helicase DEAD-box RhlB (CC1847) e a PNPase. A conservação das interações helicase-ribonuclease enfatiza a importância funcional deste complexo (AIT-BARA; CARPOUSIS, 2010; HARDWICK et al., 2011). Enquanto o degradossomo de *E. coli* contém a enzima glicolítica enolase, o degradossomo de *C. crescentus* tem a enzima do ciclo dos ácidos tricarboxílicos aconitase. A presença de aconitase no degradossomo de *C. crescentus* foi um descobrimento inesperado (CONSTABLE et al., 1992; HARDWICK et al., 2011) (Figura 4). Em outro trabalho demonstraram que diferente do degradossomo de *E. coli*, no degradossomo de *C. crescentus* a RNA helicase RhlB interage diretamente com um segmento do domínio catalítico N-terminal da RNase E, e que o complexo inclui a exonuclease RNase D (VOSS et al., 2014) (Figura 4).

A cooperação estreita entre RNA helicases e enzimas envolvidas na degradação do RNA não é incomum na evolução, como por exemplo no complexo exossoma eucariótico. Foi demonstrado que o sítio de interação com a RNA helicase RhlB encontra-se dentro de S1 que é um domínio sensor-5' da RNase E; entretanto, um segmento similar não foi identificado na RNase E de *C. crescentus* quando foi feito o alinhamento de sequências de proteínas (HARDWICK et al., 2011) (Figura 4). A interação entre o domínio catalítico da RNase E e a helicase DEAD-box não tem sido mostrada em outros organismos. Como RhlB interage com o domínio sensor S1 da RNase E de *C. crescentus* (*CcNTD*₁₋₅₇₅), a helicase e o sítio ativo da RNase E podem estar próximos dentro do complexo, indicando que o substrato RNA estruturado é desenovelado por RhlB e passa diretamente ao sítio ativo da RNase E (HARDWICK; LUISI, 2013; VOSS et al., 2014) (Figura 4). As diferenças e similaridades entre os degradossomos de *C. crescentus* e *E. coli* é um ponto culminante na força de evolução convergente no recrutamento da atividade RNA helicase à maquinaria do metabolismo de RNA (VOSS et al., 2014).

Figura 4 - Representação esquemática do degradossomo de RNA em *Caulobacter crescentus* em comparação com o degradossomo de *Escherichia coli*. (A) Degradossomo em *C. crescentus*. O domínio N-terminal da RNase E é mostrado com os sítios de ligação para a RNA helicase RhIB e o domínio de inserção S1. O domínio C-terminal é mostrado como uma linha ondulada fina azul, com os sítios de interação para aconitase, RNase D e PNPase. (B) Degradossomo de *E. coli*. São mostrados os domínios de ligação à membrana, RNA helicase RhIB, enolase e PNPase. Fonte: Voss et al 2014.

1.6 A participação das RNA helicases DEAD-box é importante na formação de biofilme

A formação de biofilme é um comportamento cooperativo em grupo que envolve a população bacteriana vivendo encerrada em uma matriz extracelular produzida por elas mesmas (SOLANO et al., 2014). Na bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus* a inserção do transposon mini-Mu no gene que codifica a RNA helicase DEAD-box CshA produz uma redução na formação de biofilme a 37°C (OUN et al., 2013). Isto ocorre devido a um aumento na estabilidade do RNA mensageiro de *agrBDCA*, induzindo a síntese do RNAIII regulatório, e produzindo uma diminuição na formação de biofilme. Entretanto na presença da RNA helicase CshA o degradossomo de RNA pode degradar uma boa parte dos mRNAs *agrBDCA*, levando a que o sistema de *quorum sensing* trabalhe corretamente e somente poucas quantidades de RNAIII sejam produzidas, levando a uma formação normal de biofilme (OUN et al., 2013). Análises de expressão gênica neste mutante mostrou que outros genes tiveram expressão alterada, mas em pequeno número (BERNSTEIN et al., 2004; GIRAUD et al., 2015).

Em *C. crescentus* foi demonstrado que a estrutura mais importante para a adesão a várias superfícies é a adesina encontrada na ponta do talo (BODENMILLER et al., 2004; COLE et al., 2003; ENTCHIEVA-DIMITROV; SPORMANN, 2004; SMITH et al., 2003). Através de um ensaio de fixação estática, foi demonstrado que a adesão é dependente do ciclo celular (BODENMILLER, et al., 2004; ENTCHIEVA-DIMITROV; SPORMANN, 2004;). As células de *C. crescentus* formam dois diferentes tipos fundamentais de biofilmes: um biofilme em monocapa e um biofilme contendo estruturas em forma de cogumelo densamente empacotadas. Nestas condições de biofilme a substância adesiva é a estrutura mais importante para a adesão. Também os pili tipo IV foram fundamentais para a construção e manutenção da estrutura em forma de cogumelo no biofilme (ENTCHIEVA-DIMITROV; SPORMANN, 2004). Um componente importante do adesivo é o polissacarídeo contendo N-acetilglucosamina (BODENMILLER et al., 2004; MERKER; SMIT, 1988;). Não se conhece o efeito das RNA helicases sobre este processo em *C. crescentus*.

1.7 As RNA helicases DEAD-box em *Caulobacter crescentus*

O genoma de *C. crescentus* codifica 3 helicases da família DEAD-box (CC0835, CC1478 e CC1847) e uma helicase da família DEAH (CC2040), além de outras helicases de ácidos nucleicos. Como já descrito anteriormente, a RNA helicase codificada por CC1847 (RhIB) teve sua função melhor caracterizada, e é a principal enzima participando do degradossomo de RNA (HARDWICK et al., 2011).

A fim de identificar os genes importantes para a resistência notável de *C. crescentus* ao congelamento, foi feita uma busca em uma biblioteca de transposição contendo 5700 clones por mutantes sensíveis ao congelamento a -80 °C. Dois dos mutantes (12-9E e 30-10H) mostraram

uma redução severa nos índices de sobrevivência, e estavam interrompidos nos genes que codificava uma DNA helicase da família AddA (CC3538) e uma RNA helicase da família DEAD/DEAH (CC0835) (MAZZON et al., 2008). Em *C. crescentus* a RNA helicase RhIE, codificada por CC0835, foi proposta como sendo uma enzima importante para o *fitness* celular e sua expressão é induzida quando a temperatura diminui de 30°C a 15°C (AGUIRRE et al., 2017; CHRISTEN et al., 2011). O sítio de início da transcrição de *rhIE* foi predito a 186 pb a montante do códon inicial (MCGRATH et al., 2007). Foi determinado que a máxima expressão de *rhIE* é dependente de sua longa região 5'UTR e RhIE é regulada por mecanismos pós-transcricionais (AGUIRRE et al., 2017). Os resultados indicam que RhIE poderia regular seus próprios níveis de mRNA por estabilização mediada pela região 5'UTR e/ou por aumento da tradução (AGUIRRE et al., 2017).

Resultados utilizando Western *blotting* permitiram demonstrar que a proteína RhIE acumula em baixa temperatura e sua concentração não variou quando foi analisada por 48 horas durante a fase estacionária e nas diferentes fases do ciclo celular (VICENTE, 2017). A análise transcriptômica de *C. crescentus* NA1000 submetida ao estresse frio identificou que o gene CC0835 foi induzido, assim como os outros genes codificando RNA helicases DEAD-box CC1478 e CC1847. Foram identificados possíveis mRNAs que se ligaram a RhIE pela técnica HITS-CLIP, resultado importante para ter um conhecimento melhor da função desta enzima na regulação da estabilidade dos mRNAs (VICENTE, 2017).

Em trabalho anterior, foi mostrado que o gene CC2040 é regulado por LexA e induzido na resposta SOS (ROCHA et al., 2008), sugerindo que seu produto tenha papel na resposta a danos no DNA. A análise funcional de alguns genes regulados por a resposta SOS em *C. crescentus* mostrou que a helicase CC2040 tem uma função importante colaborando com a via de reparo por excisão de nucleotídeos (NER), no reparo de lesões induzidas ao DNA por agentes químicos como H₂O₂. Além disso, também foi mostrada a participação desta enzima no reparo de lesões induzidas quando a bactéria é submetida ao agente mitomicina C (MMC) (LOPES, 2014). Condizente com esta função, CC2040 é co-transcrito com o gene CC2041, que codifica uma metalofosfoesterase associada à DNA ligase, com possível papel no reparo de DNA (SCHRADER et al., 2014).

Recentemente, demonstramos que em *C. crescentus* a RNA helicase RhIE (codificada por CC0835) está associada ao degradossomo de RNA em baixa temperatura, conjuntamente com várias outras proteínas, como a RNA helicase DEAD-box CC1478, o terminador da transcrição Rho e a proteína ribossomal S1, os quais podem ter papéis acessórios na degradação do RNA em baixa temperatura (AGUIRRE et al., 2017). Os resultados mostraram que RhIE está associada com o degradossomo de RNA, não somente a 15 °C, mas também a 30 °C. Entretanto, a proteína RhIB não é substituída pela presença de RhIE, sugerindo que RhIE pode-se ligar à RNase E em sítio

diferente de RhIB, ou que sua interação seja mediada indiretamente por outra proteína. Não obstante, a ligação de RhIE não é dependente da presença de RhIB (AGUIRRE et al., 2017).

5 CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu analisar a importância das proteínas DEAD-box para o crescimento e adaptação de *C. crescentus* em estresse frio, o qual indica que as funções destas enzimas são muito importantes para uma bactéria de vida livre que interage em ambientes competitivos e de baixa disponibilidade de nutrientes. Todos os resultados permitiram a obtenção das seguintes conclusões:

As porcentagens de identidade entre as RNA helicases de *C. crescentus* e *E. coli*, permitiram determinar que as enzimas CC0835 e CC1847 são homólogas da RNA helicase RhIE de *E. coli*. Além disso a RNA helicase C1478 mostrou homologia com DeaD/CsdA respectivamente. No entanto os alinhamentos, parecem indicar que a enzima CC2040 é importante no reparo de lesões induzidas no DNA por alguns agentes químicos.

Na temperatura ótima de crescimento 30°C só o mutante CC0835::miniTn5, apresentou uma diminuição no índice de crescimento. No entanto no estresse frio 15°C os mutantes CC0835::miniTn5, Δ CC1478 e Δ CC1847, mostraram uma redução importante na taxa de crescimento, resultado que indica as funções cruciais que tem estas três enzimas na adaptação de *C. crescentus* nestas condições de estresse.

Os duplos mutantes Δ 1478/0835::miniTn5 e Δ 1847/0835::miniTn5, mostraram um fenótipo de diminuição de crescimento severo o qual foi mais acentuado no mutante Δ 1847/0835::miniTn5, não só na temperatura ótima 30 °C, mais também em estresse frio 15 °C, já que como foi demonstrado no trabalho de Aguirre et al. (2017) a RNA helicase RhIE (CC0835) faz parte do degradossomo a 15°C e 30 °C, e a RNA helicase RhIB (CC1847) faz parte também do degradossomo RNA (HARDWICK et al., 2011), além disso foi demonstrado neste trabalho que ambas RNA helicases participam na biogênese do ribossomo. Porém o mutante duplo Δ 2040/0835::miniTn5 apresentou uma redução no crescimento nas temperaturas de 30°C e 15°C a

diferença do mutante simples $\Delta CC2040$ que mostrou uma taxa de crescimento igual com a cepa parental NA1000 quando cresceu em ambas as temperaturas.

A deleção no gene da RNA helicase CC1847 que faz parte do degradossomo e que produz deficiência no crescimento de *C. crescentus* no estresse frio (15 °C), foi complementada por uma nova cópia do gene CC0835 clonada em *trans* no vetor pBV, de maneira similar a superexpressão do gene CC1478 também conseguiu complementar o defeito no crescimento em baixa temperatura do mutante $\Delta CC1847$; estes resultados indicam que existe superposição funcional entre estas três enzimas. Interessantemente o plasmídeo pBV carregando uma cópia do gene CC1847 clonada em *trans* não complementou a deficiência no crescimento em estresse frio, 15°C do mutante CC0835::miniTn5, da mesma maneira quando o gene CC1478 foi superexpresso a mutação no gene CC0835 não foi complementada. Estes resultados sugerem que a RNA helicase CC0835, pode substituir as funções de CC1847 e CC1478 em baixa temperatura. No entanto o papel de CC0835 para o crescimento em baixa temperatura não pode ser executado por as RNA helicases CC1847 ou CC1478.

A superexpressão dos genes das RNA helicases RhIE (CC0835), RhIB (CC1847) e CC1478 aumentou significativamente o índice de crescimento na linhagem parental NA1000 submetida ao estresse frio (15 °C), e na temperatura ótima de crescimento (30 °C).

O mutante da RNA helicases RhIE (CC0835), tem deficiência na formação de biofilme aproximadamente em um 20% quando comparado com a linhagem selvagem CB15; no entanto quando a mutação no gene rhIE foi complementada por uma nova cópia do gene CC0835 clonada em *trans* no vetor pBV, a formação de biofilme foi restabelecida indicando a participação desta enzima neste processo.

A expressão relativa das RNA helicases em *C. crescentus* NA1000 submetida a estresse frio, mostrou a indução das RNA helicases RhIE (CC0835), RhIB (CC1847) e CC1478; resultado que indica a participação destas três enzimas na adaptação da bactéria a uma diminuição na temperatura ótima de crescimento. Em contraste com o baixo índice de expressão do gene que codifica a enzima CC2040, demonstrando que esta proteína não participa na resposta da bactéria a mudanças na temperatura de crescimento.

Os perfis ribossomais mostraram que as RNA helicases RhIE (CC0835), RhIB (CC1847) e CC1478 participam na biogênese do ribossomo nas temperaturas de 30°C e 15 °C. Em contraste a helicase CC2040 mostrou um perfil ribossomal igual com NA1000 nas duas temperaturas. Este resultado indica que esta proteína pode estar participando em outros processos celulares diferentes com a biogênese do ribossomo em *C. crescentus*.

REFERÊNCIAS*

AGUIRRE, A.A.; VICENTE, A.A.; HARDWICK, S.W.; ALVELOS, D.M.; MAZZON, R.R.; LUISI, B.F.; MARQUES, M.V. Association of the cold-shock DEAD-box RNA helicase RhIE to the RNA degradosome in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology.**, v.1, p. JB.00135-17, 2017.

AIT-BARA, S.; CARPOUSIS, A.J. Characterization of the RNA degradosome of *Pseudoalteromonas haloplanktis*: conservation of the RNase E-RhIB interaction in the γ -proteobacteria. **Journal of Bacteriology.**, v. 192, p. 5413-5423, 2010.

ASH, K.; BROWN, T.; WATFORD, T.; SCOTT, L. E.; STEPHENS, C.; ELY, B. A comparison of the *Caulobacter* NA1000 and K31 genomes reveals extensive genome rearrangements and differences in metabolic potential. **Open Biology.**, v. 4, p. 1-9, 2014.

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. **Journal of Bacteriology.**, v. 189, p. 5808-5815, 2007.

BAE, W.; XIA, B.; INOUE, M.; SEVERINOV, K. *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America.**, v. 97, p. 7784-7789, 2000.

*De acordo com:

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

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. **Archives of Microbiology**., v. 192, p. 747-758, 2010.

BALLUT, L.; MARCHADIER, B.; BAGUET, A.; TOMASETTO, C.; SÉRAPHIN, B.; LE HIR, H. The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of elf4AIII ATPase activity. **Nature Structural and Molecular Biology**., v. 12, p.861-869, 2005.

BANDYRA, K.J.; BOUVIER, M.; CARPOUSIS, A.J.; LUISI, B.F. The social fabric of the RNA degradosome. **Biochimica et Biophysica Acta**., v. 1829, p. 514-522, 2013.

BÄRECLEV, C.; VAITKEVICIUS, K.; NETTERLING, S.; JOHANSSON, J. DExD-box RNA helicases in *Listeria monocytogenes* are important for growth, ribosomal maturation, rRNA processing and virulence factor expression. **RNA Biology**., v. 11, n. 11, p. 1457-1466, 2014.

BECKERING, C.I.; STEIL, L.; WEBER, M.H.; VÖLKER, U.; MARAHIEL, M.A. Genomewide transcriptional analysis of the cold shock response in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**., v. 184, p. 6395-6402, 2002.

BEREKSI, N.; GAVINI, F.; BÉNÉZECH, T.; FAILLE, C. Growth morphology and surface properties of *Listeria monocytogenes* Scott A and LO28 under saline and acid environment. **Journal of Applied Microbiology**., v. 92, p. 556-565, 2002.

BERGHOLZ, T. M.; VANAJA, S. K.; WHITTAM, T. S. Gene expression induced in *Escherichia coli* O157:H7 upon exposure to model apple juice. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 3542-3553, 2009.

BERNSTEIN, J. A.; LIN, P.H.; COHEN, S. N.; LIN-CHAO, S. Global analysis of *Escherichia coli* RNA degradosome function using DNA microarrays. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 2758-2763, 2004.

BILGE, S.S.; APOSTOL, J.M.; Jr ALDAPE, M.A. mRNA processing independent of RNaseIII and RNase E in the expression of the F1845 fimbrial adhesion of *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, p. 1455-1459, 1993.

BODENMILLER, D.; TOH, E.; BRUN, Y.V. Development of Surface Adhesion in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1438-1447, 2004.

BOSHOF, H. I. M.; REED, M. B.; BARRY III, C. E; MIZRAHI, V. DnaE2 polymerase contributes to in vivo survival and the emergence of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Cell**, v. 113, p. 183-193, 2003.

BRANDI, A.; PIETRONI, P.; GUALERZI, C. O.; PON, C. L. Post-transcriptional regulation of CspA expression in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v.19, p. 231-240, 1996.

BUTLAND, G.; KROGAN, N.G.; XU, J.; YANG, W.H.; AOKI, H.; LI, J.S., et al. Investigating the *in vivo* activity of the DeaD protein using protein-protein interactions and the translational activity of structured chloramphenicol acetyltransferase mRNAs. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 100, p. 642-652, 2007.

BUTLAND,G.; PEREGRIN-ALVAREZ, J.M.; LI, J.; YANG, W.; YANG, X.; CANADIEN, V.; STAROSTINE, A.; RICHARDS, D.; BEATTIE, B.; KROGAN, N.; DAVEY, M.; PARKINSON, J.; GREENBLATT, J.; EMILI, A. Interaction network containing conserved and essential protein complexes in *Escherichia coli*. **Nature.**, v. 433, p. 531-537, 2005.

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

CHAMOT, D.; OWTTRIM, G. W. Regulation of cold shock-induced RNA helicase gene expression in the cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120. **Journal of Bacteriology.**, v. 182, p. 1251-1256, 2000.

CHANDRAN, V.; POLJAK, I.; VANZO, N.F.; et al. Recognition and cooperation between the ATP-dependent RNA helicase RhlB and ribonuclease RNase E. **Journal of Molecular Biology.**, v. 367. p. 113-132, 2007.

CHAROLLAIS, J.; DREYFUS, M.; IOST, I. CsdA, a cold-shock RNA helicase from *Escherichia coli*, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit. **Nucleic Acids Research.**, v.32, n. 1, p. 2751-2759, 2004.

CHAROLLAIS, J.; PFLIEGER, D.; VINH, J.; DREYFUS, M.; IOST, I. The DEAD-box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology.**, v. 48, n. 1, p. 1253-1265, 2003.

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

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

COBURN, G.A.; MIAO, X.; BRIANT, D.J.; MACKIE, G.A. Reconstitution of a minimal RNA degradosome demonstrates functional coordination between a 3' exonuclease and a DEAD-box RNA helicase. **Genes & Development.**, v. 13, p. 2594-2603, 1999.

COLE, J.L.; HARDY, G.G.; BODENMILLER, D.; TOH, E.; HINZ, A.; BRUN, Y.V. The HfaB and HfaD adhesion proteins of *Caulobacter crescentus* are localized in the stalk. **Molecular Microbiology.**, v. 49, p. 1671-1683, 2003.

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

CONSTABLE, A.; QUICK, S.; GRAY, N.K.; HENTZE, M.W. Modulation of the RNA-binding activity of a regulatory protein by iron in vitro: switching between enzymatic and genetic function ?. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.**, v.89, p. 4554-4558, 1992.

CORDIN, O.; BANROQUES, J.; TANNER, N. K.; LINDER, P. The DEAD-box protein family of RNA helicases. **Gene.**, v. 367, p. 17-37, 2006.

DAVIS-DUSENBERY, B.N.; HATA, A. Mechanism of control of microRNA biogenesis. **The Journal of Biochemistry.**, v. 148, p. 381-392, 2010.

DIGES, C.M.; UHLENBECK, O.C. *Escherichia coli* DbpA is an RNA helicase that requires hairpin 92 of 23S rRNA. **The EMBO Journal.**, v.20. p. 5503-5512, 2001.

DRESSAIRE, C.; PICARD, F.; REDON, E.; LOUBIÈRE, P.; QUEINNEC, I.; GIRBAL, L.; COCAIGN-BOUSQUET, M. Role of mRNA stability during bacterial adaptation. **PloS | One.**, v. 8, p. 1-10, 2013.

DURÁN-FIGUEROA, N.V.; PIÑA-ESCOBEDO, A.; SCHROEDER, I.; SIMMONS, R.W.; GARCÍA-MENA, J. Polynucleotide phosphorylase interacts with ribonuclease E through a $\beta\beta\alpha\beta\beta\alpha$ domain. **Biochimie.**, v.88, p.725-735, 2006.

ELLES, L.M.; UHLENBECK, O.C. Mutation of the arginine finger in the active site of *Escherichia coli* DbpA abolish ATPase and helicase activity and confers a dominant slow growth phenotype. **Nucleic Acids Research.**, v. 36, p. 41-50, 2008.

ELY, B.; JOHNSON, R. C. Generalized transduction in *Caulobacter crescentus*. **Genetics.**, v. 87, p. 391-399, 1977.

ENDO, H.; MARUYAMA, K.; MASUHIRO, Y.; KOBAYASHI, Y.; GOTO, M.; TAI, H.; et al. Purification and identification of p68 RNA helicase acting as a transcriptional coactivator specific for the activation function 1 of human estrogen receptor alpha. **Molecular and Cellular Biology.**, v. 19. p. 5363-5372, 1999.

ENTCHEVA-DIMITROV, P.; SPORMANN, A.M. Dynamics and Control of Biofilms of the Oligotrophic Bacterium *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology.**, v. 186, n. 24, p. 8254-8266, 2004.

FAIRMAN-WILLIAMS, M.E.; GUENTHER, U.P.; JANKOWSKY, E. SF1 and SF2 helicases: family matters. **Current Opinion in Structural Biology.**, v. 20, p. 313-324, 2010.

FULLER-PACE, F.V.; NICOL, S.M.; REID, A.D.; LANE, D.P. DbpA: a DEAD box protein specifically activated by 23S rRNA. **The EMBO Journal.**, v. 12, p.3619-3626, 1993.

GIRAUD, C.; HAUSMANN, S.; LEMEILLE, S.; PRADOS, J.; REDDER, P.; LINDER, P. The C-terminal region of the RNA helicase CshA is required for the interaction with the degradosome and turnover of bulk RNA in the opportunistic pathogen *Staphylococcus aureus*. **RNA Biology.**, v. 12, p. 658-674, 2015.

GORBALENYA, A.E.; KOONIN, E.V. Helicases: aminoacid comparisons and structure-function relationships. **Current Opinion in Structural Biology.**, v. 3, p. 419-429, 1993.

GORBALENYA, A.E.; KOONIN, E.V.; DONCHENKO, A.P.; BLINOV, V.M. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. **Nucleic Acids Research.**, v. 17, p. 4713-4730, 1989.

GOTTESMAN, S.; STORZ, G. Bacterial small RNA regulators: versatile roles and rapidly evolving variations. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.**, v. 3, p. 1-16, 2011.

GOTTIG, N.; GARAVAGLIA, B.S.; GAROFALO, C.G.; ZIMARO, T.; SGRO, G.G.; FICARRA, F.A.; DUNGER, G. Mechanisms of infection used by *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* in citrus canker disease. **Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology.**, p. 196-204, 2010.

GRANATO, L.M.; PICCHI, S.C.; ANDRADE, M DE O.; TAKITA, M.A.; DE SOUZA, A.A.; WAN, N.; MACHADO, M.A. The ATP-dependent RNA helicase HrpB plays an important role in motility and biofilm formation in *Xanthomonas citri* subsp. *Citri*. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 55, p. 2-14, 2016.

HARDIN, J. W.; HU, Y. X.; McKAY, D. V. Structure of the RNA binding domain of a DEAD-box helicase bound to its ribosomal RNA target reveals a novel mode of recognition by an RNA recognition motif. **Journal of Molecular Biology**, v. 402, p. 412-427, 2010.

HARDWICK, S.W.; CHAN,V.S.Y.; BROADHURST, R.W.; LUISI, B.F. An RNA degradosome assembly in *Caulobacter crescentus*. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 4, p. 1449-1459, 2011.

HARDWICK, S.W.; LUISI, B.F. Rarely at rest: RNA helicases and their busy contributions to RNA degradation, regulation and quality control. **RNA Biology**, v. 10, p. 56-70, 2013.

HOE, C.H.; RAABE, C.A.; ROZHDESTVENSKY, T.S.; TANG, T.H. Bacterial sRNAs: Regulation in stress. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, p. 217-229, 2013.

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

IOST, I.; BIZEBARD, T.; DREYFUS, M. Functions of DEAD-box proteins in bacteria: Current knowledge and pending questions. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1829, p. 866-877, 2013.

IOST, I.; DREYFUS, M. DEAD-box RNA helicases in *Escherichia coli*. **Nucleic Acids Research.**, v. 34, p. 4189-4197, 2006.

IVANCIC, T.; JAMNIK, P.; STOPAR, D. Cold shock CspA and CspB protein production during periodic temperature cycling in *Escherichia coli*. **BMC Research Notes.**, v. 6, p. 1-9, 2013.

JÄGER, S.; FUHRMANN, O.; HECK, C.; HEBERMEHL, M.; SCHILTZ, E.; RAUHUT, R.; KLUG, G. An mRNA degrading complex in *Rhodobacter capsulatus*. **Nucleic Acids Research.**, v. 29, p. 4581-4588, 2001.

JAGESSAR, K.L.; JAIN, C. Functional and molecular analysis of *Escherichia coli* strains lacking multiple DEAD-box helicases. **RNA.**, v. 16, p. 1386-1392, 2010.

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

JAIN, S.; PRAGAI, B.; APIRION, D. A possible complex containing RNA processing enzymes. **Biochemical and Biophysical Research Communications.**, v. 106, p. 768-778, 1982.

JANKOWSKY, E. RNA helicases at work:binding and rearranging. **Trends in Biochemical Sciences.**, v. 36, p. 19-29, 2011.

JANKOWSKY, E.; FAIRMAN, M.E. RNA helicases -one fold for many functions. **Current Opinion in Structural Biology.**, v. 17, p. 316-324, 2007.

JANKOWSKY, E.; GROSS, C. H.; SHUMAN, S.; PYLE, A. M. Active disruption of an RNA-proteins interaction by a DExH/D RNA helicase. **Science.**, v. 291, p. 121-125, 2001.

JARMOSKAITE, I.; RUSSEL, R. DEAD-box proteins as RNA helicases and chaperones. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA.**, v. 2, p. 135-152, 2011.

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, p. 196-202, 1997.

JONES, P.G.; KRAH, R.; TAFURI, S. R.; WOLFFE, A. P. DNA gyrase, CS7.4, and the cold shock response in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology.**, v. 18, p. 5798-5802, 1992.

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*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.**, v. 93. P. 76-80, 1996.

JONES, TH.; VAIL, K.M.; McMULLEN, L.M. Filament formation by foodborne bacteria under sublethal stress. **International Journal of Food Microbiology.**, v. 165, p. 97-110, 2013.

KABERDIN, V.R.; BLÄSI, U. Bacterial helicases in post-transcriptional control, Review, **Biochimica et Biophysica Acta.**, v. 1829, p. 878-883, 2013.

KABERDIN, V.R.; LIN-CHAO, S. Unraveling new roles for minor components of the *E. coli* RNA degradosome. **RNA Biology.**, v. 6, p. 402-405, 2009.

KHEMICI, V.; LINDER, P. RNA helicases in bacteria. **Current Opinion in Microbiology.**, v. 30. p. 58-66, 2016.

KHEMICI, V.; TOESCA, I.; PLJAK, L.; VANZO, N.F.; and 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. **Molecular Microbiology.**, v. 54, p. 1422-1430, 2004.

KIEBOOM, J.; KUSUMANINGRUM, H.D.; TEMPELAARS, M.H.; HAZELEGER, W.C.; ABEE, T.; BEUMER, R.R. Survival elongation, and elevated tolerance of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis at reduced water activity journal. **Journal of Food Protection.**, v. 69, p. 2681-2686, 2006.

KIRKPATRICK, C. L.; VIOLLIER, P. H. Decoding Caulobacter development. **FEMS Microbiology Reviews.**, v. 36, p. 193-205, 2012.

KOO, J.T.; CHOE, J.; MOSELEY, S.L. HrpA, a DEAD-box RNA helicase, is involved in mRNA processing of a fimbrial operon in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology.**, v. 52, p. 1813-1826, 2004.

KOSSEN, K.; KARGINOV, F. V.; UHLENBECK, O. C. The carboxy-terminal domain of the DEXDH protein YxiN is sufficient to confer specificity for 23 S rRNA. **Journal of Molecular Biology.**, v. 324, p. 625-636, 2002.

KUJAT, S. L.; OWTTRIM, G. W. Redox-regulated RNA helicase expression. **Plant Physiology.**, v. 124, p. 703-714, 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. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.**, v. 88, p. 10907-10911, 1991.

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, p. 5603-5613, 2004.

LAUB, M.T.; SHAPIRO, L.; McADAMS, H.H. Systems biology of *Caulobacter*. **Annual Review of Genetics.**, v. 41, p. 429-441, 2007.

LEHNIK-HABRINK, M.; REMPETERS, L.; KOVÁCS, A.; WREDE, C.; BAIERLEIN, C.; KREBBER, H.; KUIPERS, O.; STÜLKE, J. DEAD-box RNA Helicases in *Bacillus subtilis* Have Multiple Functions and Act Independently from Each Other. **Journal of Bacteriology.**, v. 195, n. 3, p. 534-544, 2013.

LINDER, P. Dead-box proteins: a family affair-active and passive players in RNP-remodeling. **Nucleic Acids Research.**, v. 34, p. 4168-4180, 2006.

LINDER, P.; and JANKOWSKY, E. From unwinding to clamping-the DEAD box RNA helicase family. **Molecular and Cellular Biology.**, v. 12, p. 505-516, 2011.

LIU, F.; PUTNAM, A.; JANKOWSKY, E. ATP hydrolysis is required for DEAD-box protein recycling but not for duplex unwinding. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.**, v.105, p. 20209-20214, 2008.

LOPES, C.O. **Papel da resposta SOS no reparo de danos induzidos por mitomicina C e na resposta aos antibióticos Beta-Lactâmicos em *Caulobacter crescentus*.** 111 f.

Dissertação (mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

LÓPEZ-RAMÍREZ, V.; ALCARAZ, L.D.; MORENO-HAGELSIEB, G.; OLMEDO-ÁLVAREZ, G. Phylogenetic distribution and evolutionary history of bacterial DEAD-box proteins. **Journal of Molecular Evolution.**, v. 72, p. 413-431, 2011.

MACKIE, G. A. Ribonuclease E is a 5'-end-dependent endonuclease. **Nature.**, v. 395, p. 720-724, 1998.

MALFAVÓN, L.D.; ISLAS, L.D.; LUISI, B.F.; VILLEGAS, R.G. The assembly and distribution *in vivo* of the *Escherichia coli* RNA degradosome. **Biochimie.**, v. 95, p. 2034-2041, 2013.

MARGOLIN, M. Themes and variations in prokaryotic cell division. **FEMS Microbiology Reviews.**, v. 24, p. 531-548, 2000.

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*. **Journal of Bacteriology.**, v. 192, p. 3678-3688, 2010.

MARTIN, R.; STRAUB, A.U.; DOEBELE, C.; BOHNSACK, M.T. DExD/H-box RNA helicases in ribosome biogenesis. **RNA Biology.**, v. 10. p. 4-18, 2013.

MAZZON, R.R.; LANG, E.A.; BRAZ, VS.; MARQUES, M.V. Characterization of *Caulobacter crescentus* response to low temperature and identification of genes involved in freezing resistance. **FEMS Microbiology Letters.**, v. 288, p. 178-185, 2008.

MAZZON, R.R.; LANG, E.A.; SILVA, C.A.; MARQUES, M.V. Cold shock genes *cspA* and *cspB* from *Caulobacter crescentus* are posttranscriptionally regulated and important for cold adaptation. **Journal of Bacteriology.**, v. 194, p. 6507-6517, 2012.

MCGRATH, P. T.; LEE, H.; ZHANG, L.; INIESTA, A. A.; 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. **Nature Biotechnology.**, v. 25, p. 584-592, 2007.

MERKER, R.I.; SMIT, J. Characterization of the adhesive holdfast of marine and freshwater caulobacters. **Applied and Environmental Microbiology.**, v. 54, p. 2078-2085, 1988.

MICZAK, A.; KABERDIN, V.R.; WEI, C.I.; LIN-CHAO, S. Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.**, v. 93, p. 3865-3869, 1996.

MIYAKOSHI, M.; CHAO, Y.; VOGEL, J. Regulatory small RNAs from the 3' regions of bacterial mRNAs. **Current Opinion in Microbiology.**, v. 24, p. 132-139, 2015.

MOHR, S.; STRYKER, J. M.; LAMBOWITZ, A. M. A DEAD-box protein functions as an ATP-dependent RNA chaperone in group I intron splicing. **Cell.**, v. 109, p. 769-779, 2002.

MONTPETIT, B.; THOMSEN, N.D.; HELMKE, K.J.; et al. A conserved mechanism of DEAD-box ATPase activation by nucleoporins and IP6 in mRNA export. **Nature.**, v. 472, p. 238-242, 2011.

MORITA, M.; KANEMORI, M.; YANAGI, H.; YURA, T. Heat-induced synthesis of sigma 32 in *Escherichia coli*: structural and functional dissection of rpoH mRNA secondary structure. **Journal of Bacteriology.**, v. 181, p.401-410, 1999.

MORITA, MT.; TANAKA, Y.; KODAMA, T.S.; KYOGOKU, Y.; YANAGI, H.; YURA, T. Translational induction of heat shock transcription factor sigma 32: evidence for a built-in RNA thermosensor. **Genes & Development**, v. 13, p. 655-665, 1999.

MULDER, A. M.; YOSHIOKA, C.; BECK, A. H. Visualizing ribosome biogenesis: parallel assembly pathways for the 30S subunit. **Science**, v. 330, p. 673-677, 2010.

NETTERLING, S.; BÄRECLEV, C.; VAITKEVICIUS, K.; JOHANSSON, J. RNA helicase important for *Listeria monocytogenes* hemolytic activity and virulence factor expression. **Infection and Immunity**, v. 84, p. 67-76, 2016.

NETTERLING, S.; VAITKEVICIUS, K.; NORD, S.; JOHANSSON, J. A *Listeria monocytogenes* RNA helicase essential for growth and ribosomal maturation at low temperatures uses its C terminus for appropriate interaction with the ribosome. **Journal of Bacteriology**, v. 194, p. 4377-4385, 2012.

NEWMAN, J.A.; HEWITT, L.; RODRIGUES, C.; SOLOVYOVA, A.S.; HARWOOD, C.R.; LEWIS, R.J. Dissection of the network of interactions that links RNA processing with glycolysis in the *Bacillus subtilis* degradosome. **Journal of Molecular Biology**, v. 416, p. 121-136, 2012.

NICOL, S.M.; FULLER-PACE, P.V. The “DEAD box” protein DbpA interacts specifically with the peptidyltransferase center in 23S rRNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, p. 11681-11685, 1995.

NISHI, K.; MOREL-DEVILLE, F.; HERSHEY, J.W.B.; LEIGHTON, T.; SCHNIER, J. An eIF-4A-like protein is a suppressor of an *Escherichia coli* mutant defective in 50S ribosomal subunit assembly. **Nature**, v. 336, p. 496-498 e correção, **Nature**, 340 246, 1988.

ORDONEZ, H.; and SHUMAN, S. *Mycobacterium smegmatis* Lhr Is a DNA-dependente ATP-ase and a 3´ -to-5´ DNA Translocase and Helicase That Prefers to Unwind 3´ -Tailed RNA:DNA Hybrids. **The Journal of Biological Chemistry.**, v. 288, p. 14125-14134, 2013.

OUN, S.; REDDER, P.; DIDIER, J-P.; FRANÇOIS, P.; CORVAGLIA, A-F.; BUTTAZZONI, E.; GIRAUD, C.; GIRARD, M.; SCHRENZEL, J.; LINDER, P. The CshA DEAD-box RNA helicase is important for quorum sensing control in *Staphylococcus aureus*. **RNA Biology.**, v. 10, n. 1, p. 157-165, 2013.

OWTTRIM, G. **RNA helicases**. Diverse roles in prokaryotic response to abiotic stress. **RNA Biology.**, v. 10, n. 1, p. 96-110, 2013.

OWTTRIM, G.W. RNA helicases and abiotic stress. **Nucleid Acids Research.**, v. 34, p. 3220-3230, 2006.

PANDIANI, F.; BRILLARD, J.; BORNARD, I.; MICHAUD, C.; CHAMOT, S.; NGUYEN-THE, C.; BROUSSOLLE, V. Differential involvement of the five RNA helicases in adaptation of *Bacillus cereus* ATCC 14579 to low growth temperatures. **Applied and Environmental Microbiology.**, v. 76, p. 6692-6697, 2010.

PANDIANI, F.; CHAMOT, S.; BRILLARD, J.; CARLIN, F.; NGUYEN-THE, C.; BROUSSOLLE, V. Role of the five RNA Helicases in the Adaptative Response of *Bacillus cereus* ATCC 14579 Cells to Temperature, pH, and Oxidative Stresses. **Applied and Environmental Microbiology.**, v. 77, n. 16, p. 5604-5609, 2011.

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

PENG, Y.; SOPER, T.; WOODSON, S.A. Positional Effects of AAN Motifs in *rpoS* Regulation by sRNAs and Hfq. **Journal of Molecular Biology.**, v.426, p. 275-285, 2014.

PHADTARE, S AND SEVERINOV, K. RNA remodeling and gene regulation by cold shock proteins. **RNA Biology.**, v. 7, p. 788-795, 2010.

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*. **Journal of Bacteriology.**, v.186, p. 7007-7014, 2004.

PHADTARE, S.; INOUE, M. Sequence-selective interactions with RNA by CspB, CspC and CspE, members of the CspA family of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology.**, v.33, p. 1004-1014, 1999.

PIETRAS, Z.; HARDWICH, S.W.; SWIEZEWSKI, S.; et al. Potential regulatory interactions of *Escherichia coli* RraA protein with DEAD-box helicases. **Journal of Biological Chemistry.**, v. 288, p. 31919-31929, 2013.

PRAKASH, J. S.; KRISHNA, P. S.; SIRISHA, K.; KANESAKI, Y.; SUZUKI, I.; SHIVAJJI, S.; MURATA, A. An RNA helicase, CrhR regulates the low-temperature-inducible expression of heat-shock genes groEs, groEL 1 and groEL 2 in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **Microbiology.**, v. 156, p 442-451, 2010.

PROUX, F.; DREYFUS, M.; IOST, I. Identification of the sites of action of SrmB, a DEAD-box RNA helicase involved in *Escherichia coli* ribosome assembly. **Molecular Microbiology**, v.82. p.300-311, 2011.

PRUD'HOMME-GÉNÉREUS, 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. **Molecular Microbiology**, v. 54, p. 1409-1421, 2004.

PURUSHARTH, R.I.; KLEIN, F.; SULTHANA, S.; JÄGER, S.; JAGANNADHAM, M.V.; EVGUENIEVA-HACKENBERG, E.; et al. Exoribonuclease R interacts with endoribonuclease E and an RNA helicase in the psychrotrophic bacterium *Pseudomonas syringae* Lz4W. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, 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, p. 169-172, 1996.

QUIÑONES-VALLES, C.; SÁNCHEZ-OSORIO, I.; MARTÍNEZ-ANTONIO, A. Dynamical modeling of the cell cycle and cell fate emergence in *Caulobacter crescentus*. **PloS ONE**, v. 9, p. 1-11, 2014.

RAND, L.; HINDS, J.; SPRINGER, B.; SANDER, P.; BUXTON, R. S.; DAVIS, E. O. The majority of inducible DNA repair genes in *Mycobacterium tuberculosis* are induced independently of RecA. **Molecular Microbiology**, v. 50, p. 1031-1042, 2003.

REDDER, P.; HAUSMANN, S.; KHEMICI, V.; YASREBI, H.; LINDER, P. Bacterial versatility requires DEAD-box RNA helicases. **FEMS Microbiology Reviews**, p. 1-21, 2015.

REDKO, Y.; AUBERT, S.; STACHOWICZ, A.; LENORMAND, P.; NAMANE, A.; DARFEUILLE, F.; THIBONNIER, M.; REUSE, H. D. A minimal bacterial RNase J-based degradosome is associated with translating ribosomes. **Nucleic Acids Research.**, v. 41, p. 288-301, 2013.

REPOILA, F.; MAJDALANI, N.; GOTTESMAN, S. Small non-coding RNAs, co-ordinators of adaptation processes in *Escherichia coli*: the RpoS paradigm. **Molecular Microbiology.**, v. 48, p. 855-861, 2003.

RESCH, A.; VECEREK, B.; PALAVRA, K.; BLASI, U. Requirement of the CsdA DEAD-box helicase for low temperature riboregulation of rpoS mRNA. **RNA Biology.**, v. 7, p. 796-802, 2010.

REUVEN, B.N.; KOONIN, E.V.; RUDD, K.E.; DEUTSCHER, M.P. The Gene for the longest Known *Escherichia coli* Protein Is a Member of Helicase Superfamily II. **Journal of Bacteriology.**, v. 177. p. 5393-5400, 1995.

RICCI, D. P.; MELFI, M. D.; LASKER, K.; DILL, D. L.; McADAMS, H. H.; SHAPIRO, L. Cell cycle progression in *Caulobacter* requires a nucleoid-associated protein with high AT sequence recognition. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.**, v. 113, p. 52-61, 2016.

ROCHA, R. P.; PAQUOLA, A. C. M.; MARQUES, M. V.; MENCK, C. F. M.; GALHARDO, R. S. Characterization of the SOS Regulon of *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology.**, v. 190, p. 1209-1218, 2008.

ROSANA, A.R.; CHAMOT, D.; OWTTRIM, G.W. Autoregulation of RNA helicase expression in response to temperature stress in *Synechocystis* sp. PCC 6803. **PLOS ONE**, v. 7, p. 1-10, 2012.

RÖSLER, O.G.; STTRAKA, A.; STAHL, H. Rearrangement of structured RNA via branch migration structures catalyzed by the highly related DEAD-box protein p68 and p72. **Nucleic Acids Research**, v. 29, p. 2088-2096, 2001.

ROUX, C.M.; DEMUTH, J.P.; DUNMAN, P.M. Characterization of components of the *Staphylococcus aureus* mRNA degradosome holoenzyme-like complex. **Journal of Bacteriology**, v. 193, p. 5520-5526, 2011.

SCHMID, S.R.; LINDER, P. D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. **Molecular Microbiology**, v. 6, p. 283-292. 1992.

SCHRADER, J. M.; ZHOU, B.; LI, G-W.; LASKER, K.; CHILDERS, W. S.; WILLIAMS, B.; LONG, T.; CROSSON, S.; MCADAMS, H. H.; WEISSMAN, J. S.; SHAPIRO, L. The coding and Noncoding Architecture of the *Caulobacter crescentus* Genome. **PLOS | Genetics**, v. 10, p. 1-16, 2014.

SELINGER, D.W.; SAXENA, R.M.; CHEUNG, K.J.; CHURCH, G.M.; ROSENOW, C. Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. **Genome Research**, v. 13, p. 216-223, 2003.

SHAJANI, Z.; SYKES, M.T.; WILLIAMSON, J.R. Assembly of Bacterial Ribosomes. **Annual Review in Biochemistry**, v. 80, p.501-526, 2011.

SHARPE ELLES, L.M.; SYKES, M.T.; WILLIAMSON, J.R.; UHLENBECK, O.C. A dominant negative mutant of the *E. coli* RNA helicase DbpA blocks assembly of the 50S ribosomal subunit. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. 6503-6514, 2009.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D. G.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; McWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. Fast,

scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology.**, v. 539, p. 1-6, 2011. ISSN: 1744-4292.

SINENSKY, M. Homeoviscous adaptation a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.**, v. 71, p. 522-525, 1974.

SINGLETON, M.R.; DILLINGHAM, M.S.; WIGLEY, D.B. Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. **Annual Review of Biochemistry.**, v. 76, p. 23-50, 2007.

SLEDJESKI, D.D.; WHITMAN, C.; ZHANG, A. Hfq is necessary for regulation by the untranslated RNA DsrA. **Journal of Bacteriology.**, v. 183, p. 1997-2005, 2001.

SLEDJESKI, D.D.; GUPTA, A.; GOTTESMAN, S. The small RNA, DsrA, is essential for the low temperature expression of RpoS during exponential growth in *Escherichia coli*. **The EMBO Journal.**, v. 15, p. 3993-4000, 1996.

SMITH, C.S.; HINZ, A.; BODENMILLER, D.; LARSON, D.E.; BRUN, Y.V. Identification of genes required for synthesis of the adhesive holdfast in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology.**, v. 185, p. 1432-1442, 2003.

SOLANO, C.; ECHEVERZ, M.; LASA, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. **Current Opinion in Microbiology.**, v. 18, p. 96-104, 2014.

SOPER, T.J.; WOODSON, S.A. The rpoS mRNA leader recruits Hfq to facilitate annealing with DsrA sRNA. **RNA.**, v. 14, p. 1907-1917, 2008.

SRIVASTAVA, D.; HARRIS, R.C.; WATERS, C.M. Integration of cyclic di-GMP and quorum sensing in the control of vpsT and aphA in *Vibrio cholerae*. **Journal of Bacteriology.**, v. 193, p. 6331-6341, 2011.

STORZ, G.; VOGEL, J.; WASSARMAN, K.M. Regulation by small RNAs in bacteria: expanding frontiers. **Molecular Cell.**, v. 43, p.880-891, 2011.

SYMMONS, M.F.; WILLIAM, M.G.; LUISI, B.F.; JONES, G.H.; CARPOUSIS, A.J. Running rings around RNA: a superfamily of phosphate-dependent RNases. **Trends in Biochemical Sciences.**, v. 27, p. 11-18, 2002.

TALKINGTON, M. W.; SIUZDAK, G.; WILLIAMSON, J. R. An assembly landscape for the 30S ribosomal subunit. **Nature.**, v. 438, p. 628-632, 2005.

TAMURA, M.; KERS, JA.; COHEN, SN. Second-site suppression of RNase E essentiality by mutation of the deaD RNA helicase in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology.**, v. 194, p. 1919-1926, 2012.

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, p. 1-16, 2007.

TOONE, W.M.; RUDD, K.E.; FRIESEN, J.D. deaD, a new *Escherichia coli* gene encoding a presumed ATP-dependent RNA helicase, can suppress a mutation in rpsB, the gene encoding ribosomal protein S2. **Journal of Bacteriology.**, v. 173, p. 3291-3302, 1991.

TRUBETSKOY, D.; PROUX, F.; ALLEMAND, F.; DREYFUS, M.; IOST, I. SrmB, a DEAD-box helicase involved in *Escherichia coli* ribosome assembly is specifically targeted to 23S rRNA *in vivo*. **Nucleic Acids Research.**, v. 37, p. 6540-6549, 2009.

TSU, C. A.; KOSSEN, K.; UHLENBECK, O. C. The *Escherichia coli* DEAD protein DbpA recognizes a small RNA hairpin in 23 S RNA. **RNA**, v. 7, p. 702-709, 2001.

VANZO, N.F.; LI, Y.S.; PY, B.; BLUM, E.; HIGGINS, C.F.; RAYNAL, L.C.; KRISCH, H.M.; CARPOUSIS, A.J. Ribonuclease E organizes the protein interactions in the *Escherichia coli* RNA degradosome. **Genes & Development**, v. 12, p. 2770-2781, 1998.

VICENTE, A.M. **Estudo da RNA helicase da família DEAD-box codificada pelo gene CC0835 em *Caulobacter crescentus***. 131 f. Dissertação (mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

VINNEMEIER, J.; HAGEMANN, M. Identification of salt-regulated genes in the genome of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. Strain PCC6803 by subtractive RNA hybridization. **Archives of Microbiology**, v. 172, p. 377-386. 1999.

VOSS, J.E.; LUISI, B.F.; HARDWICK, S.W. Molecular recognition of RhlB and RNase D in the *Caulobacter crescentus* RNA degradosome. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 21, p.13294-13305, 2014.

WINGROVE, J. A.; GOBER, J. W. The molecular basis of asymmetric cell division in *Caulobacter crescentus*. **Seminars in Developmental Biology**, v. 6, p. 325-333, 1995.

WOLDEMESKEL, S. A.; GOLEY, E. D. Shapeshifting to survive: Shape determination and regulation in *Caulobacter crescentus*. **Trends in Microbiology**, v. 25, p. 1-15, 2017.

YAMANAKA, K.; MITTA, M.; INOUE, M. Mutation analysis of the 5' Untranslated Region of the Cold Shock cspA mRNA of Escherichia coli. **Journal of Bacteriology.**, v.181, p. 6284-6291, 1999.

YANG, Q.; DEL CAMPO, M.; LAMBOWITZ, A.M.; JANKOWSKY, E. DEAD-box proteins unwind duplexes by local strand separation. **Molecular Cell.**, v. 28, p. 253-263, 2007.

YANG, Q.; JANKOWSKY, E. The DEAD-box protein Ded1 unwinds RNA duplexes by a mode distinct from translocating helicases. **Nature Structural & Molecular Biology.**, v. 13, p. 981-986, 2006.

ZHOU, BO.; SCHRADER, J. M.; KALOGERAKI, V. S.; ABELIUK, E.; DINH, C. B.; PHAM, J. Q.; CUI, Z. Z.; DILL, D. L.; McADAMS, H. H.; SHAPIRO, L. The global regulatory architecture of transcription during the *Caulobacter* cell cycle. **PLOS | Genetics.**, v. 11, p. 1-17, 2015.