

Juliana da Silva Santos

IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE  
TRANSCRIÇÃO E SINAIS CELULARES QUE  
REGULAM A EXPRESSÃO DO GENE *cspC* EM  
*Caulobacter crescentus*

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em Ciências  
(Microbiologia) da Universidade de São  
Paulo para obtenção de Título de Mestre em  
Ciências.

São Paulo

2011

Juliana da Silva Santos

IDENTIFICAÇÃO DE FATORES DE  
TRANSCRIÇÃO E SINAIS CELULARES QUE  
REGULAM A EXPRESSÃO DO GENE *cspC* EM  
*Caulobacter crescentus*

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

Area de concentração: Microbiologia

Orientadora: Dra. Marilis do Valle Marques

Versão corrigida: A versão original se encontra arquivada no serviço de comunicação do ICB.

São Paulo

2011

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

reprodução não autorizada pelo autor

Santos, Juliana da Silva.

Identificação de fatores de transcrição e sinais celulares que regulam a expressão do gene *cspC* em *Caulobacter crescentus* / Juliana da Silva Santos. – São Paulo, 2011.

Orientador: Marilis do Valle Marques.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas, Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Estudo de diferenciação em bactérias.

Versão do título para o inglês: Identification of transcription factors and cellular signals that regulate *cspC* gene expression from *Caulobacter crescentus*.

Descritores: 1. Expressão genica 2. Regulação bacteriana da expressão genica 3. Choque frio 4. Estresse oxidativo I. Marques, Marilis do Valle II. Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0185/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a):                    Juliana da Silva Santos.

Título da Dissertação:        Identificação de fatores de transcrição e sinais celulares  
que regulam a expressão do gene *cspC* em *Caulobacter*  
*croscientus*.

Orientador(a):                 Marilis do Valle Marques.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,  
em sessão pública realizada a ...../...../.....,

**Aprovado(a)**            **Reprovado(a)**

Examinador(a):    Nome completo: .....  
                          Instituição: .....

Examinador(a):    Nome completo: .....  
                          Instituição: .....

Presidente:         Nome completo: .....  
                          Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil  
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438  
e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

*Comissão de Ética em Pesquisa*

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 336/09, referente ao projeto intitulado: "*Determinação de fatores de transcrição e sinais celulares envolvidos na regulação do gene cspC*" sob a responsabilidade de **Juliana da Silva Santos**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPsh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 25 de agosto de 2009.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador da CEEA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO  
Vice-Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus queridos pais, Maria  
Helena e Vitório, pelo amor, apoio e  
compreensão em todos os momentos.

## **Agradecimentos**

À Profa. Dra. Marilis do Valle Marques pela oportunidade, confiança, paciência e compreensão, pelo exemplo de dedicação ao trabalho e acima de tudo, sobretudo, pelo profissionalismo e dedicação aos seus alunos.

Aos colegas de laboratório de ontem (José, Valéria Karla, Valeria Italiani, Vania e Kadu), e de hoje (Ricardo, Heloise, Carolina, Daniela, Maristela, Mirian e Ynes) pelo bom ambiente de trabalho, pela colaboração, ajuda com experimentos e principalmente pelas conversas e conselhos.

À Vinicius por sempre me incentivar e apoiar.

Às Profas. Dras. Suely Lopes Gomes e Regina Baldini e aos colegas do Instituto de Química, pela colaboração e pelas sugestões durante a realização deste trabalho.

À Íris, Marlene e Emilio pelo carinho, eficiência e apoio técnico.

Aos colegas do departamento pelas conversas descontraídas de corredor.

À FAPESP eo CNPq pelo auxílio financeiro.

## Resumo

SANTOS, J. S. **Identificação de fatores de transcrição e sinais celulares que regulam a expressão do gene *cspC* em *Caulobacter crescentus*** 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

As proteínas de choque frio pertencem a uma família de proteínas com um domínio altamente conservado, denominado domínio de choque frio (CSD). Estão envolvidas em vários processos celulares, incluindo adaptação a baixas temperaturas, estresse nutricional e fase estacionária. Em *C. crescentus*, uma  $\alpha$ -proteobacteria não patogênica, as proteínas CspC e CspD apresentam dois CSDs e seus níveis aumentam apenas durante a fase estacionária. Este trabalho tem como objetivo determinar os fatores de transcrição e sinais celulares envolvidos na regulação do gene *cspC* em *C. crescentus*. No presente trabalho, foi realizada a varredura de uma biblioteca de 4000 clones mutados pela inserção do transposon Tn5, onde foram identificados sete mutantes com expressão reduzida de *cspC*: CCNA03569 (proteína hipotética); CCNA02510 (deacetilase de oligossacarídeos); CCNA01594 (metiltransferase da proteína ribossomal L11); CCNA02186 (pequena subunidade da acetato lactato sintase); CCNA00084 (fosforibosil aminoimidazol carboxamida formiltransferase/ IMP ciclohidrase); CCNA03616 (sulfito redutase dependente de NADPH) e CCNA01448 (frutose-1,6-bisfosfatase). Através de ensaios de expressão na presença de um meio condicionado, verificou-se que *cspC* e *cspD* aparentemente não são induzidos em resposta ao aumento de densidade populacional. O fenótipo do mutante *cspC* na fase estacionária foi avaliado em relação a sua resistência a estresse oxidativo, e vimos que a linhagem  $\Delta cspC$  é altamente sensível ao peróxido de hidrogênio e a superóxidos, mas não é sensível a hidroperóxido orgânico. A ausência de *cspC* provavelmente é compensada por *dps*, já que a expressão deste gene aumenta no mutante  $\Delta cspC$ . Por outro lado, a transcrição de *katG* diminui, mas as atividades de KatG e SodB não são afetadas no mutante *cspC*. Em condições de estresses provocados por peróxido de hidrogênio, sacarose e sal a expressão de *cspC* não é afetada. Os fatores sigmas SigT e SigU e o regulador de transcrição Fur não estão envolvidos na regulação de *cspC*, mas no mutante  $\Delta sigJ$  a expressão de *cspC* aumenta, e no mutante  $\Delta oxyR$  ela é diminuída. Foi verificado também que *cspC* apresenta uma autoregulação positiva, que pode se dar por meio de estabilização de seu próprio mRNA.

Palavras-chaves: *Caulobacter crescentus*. *cspC*. Fase estacionária. Choque frio. Estresse oxidativo.



## ABSTRACT

SANTOS, J. S. **Identification of transcription factors and cellular signals that regulate *cspC* gene expression from *Caulobacter crescentus*.** 89 f. 2011. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

The cold shock proteins belong to a family of proteins presenting a highly conserved domain, called cold shock domain (CSD). They are involved in various cellular processes, including adaptation to low temperature, nutritional stress, cell growth and stationary phase. In *C. crescentus*, a non-pathogenic  $\alpha$ -proteobacteria, the cold shock proteins CspC and CspD have two CSDs and they are induced during stationary phase. This study aims to determine the transcription factors and cellular signals involved in *cspC* gene regulation in *C. crescentus*. In the present study we scanned a library of 4000 mutant clones with the Tn5 transposon, from which seven mutants were identified presenting reduced expression of *cspC*: CCNA03569 (hypothetical protein); CCNA02510 (polysaccharide deacetylase); CCNA01594 (ribosomal protein L11 methyltransferase); CCNA02186 (acetolactate synthase 3 regulatory subunit); CCNA00084 (bifunctional phosphoribosylaminoimidazolecarboxamide formyltransferase/IMP cyclohydrolase); CCNA03616 (sulfite reductase (NADPH)) e CCNA01448 (fructose 1,6-bisphosphatase II). Expression assays in the presence of a conditioned medium, showed that *cspC* and *cspD* are apparently not induced in response to increased cell density. The phenotype of the mutant *cspC* was evaluated as to oxidative stress resistance in the stationary phase. The results showed that the  $\Delta cspC$  strain is highly sensitive to hydrogen peroxide and superoxide but is not sensitive to organic hydroperoxide. The absence of *cspC* probably is compensated by *dps*, since the expression of this gene is increased in  $\Delta cspC$  strain. In contrast, the transcription of *katG* is decreased, but the activities of KatG and SodB are not affected in the *cspC* mutant. Under conditions of stress caused by hydrogen peroxide, sucrose or salt, *cspC* expression is not affected. The sigma factors sigmas SigT and SigU and transcription regulator Fur are not involved in the regulation of *cspC*, but *cspC* expression is increased in  $\Delta sigJ$  and decreased in  $\Delta oxyR$  strains, respectively. It was also determined that *cspC* shows a positive autoregulation, which may occur via stabilization of its own mRNA.

Keywords: *Caulobacter crescentus*. *cspC*. Stationary phase. Cold shock. Oxidative stress.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5'-UTR - região 5' não traduzida  
ATP - adenosina trifosfato  
CSD - domínio de choque frio (*cold shock domain*)  
CSP - proteína de choque frio (*cold shock protein*)  
CIPs - proteínas induzidas no frio  
DNA - ácido desoxirribonucléico  
dNTP - desoxirribonucleotídeos fosfatados  
DO<sub>600</sub> - densidade óptica a 600 nanômetros  
DTT - ditioneitol  
ECF - função extracitoplasmática  
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético  
FT - flow through  
IPTG - isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo  
Kb - quilobase(s)  
kDa - quilodáton(s)  
LB - Luria-Bertani  
M - molar  
mRNA - RNA mensageiro  
NADP - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
NBT - *nitro-blue tetrazolium chloride*  
ONPG - orto-nitrofenil-β-galactosídeo  
pb - pares de bases  
PCR - reação em cadeia da polimerase  
PMSF - fluoreto de fenilmetilsulfonil  
ppGpp - guanosina tetrafosfato  
RNA - ácido ribonucléico  
RNase - ribonuclease  
rpm - rotações por minuto  
rRNA - RNA ribossômico  
SDS - dodecil sulfato de sódio  
tRNA - RNA transportador  
U - unidade(s)  
UFC - unidade formadora de colônia  
x g - vezes a aceleração da gravidade  
X-gal - 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de <i>Caulobacter crescentus</i> .....	17
Figura 2 - Diagrama esquemático dos estágios da resposta ao choque frio de <i>E. coli</i> ...	20
Figura 3 - Modelo da resposta a carência de aminoácidos mediada por ppGpp em <i>E. coli</i> .....	26
Figura 4 - Esquema da estratégia de varredura da biblioteca.....	33
Figura 5 - Esquema das fusões transcricionais com a região regulatória de <i>cspC</i> .....	34
Figura 6 - Esquema da estratégia para determinar o sítio de inserção do transposon Tn5 por PCR.....	36
Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose contendo as digestões das minipreparações de DNA.....	50
Figura 8 - Organização do operon <i>hfsEFGH</i> e do o operon adjacente <i>HfdABCD</i> ..	51
Figura 9 - Curva de crescimento em meio PYE.....	52
Figura 10 - Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS das proteínas que ligaram ao promotor de <i>cspC</i> .....	56
Figura 11 - Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS com duas concentrações diferentes de poliacrilamida.....	57
Figura 12 - Ensaio da expressão de <i>cspC</i> no mutante $\Delta C$ .....	60
Figura 13 - Grafico representativo do ensaio para avaliar a estabilidade do mRNA de <i>cspC</i> na fase estacionária.....	61
Figura 14 - Ensaio da expressão de <i>cspC</i> nos mutantes $\Delta sigT$ , $\Delta sigU$ e $\Delta sigJ$ .....	62
Figura 15 - Ensaio de expressão de <i>cspC</i> e <i>cspD</i> em meio condicionado.....	64
Figura 16 - Ensaio de expressão de <i>cspC</i> na presença de NaCl ou de sacarose.....	66
Figura 17 - Sobrevivência relativa das linhagens em meio PYE contendo NaCl ou sacarose.....	67
Figura 18 - Ensaio de expressão de <i>cspC</i> na presença de dipiridil ou de FeSO <sub>4</sub> no meio .....	69
Figura 19 - Ensaio da expressão de <i>cspC</i> no mutante <i>fur</i> .....	69
Figura 20 - Formação dos halos de inibição por H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na fase exponencial.....	70
Figura 21 - Ensaio de expressão de <i>cspC</i> em presença de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> na fase exponencial e na fase estacionária.....	72
Figura 22 - Análise da expressão medida pelo promotor do gene <i>dps</i> no mutante $\Delta C$ ..	74
Figura 23 - Análise da expressão dirigida pelo promotor do gene <i>katG</i> no mutante $\Delta C$	75

Figura 24 - Detecção <i>in situ</i> de atividade de catalase.....	75
Figura 25 - Sobrevivência relativa das linhagens NA1000 e mutante $\Delta C$ em meio PYE contendo <i>tert</i> -butil e paraquat.....	77
Figura 26 - Detecção <i>in situ</i> de atividade da FeSOD .....	78
Figura 27 - Ensaio da expressão de <i>cspC</i> no mutante <i>oxyR</i> .....	78

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Plasmídeos utilizados .....	29
Tabela 2 - Linhagens de bactérias utilizadas .....	30
Tabela 3 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados .....	31
Tabela 4 - Ensaio de atividade de $\beta$ -galactosidase da fusão <i>cspC/lacZ</i> alguns clones da biblioteca .....	47
Tabela 5 - Identificação dos genes interrompidos nos mutantes da biblioteca sequenciados.....	49
Tabela 6 - Concentrações de DNA, proteínas e resina utilizados no ensaio de ligação	57
Tabela 7 - Sensibilidade a $H_2O_2$ da linhagem mutante <i>cspC</i> .....	71

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1. <i>Caulobacter crescentus</i> .....	16
1.2. A resposta a choque frio e adaptação.....	19
1.3. Fase estacionária.....	23
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	28
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
3.1. Condições de crescimento e meios de cultivo utilizados.....	29
3.2. Linhagens, plasmídeos e oligonucleotídeos.....	29
3.3. Identificação de genes importantes para a expressão de <i>cspC</i> . .....	31
3.3.1. <i>Conjugação</i> .....	31
3.3.2. <i>Ensaio de atividade de <math>\beta</math>-galactosidase</i> .....	32
3.3.3. <i>Varredura da Biblioteca</i> .....	32
3.3.4. <i>Identificação do sítio de inserção do transposon Tn5</i> .....	34
3.3.4.1. <i>Método de clonagem direta</i> .....	34
3.3.4.2. <i>PCR reverso</i> .....	35
3.3.5. <i>Transformação de E. coli DH5a por eletroporação</i> .....	37
3.3.6. <i>Sequenciamento de DNA dos insertos</i> .....	38
3.4. Ensaio para avaliar a meia vida de mRNA.....	38
3.4.1. <i>Preparação das amostras</i> .....	38
3.4.2. <i>Extração de RNA com Trizol</i> .....	39
3.4.3. <i>Conversão de RNA em cDNA</i> .....	39
3.4.4. <i>PCR</i> .....	39
3.5. <i>Ensaio de atividade de enzimas</i> .....	40
3.5.1. <i>Ensaio de atividade da Catalase</i> .....	39
3.5.1.1. <i>Preparação das amostras</i> .....	40
3.5.1.2. <i>Montagem, corrida e coloração do gel</i> .....	40
3.5.2. <i>Ensaio de atividade da SOD</i> .....	41
3.6. Purificação de proteínas por afinidade ao promotor de <i>cspC</i> .....	41
3.6.1. <i>Obtenção dos extratos</i> .....	41
3.6.2. <i>Ligação do fragmento do promotor de cspC a matriz</i> .....	41
3.6.3. <i>Cromatografia de afinidade e eletroforese</i> .....	42

3.7. Ensaio de expressão gênica em condições de estresses.....	42
3.7.1. Ensaio de expressão de <i>cspC</i> em presença de $H_2O_2$ .....	43
3.7.2. Ensaio de expressão de <i>cspC</i> em presença de Sacarose.....	43
3.7.3. Ensaio de expressão de <i>cspC</i> em presença de NaCl.....	43
3.7.4. Ensaio de expressão em meio condicionado.....	43
3.8. Ensaio Fenotípicos .....	44
3.8.1. Ensaio de viabilidade.....	44
3.8.2. Curva de crescimento.....	44
3.8.3. Ensaio de resistência a peróxido de hidrogênio.....	44
<b>4 RESULTADOS e DISCUSSÃO</b> .....	46
4.1. Identificação de fatores importantes para a expressão de <i>cspC</i> .....	46
4.1.1. Identificação dos genes interrompidos.....	48
4.1.2. Purificação de proteínas que ligam ao promotor de <i>cspC</i> .....	55
4.2. Autoregulação de <i>cspC</i> e o envolvimento de fatores sigmas na expressão de <i>cspC</i> .....	58
4.3. Ensaio de expressão em meio condicionado.....	62
4.4. O papel de <i>cspC</i> em diferentes condições de estresses.....	65
4.4.1 Estudo do papel de <i>cspC</i> frente ao estresse osmótico.....	65
4.4.2. Expressão de <i>cspC</i> frente a homeostase de ferro.....	68
4.4.3. Caracterização do papel de <i>cspC</i> na resposta a estresse oxidativo.....	70
4.4.3.1. <i>cspC</i> e a resposta a peróxido de hidrogênio.....	70
4.4.3.2. Expressão de <i>cspC</i> em presença de $H_2O_2$ .....	71
4.4.3.3. Expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo na linhagem do mutante $\Delta C$ .....	73
4.4.3.4. <i>CspC</i> e a resposta à hidroperóxido e superóxido.....	75
4.4.3.5. Expressão do gene <i>cspC</i> no mutante $\Delta oxyR$ .....	78
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	80
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	81

## 1 Introdução

### 1.1. *Caulobacter crescentus*

As *Caulobacters* são proteobactérias da subfamília alfa, Gram-negativas, oligotróficas, não patogênicas, de vida livre e amplamente distribuídas pelos ambientes aquáticos (marinhos e de água doce) e em muitos tipos de solo (POINDEXTER, 1981). Em ambientes aquáticos, normalmente estão associadas à cianobactérias, sendo expostas a uma alta concentração de oxigênio (POINDEXTER, 1981). Possuem uma divisão assimétrica, produzindo duas células-filhas geneticamente idênticas, porém morfologicamente distintas: uma célula sésil, que inicia um novo ciclo de replicação imediatamente após a divisão celular, e uma célula móvel com o seu programa de divisão celular e replicação de DNA silenciados (JENAL, 2000; AUSMEES, JACOBS-WAGNER, 2003; LAUB; SHAPIRO; MCADAMS, 2007). A célula móvel é importante para a bactéria por permitir a colonização de diferentes ambientes e a célula-talo, por ser sésil, tem papel importante na formação de biofilmes microbianos (JENAL, 2000; LAUB; SHAPIRO; MCADAMS, 2007)

*Caulobacter crescentus* é considerada o principal sistema modelo de investigação das vias regulatórias e genética que controlam o ciclo celular bacteriano (AUSMEES, JACOBS-WAGNER, 2003; JENAL, 2000). Este organismo facilmente manipulável experimentalmente pode ser investigado através de uma grande variedade de técnicas genéticas, bioquímicas e de biologia celular. A facilidade de sincronização nesta bactéria permite uma precisa análise temporal do ciclo celular. *Caulobacter crescentus* apresenta um genoma de 4.016.642 pares de bases em um único cromossomo circular, codificando 3.767 genes (NIERMAN et al., 2001). Estudos com abordagem genômica têm possibilitado a análise do padrão global de expressão, por técnicas como microarranjos de DNA e estudos proteômicos (SKERKER, LAUB, 2004, LAUB et al., 2000; LAUB et al., 2002; AMICK, BRUN, 2001).

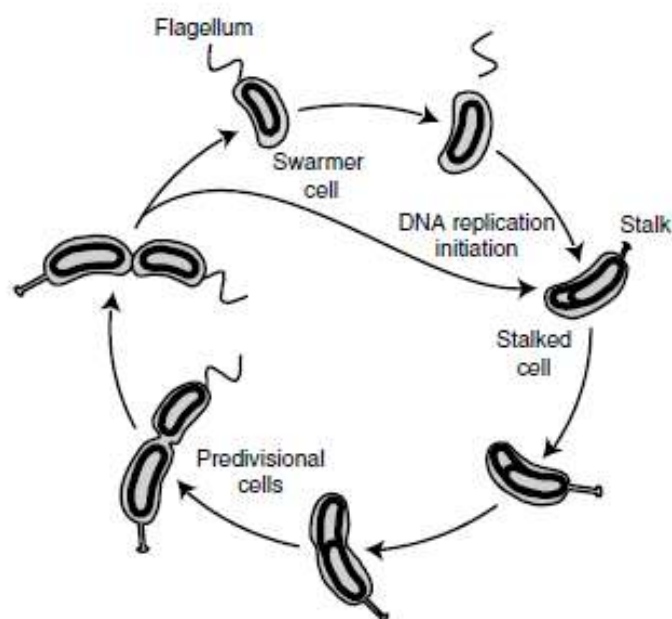
A despeito de seu inegável atrativo como modelo de estudo de diferenciação celular, esta bactéria de vida livre apresenta muitos outros aspectos interessantes de sua biologia que ainda foram pouco estudados. Muitas destas potencialidades foram reveladas com a divulgação da sequência completa do genoma de *C. crescentus* (NIERMAN et al., 2001). Um grande repertório de genes envolvidos em funções regulatórias é comumente encontrado em bactérias de vida livre, que necessitam



responder a flutuações de uma ampla variedade de fatores ambientais (CASES et al., 2003). O genoma de *C. crescentus* contém muitos genes codificando proteínas necessárias para sobrevivência em um ambiente de baixo conteúdo nutricional, incluindo genes envolvidos em quimiotaxia, enzimas para degradação de compostos aromáticos, além de um número extremamente elevado de receptores dependentes de TonB (67), sistemas de dois componentes de transdução de sinal (105) e fatores sigma de função extracitoplasmática (13) (NIERMAN et. al. 2001).

O ciclo de vida de *Caulobacter* inicia com uma célula móvel que não pode iniciar a replicação do DNA ou o processo de divisão celular, permanecendo no período G1. Posteriormente, a célula móvel se diferencia em uma célula-talo, perdendo o flagelo e os pili e originando um talo neste mesmo pólo antes ocupado pelo flagelo. Durante essa transição a célula ganha a capacidade de iniciar a replicação do DNA (fase S) e no pólo oposto ao talo inicia-se a formação de um novo flagelo. Após o término da replicação do DNA, ocorre o início da fase G2, onde um cromossomo é direcionado para cada pólo da célula pré-divisional, e enfim a célula se divide assimetricamente originando duas células filha distintas (CURTIS, BRUN, 2010). Para que o ciclo de vida de *Caulobacter* seja concluído é necessária uma rigorosa coordenação de eventos metabólicos, morfológicos e do ciclo celular.

**Figura 1** - Representação esquemática do ciclo de *Caulobacter crescentus*.



Estão descritos os principais eventos que ocorrem durante o ciclo de vida e a as diferentes formas morfológicas da bactéria.

FONTE: GOLEY; INIESTA; SHAPIRO, 2007.

O controle do ciclo celular de *C. crescentus* envolve quatro principais reguladores, DnaA, GcrA, CtrA e CcrM, que juntos controlam a expressão de no mínimo de 200 genes. Sessenta por cento dos genes em *C. crescentus* variam a sua expressão ao longo do ciclo celular, incluindo genes ligados a iniciação da replicação do DNA, segregação do cromossomo, citocinese, síntese de flagelo, pili e talo (Revisto em LAUB; SHAPIRO; MCADAMS, 2007; GOLEY, INIESTA, SHAPIRO, 2007).

Em *E. coli*, a replicação do DNA ocorre várias vezes durante o ciclo celular, já *C. crescentus* inicia a replicação do DNA uma única vez durante todo o ciclo. CtrA é um regulador de resposta essencial que se liga a DNA, e junto com CckA, uma histidina kinase, formam um sistema de dois componentes (QUON; MARCZYNSKI; SHAPIRO, 1996). CtrA é ativo em células móveis, capaz de se ligar a origem de replicação de *C. crescentus* (*Cori*) e silenciar o início da replicação e também prevenir o reinício da replicação cromossomal (QUON et al., 1998). Mais de 95 genes são diretamente regulados por CtrA, incluindo o gene da proteína de divisão celular FtsZ e *ccrM*, um gene que codifica uma importante DNA metiltransferase, envolvida no ciclo celular (LAUB, et al., 2002). O aumento dos níveis de DnaA na célula é a chave para o início da replicação, se ligando ao sítio de origem de replicação e facilitando o início da replicação. Adicionalmente, DnaA indiretamente promove a transcrição de componentes necessários para duplicação do cromossomo através de aumento dos níveis de GcrA na célula (HOTTES; SHAPIRO; MCADAMS, 2005). Diferente do que ocorre em *E. coli*, *C. crescentus* regula a quantidade de DnaA na célula durante o ciclo celular, e possivelmente isto ocorre para impedir o reinício da replicação do DNA (HOTTES; SHAPIRO; MCADAMS, 2005). Assim como *ctrA*, a expressão de *gcrA* é coordenada de acordo com a replicação do DNA. GcrA regula positivamente a expressão de genes envolvidos na manutenção da assimetria celular, como o fator de localização, *podJ*, e genes necessários para a formação da maquinaria de replicação (CROSSON; MCADAMS; SHAPIRO, 2004). A expressão de *gcrA* é regulada negativamente por CtrA em células móveis e positivamente em células sésseis por DnaA (HOLTZENDORFF; REINHARDT; VIOLLIER, 2004).

Através de análises mutagênicas geradas por inserção de um Tn5 associada a um sequenciamento em larga escala do genoma de *Caulobacter crescentus*, foi verificado que esta bactéria possui 480 ORFs essenciais, sendo que 84 apresentam um padrão de transcrição dependente do ciclo celular e possuem regiões promotoras maiores quando

comparadas com genes regulados independente do ciclo celular. Provavelmente esse fator pode estar associado ao controle transcricional complexo identificado na maioria dos genes com grandes regiões promotoras. Além disso, das 480 ORFs dez são reguladores de transcrição, incluindo reguladores do ciclo como: *ctrA*, *gcrA*, *ccrM*, *sciP* e *dnaA*. Destas 480 ORFs essenciais, 38% não há na maioria das espécies não pertencentes ao grupo das  $\alpha$ -proteobactérias e 10% são exclusivas nesta bactéria. Adicionalmente, mais que um terço de 320 ORFs essenciais em *C. crescentus*, conservadas em *E. coli*, não são essenciais para esta bactéria. Essa variação ocorre devido às diferenças na fisiologia e estilo de vida destas bactérias (CHRISTEN et al., 2011).

Há evidências de que a resposta à temperatura influencia o ciclo celular. Populações de *Caulobacter* submetidas a choque de calor cessam o crescimento e as células estacionam em fase pré-divisional (GOMES et al., 1986). A temperatura ótima para o crescimento de *Caulobacter crescentus* gira em torno dos 30°C com tempo de geração de aproximadamente 2 horas em meio PYE. Certamente esta bactéria está adaptada a sobreviver em temperaturas baixas, uma vez que é encontrada em corpos d'água que congelam completamente (ABYZOV et al., 2001; ERIKSSON et al., 2002). Estudos feitos pelo nosso grupo apontam que células de *C. crescentus* são extremamente resistentes ao congelamento a -80 °C sem a adição de nenhum crioprotetor, permanecendo viáveis por até 120 dias nesta temperatura. Foi observada também uma capacidade de adquirir criotolerância quando se verificou que, a viabilidade de *C. crescentus* é aumentada se submetida a condições de baixas temperaturas antes do congelamento a -20 °C (MAZZON et al., 2008).

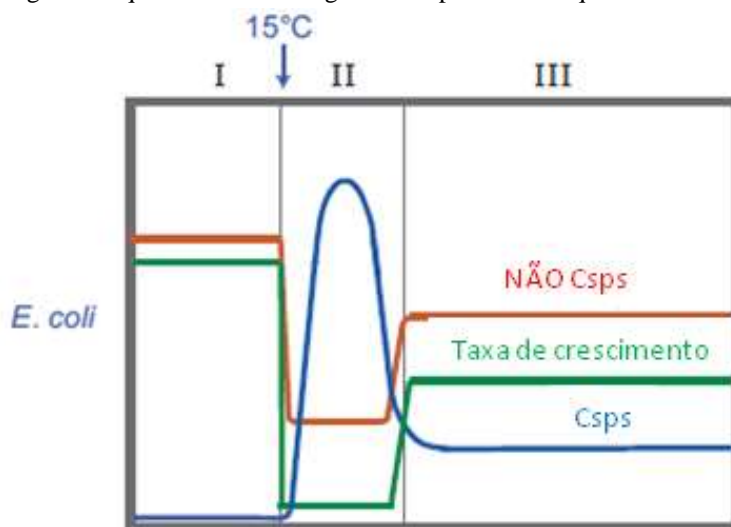
## 1.2. A resposta a choque frio e adaptação

Todos os microorganismos de vida livre são frequentemente expostos a ambientes com condições extremas como limitação de nutrientes, mudança de osmolaridade e aumento ou diminuição da temperatura (KLINKERT, NARBERHAUS, 2009). Uma rápida resposta para proteger as células destas condições, requer a ativação coordenada de vários genes. Um dos exemplos mais bem estudado é a resposta ao choque de calor em *E. coli*, que é mediada pelo fator sigma 32, que controla dois grupos de proteínas (chaperones e proteases) (KLINKERT, NARBERHAUS, 2009).

A baixa temperatura é um dos principais tipos de estresse enfrentado por todos os seres vivos. Em bactérias provoca uma redução na fluidez da membrana, afetando o transporte e secreção de proteínas; um aumento na estabilização de estruturas secundárias em ácidos nucleicos, gerando uma redução na eficiência na transcrição e tradução de mRNA; redução da atividade enzimática e o dobramento de proteínas torna-se baixo ou ineficiente. Adicionalmente, ocorre a inibição da síntese da maioria das proteínas que são sintetizadas em condições normais e as proteínas denominadas proteínas de choque frio se acumulam no período de adaptação ao choque frio, caracterizado como fase de aclimação (PHADTARE, 2004).

Em *E. coli* e em outras bactérias, considerando o primeiro estágio como a célula em seu estado normal, a resposta ao choque frio é dividida em dois estágios: o estágio II representa a fase de aclimação, que ocorre logo após a exposição ao choque frio, onde a síntese de proteínas é reprogramada e é caracterizada por uma drástica redução na taxa de crescimento. No estágio III (fase de recuperação), em muitas bactérias o perfil de proteínas observado é diferenciado, ocorrendo repressão da síntese de CSPs e a retomada da síntese de proteínas não-CSPs. Neste período as células são consideradas adaptadas ao choque frio (INOUE, PHADTARE, 2004) (Fig. 2).

**Figura 2** - Diagrama esquemático dos estágios da resposta ao choque frio de *E. coli*.



Estágio I corresponde ao estado normal da célula. Durante a fase inicial do choque frio, a fase de aclimação (Estágio II), a síntese de proteínas não-CSPs é inibida, enquanto a de CSPs é dramaticamente induzida. Após as células terem se adaptado ao frio, a síntese de CSPs é reprimida e a de proteínas não-CSPs pode ser retomada (Estágio III).

FONTE: Figura adaptada de INOUE, PHADTARE, 2004

A estabilização de estruturas secundárias nos ácidos nucléicos representa um desafio exclusivo do choque frio e impede a elongação dos mRNAs durante a transcrição e a movimentação dos ribossomos nos mRNAs durante a tradução (INOUYE, PHADTARE, 2004). Para contornar esta dificuldade as células produzem dois tipos de chaperones de RNA: as proteínas de choque frio (CSPs), que são proteínas que se ligam a RNA e retardam a formação de estruturas secundárias; e as helicases de RNA, que reparam o dobramento incorreto das moléculas de RNA. Adicionalmente, a adaptação ao choque frio nas bactérias também requer o aumento de ácidos graxos insaturados nos fosfolipídeos da membrana para manter a fluidez apropriada (INOUYE, PHADTARE, 2004).

As CSPs possuem um “cold shock domain” (CSD), que é um dos domínios de ligação a ácidos nucléicos mais conservado entre bactérias, plantas e animais (WOLFFE, 1994). Em bactérias estas proteínas estão relacionadas a vários eventos celulares, incluindo adaptação a baixas temperaturas, crescimento celular, fase estacionária e carência nutricional (PHADTARE; YAMANAKA; INOUYE, 2000; GRAUMANN, MARAHIEL, 1998).

Com base no padrão de expressão, as proteínas de choque frio de *E. coli* são divididas em dois grupos. A classe I inclui CspA, CspB, CspG, CspI, CsdA, RbfA, NusA, e PNP, proteínas que são expressas em um nível muito baixo a 37 °C e os níveis de indução aumentam rapidamente após a queda da temperatura. A classe II abrange as proteínas como, IF-2, H-NS, RecA, Hsc66 e HscB e a subunidade  $\alpha$  da DNA girase. Estas encontram-se em um nível basal a 37 °C e são regularmente induzidas após a queda da temperatura (ULUSU, TEZECAN, 2001; YAMANAKA, 1999). Algumas destas proteínas estão envolvidas em eventos celulares importantes ao processo de adaptação ao choque frio, como o superenovelamento do DNA, onde a DNA girase atua. No entanto, outras proteínas como, por exemplo, RecA, que está envolvida na recombinação e reparo do DNA e H-NS, uma proteína associada ao nucleóide e relacionada com a expressão de genes e compactação do cromossomo, também são proteínas induzidas no choque frio (YAMANAKA, 1999).

A proteína de choque frio, CspA de *E. coli* foi a primeira a ser descrita e é a principal CSP caracterizada. CspA é considerada uma chaperone de RNA e previne a formação de estruturas secundárias, proporcionando assim uma eficiente tradução de mRNAs em baixas temperaturas. Uma longa região 5'UTR é encontrada em alguns genes *csp* induzidos no choque frio em *E. coli* (*cspA*, *cspB*, *cspG* e *cspI*) e apresenta

uma sequência altamente conservada denominada de “cold box” (BAE; JONES; INOUE, 1997; GRAUMANN, MARAHIEL, 1998; PHADTARE; ALSINA; INOUE, 1999). Através de análise de deleções, observou que a região 5'UTR presente em *cspA* (cerca de 160 nucleotídeos) influencia na estabilização do seu mRNA, sendo responsável por uma extrema instabilidade do mRNA de *cspA* a 37 °C e por um efeito positivo na estabilização deste mRNA em baixas temperaturas (PHADTARE, 2004). UPPAL, AKKIPEDDI, JAWALI, 2007, verificaram que a 5'UTR de *cspE* de *E. coli*, apesar de ser uma região muito curta (41 nucleotídeos) também demonstrou ser responsável por estabilizar o mRNA de *cspE* durante o choque frio. Recentemente, Uppal e colaboradores, 2011, identificaram um sítio de ligação da proteína receptora do AMP cíclico (CRP), um regulador global envolvido no metabolismo de açúcar, em *cspE* de *E. coli* e através de ensaios de fusão de transcrição e de tradução verificou-se que CRP regula a transcrição deste gene. Adicionalmente, foi visto que a deleção de *crp* afeta o crescimento no choque frio, sugerindo importante papel de CRP á adaptação ao choque frio.

Além das proteínas induzidas no frio descritas acima, *Escherichia coli* apresenta outras proteínas que possuem o domínio CSD, mas não são expressas no frio, entre elas CspC e CspE são produzidas constitutivamente a 37 °C e CspD é a única induzida durante a fase estacionária (YAMANAKA; FANG; INOUE, 1998).

Em *Bacillus subtilis*, três CSPs foram identificadas (CspB, CspC e CspD), todas induzidas pelo choque frio e as duas últimas são também induzidas na fase estacionária. A análise de linhagens mutantes com deleções de genes *csp* de *B. subtilis* mostrou que ao menos uma cópia de um dos genes desta família é essencial mesmo em condições ótimas de crescimento (GRAUMANN et al., 1997). A análise de um duplo mutante *cspB/cspC* revelou que a remoção desses genes causa lise celular após a entrada na fase estacionária, e isso pode estar correlacionado ao fato de que tanto *cspB* quanto *cspC* são induzidos também na fase estacionária (GRAUMANN, MARAHIEL, 1999; WEBER, MARAHIEL, 2003).

No genoma de *C. crescentus*, foram localizados quatro genes que codificam proteínas de choque frio (CspA, CspB, CspC e CspD) (LANG, MARQUES, 2004), sendo apenas *cspA* e *cspB* são induzidos durante o choque frio. CspC e CspD são as únicas proteínas encontradas em *Caulobacter crescentus* que apresentam dois domínios CSDs e são induzidas durante a fase estacionária (BALHESTEROS et al., 2010). No entanto, várias diferenças são encontradas entre CspC e CspD, como por exemplo, não

foi encontrada uma considerável similaridade na sequência de seus domínios de ligação a RNA. Na fase estacionária o mutante *cspC* apresenta um aumento do comprimento e células encurvadas e também apresentam anomalias no processo de divisão celular, o que não foi encontrado no mutante *cspD*. Sendo assim, é provável que essas duas proteínas possuam papéis independentes durante a fase estacionária (BALHESTEROS et al., 2010).

### 1.3. Fase estacionária

Em ambientes que não suportam o crescimento bacteriano, o rápido aumento no número de células e o metabolismo eficiente alcançados na fase exponencial provocam um acúmulo de metabólitos tóxicos e o esgotamento das fontes nutricionais, que conseqüentemente levam estes microorganismos a atingirem a fase estacionária. A fase estacionária é caracterizada por cessamento de crescimento e a perda da capacidade reprodutiva diminui progressivamente (NYSTRÖM, 2004). Bactérias de vida livre estão a maior parte do tempo nesta fase do crescimento, dada a baixa disponibilidade de nutrientes de determinados ambientes.

Na fase estacionária, as células de *E. coli* se tornam mais resistente a uma série de estresses ambientais, como por exemplo: choque de calor, estresse oxidativo, condições de pH ácido e variações osmóticas. Essa proteção em grande parte é obtida via um único regulador de transcrição, o fator sigma S (NYSTRÖM, 2004). A resposta a estresse em geral em *E. coli* é regulada por um fator sigma alternativo ( $\sigma^s$ ), que é codificado pelo gene *rpoS*. O fator  $\sigma^s$  regula a expressão de mais de 50 genes e responde a vários tipos de estresses, como a entrada na fase estacionária, choque osmótico e choque ácido. Foi demonstrado recentemente que em *E. coli*, CspC estabiliza o mRNA de *rpoS* e também interage com Hfq, um dos principais reguladores de *rpoS* (NOGUEIRA, SPRINGER, 2000; COHEN-OR et al., 2010).

As células de *C. crescentus* sofrem mudanças drásticas na morfologia quando cultivadas em fase estacionária por um período muito extenso assumindo uma morfologia helicoidal alongada (aproximadamente 30  $\mu\text{m}$ ) e assim como em *E. coli* apresentam um aumento de resistência a estresses (WORTINGER; QUARDOKUS; BRUN, 1998). Na fase estacionária inicial, ocorre uma diminuição na viabilidade celular e a maioria das células fica no estágio pré-divisional. Após 6 a 9 dias de

incubação ocorre um aumento no número de UFC, provavelmente devido à capacidade das células que sobreviveram utilizarem os nutrientes liberados pelas células que morreram (WORTINGER; QUARDOKUS; BRUN, 1998). Durante a fase estacionária tardia, as células gradualmente adquirem uma morfologia helicoidal e alongada, com tamanho de 30  $\mu\text{m}$ , e exibem um aumento de resistência ao estresse comparado com as células que crescem exponencialmente. Quando ressuspensas em meio fresco, as células helicoidais alongadas dividem-se e retornam ao tamanho e morfologia normais nas primeiras 12 horas (WORTINGER; QUARDOKUS; BRUN, 1998).

Organismos aeróbios utilizam o oxigênio para respiração e oxidação de nutrientes. Produtos reativos de oxigênio, como radical ânion superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e o radical hidroxil ( $\text{OH}\cdot$ ) são gerados constantemente em células em crescimento aeróbio, afetando macromoléculas (DNA, lipídeos e proteínas) (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000). Para enfrentar estas espécies reativas de oxigênio (ROS) as bactérias aumentam a expressão de enzimas de destoxificação e proteínas de reparo de DNA. A resposta coordenada ao estresse oxidativo em bactérias ocorre principalmente através de dois reguladores, OxyR e SoxR, sendo que o primeiro responde ao estresse provocado por peróxido de hidrogênio e o segundo responde ao estresse induzido por ânion superóxido (LUSHCHAK, 2010). Em *E. coli* e outras bactérias, está presente OxyR, um fator de transcrição sensível a peróxido de hidrogênio. OxyR regula a expressão de várias proteínas envolvidas na resposta a estresse oxidativo, incluindo catalase, glutathione redutase e até mesmo importantes reguladores como *fur* (STORZ, TARTAGLIA 1992; MONGKOLSUK, HELMANN, 2002).

CspE e CspC estão associados a condensação do cromossomo e ao processo de divisão celular em *E. coli* (YAMANAKA et al., 1994). Através de ensaios de microarranjos de DNA, também foi observado que CspE e CspC auxiliam genes como os da catalase peroxidase (*katG*) e da proteína de ligação a DNA a Dps a atingirem os níveis máximo de expressão, através de estabilização de mRNAs de *rpoS*. (PHADARE et al., 2006). O gene *katG* em *Caulobacter crescentus* é responsável pela atividade da catalase e peroxidase, é induzido na presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e durante a fase estacionária (STEINMAN et al., 1997). Estudos recentes feitos pelo nosso grupo nesta mesma bactéria mostrou que o mutante nulo de *oxyR* é extremamente sensível a peróxido de hidrogênio e a expressão de *katG* é ativada por OxyR durante a fase estacionária e na resposta a  $\text{H}_2\text{O}_2$  (ITALIANI et al., 2011)



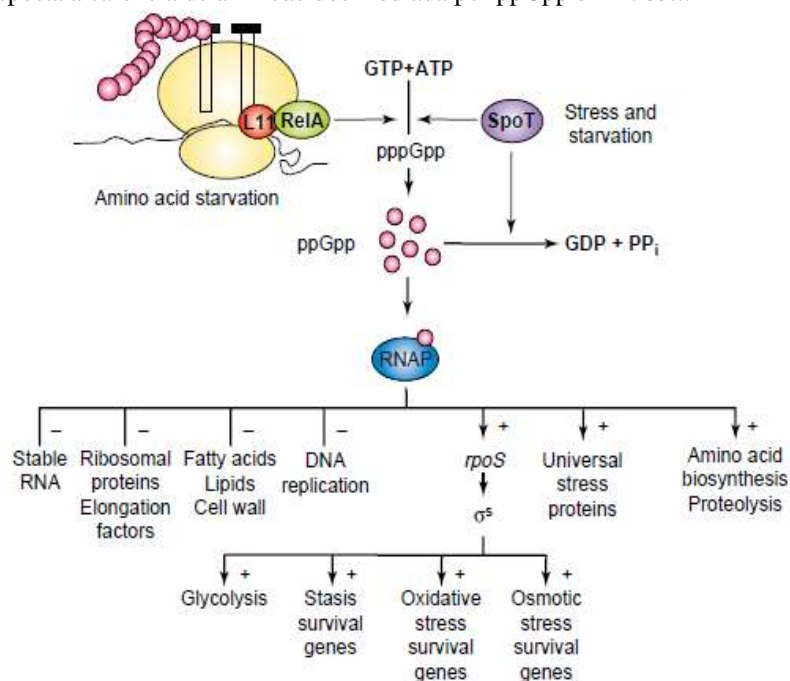
A forma mais comum de adaptação contra qualquer tipo de estresse em bactérias é modificar o fator sigma utilizado em combinação com o cerne da RNA polimerase (BASHYAM, HASNAIN, 2004). Os fatores sigmas são divididos em duas grandes famílias denominadas família sigma 70 e família sigma 54. A família sigma 70 é dividida em duas subfamílias: a subfamília do sigma 70 e a subfamília ECF (função extra citoplasmática). Esta classificação é feita com base na homologia entre as sequências e estrutura encontrada entre os sigmas ECF e a família dos sigmas 70. Fatores sigma ECF são importantes reguladores de resposta a estresse em bactéria e estão envolvidos na regulação da expressão de proteínas presentes na membrana externa ou no espaço periplasmático (BROOKS, BUCHANAN, 2009).

*Caulobacter crescentus* possui 13 sigmas ECF (NIERMAN et al, 2001), sendo que alguns destes já foram caracterizados. SigE está envolvido na resposta a cádmio, hidroperóxido orgânico, oxigênio singlete e UV (LOURENCO, GOMES, 2009). SigF está associado à resposta a estresse oxidativo na fase estacionária (Alvarez-Martinez; Baldini e Gomes, 2006) e SigT responde a estresse oxidativo e estresse osmótico (ALVAREZ-MARTINEZ et. al., 2007). Análises de microarranjos de DNA revelou 40 prováveis membros do regulon  $\sigma^T$  (ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2007). Recentemente, Britos *et al.*, 2011, também associou SigT à resposta a carência de carbono, e mostrou que este fator sigma está envolvido na degradação de CtrA, sendo ainda 27 genes identificados como sendo pertencente ao regulon de SigT em condição de carência de carbono.

Em limitação de nutrientes, muitas bactérias respondem produzindo um pequeno mensageiro denominado ppGpp (guanosina tetrafosfato). ppGpp age como um regulador global da expressão de genes em bactérias. Foi proposto que este pequeno nucleotídeo é capaz de provocar um redirecionamento na transcrição, facilitando a transcrição de genes importantes para sobrevivência em carência nutricional e outros estresses e desfavorecendo a transcrição de genes envolvidos no crescimento e proliferação celular. Em *E. coli* duas proteínas regulam a produção de ppGpp, RelA e SpoT. SpoT é capaz de sintetizar e hidrolisar ppGpp, já RelA apenas sintetiza. Diferente de *E. coli*, *Caulobacter crescentus* possui um único homólogo de RelA /SpoT, que consegue sintetizar e degradar ppGpp. Em carência de carbono, células móveis de *C. crescentus* necessitam de SpoT para prevenir um inadequado início da replicação. Além disso, na presença deste estresse a ausência de SpoT provoca uma considerável perda da viabilidade (MAGNUSSON; FAREWEL; NYSTRÖM, 2005; LESLEY, SHAPIRO,

2008). A análise da indução de *cspC* e *cspD* na fase estacionária mostrou que no mutante *spoT*, a expressão de *cspD* é diminuída, ao contrário de *cspC*, cuja expressão não é alterada. Estes resultados mostraram que, embora *cspC* e *cspD* tenham a mesma regulação temporal, eles estão sob controle de sistemas regulatórios distintos (SILVA, et al., 2010).

**Figura 3** - Modelo da resposta a carência de aminoácidos mediada por ppGpp em *E. coli*.



ppGpp se liga ao cerne da RNA polimerase em carência de aminoácidos e redireciona a transcrição de genes de crescimento para genes envolvidos na resposta a carência de aminoácidos e estresses em geral.

FONTE: MAGNUSSON; FEREWELL; NYSTRÖM, 2006

Em *E. coli* CspD age como um inibidor de replicação de DNA e apresenta um importante papel em estresse por carência nutricional (YAMANAKA et al., 2001). Recentes estudos mostraram que *cspD* em *E. coli* é regulado por um sistema de toxina/antitoxina (MqsR/MqsA) (KIM et al., 2010). Sistemas toxina/antitoxina (TA) normalmente são compostos por um par de genes localizados em um operon e são responsáveis por codificar uma toxina, que pode provocar morte celular devido à interrupção de processos celulares essenciais para as bactérias, e uma antitoxina que pode se ligar à toxina e neutralizar esta atividade. MqsR é uma toxina que induz a expressão de *cspD* e o complexo MqsR/MqsA ou apenas MqsA reprimem *cspD*. Esta repressão ocorre através de uma ligação direta do domínio C-terminal de MqsA ao promotor de *cspD* (KIM et al., 2010).

Estudos feitos pelo nosso grupo apontam que *cspD* não é essencial para o crescimento ou sobrevivência a 30 °C e sua deleção pode ser compensada pela presença de *cspC* em *C. crescentus* (LANG, MARQUES, 2004). Já a falta de *cspC* provoca um aumento na perda da viabilidade celular durante a transição para o período de senescência no início da fase estacionária. Esse fenótipo é mais severo no mutante duplo *cspCD*, indicando que ambos os genes exercem um papel importante na adaptação e na permanência da célula a longos períodos em fase estacionária (BALHESTEROS et al., 2010).

Nosso grupo recentemente estudou a regulação de *cspD* em *C. crescentus* e vários dados interessantes foram relatados (SILVA et al., 2010). Por exemplo, a expressão de *cspD* aumenta em condição de carência de carbono, mas não de carência de nitrogênio, e foi verificado que a expressão de *cspD* é inversamente dependente da taxa de crescimento, assim como observado em *E. coli*. Foi identificado um sistema de dois componentes, composto do regulador de resposta, SpdR, e da histidina quinase SpdS, que mostrou ter um papel de ativação da expressão do gene *cspD*. Um padrão de expressão similar é encontrado entre *cspC* e *cspD*, porém, SpdR não se ligou a nenhuma sequência da região promotora de *cspC* e não é importante para a indução deste gene, bem como *cspC* não é afetado por ppGpp (SILVA et al., 2010). Assim, este trabalho tem como objetivo determinar os fatores de transcrição e sinais celulares envolvidos na regulação do gene *cspC* em *C. crescentus*.

## 2 Objetivos

Este trabalho tem por objetivo identificar os fatores de transcrição e sinais celulares que regulam a expressão do gene *cspC* na fase estacionária de *C. crescentus*. Para tanto, as estratégias utilizadas foram as seguintes:

- a) Varredura de uma biblioteca de mutantes para identificação dos genes necessários para a máxima expressão de *cspC* e identificação dos genes interrompidos;
- b) Tentativa de identificação de proteínas que se ligam à região regulatória de *cspC*;
- c) Avaliação da expressão de *cspC* em alta densidade populacional (“*quorum sensing*”) e em resposta a diferentes condições de cultivo.
- d) Avaliação da expressão de *cspC* em linhagens mutantes.
- e) Análise do papel de *cspC* na resposta a diferentes estresses.

### 3 Materiais e Métodos

#### 3.1. Condições de crescimento e meios de cultivo utilizados

As linhagens de *C. crescentus* foram cultivadas em meio rico PYE (peptona 2 g/l; extrato de levedura 1 g/l; MgSO<sub>4</sub> 0,2 g/l; CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM) ou em meio mínimo M2-glicose (Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,5 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,74 g/l; NH<sub>4</sub>Cl 1,06 g/l; pH 6,9; FeSO<sub>4</sub> 1 mM; glicose 20%; MgSO<sub>4</sub> 1 mM; CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM) (ELY, 1991) e incubadas a 30 °C. Quando necessário, os meios de cultivo foram suplementados com canamicina (5 µg/ml), tetraciclina (1 µg/ml), ou ácido nalidíxico (20 µg/ml). Para os ensaios de estresse, foram adicionados quando necessário Paraquat 5 mM, *tert*-butil hidroperóxido 5 mM, NaCl 85 mM, 2,2-dipiridil 0,1 mM ou sulfato ferroso 0,1 mM.

As linhagens de *E. coli* foram inoculadas e mantidas em temperatura de 37 °C, em meio LB (triptona 10 g/l; extrato de levedura 5 g/l; NaCl 10 g/l; pH 7,5) ou 2 x TY (triptona 16 g/l; extrato de levedura 10 g/l; NaCl 5 g/l; pH 7,5) (AUSUBEL et al., 1995). Quando necessário, os meios foram acrescidos de antibiótico ampicilina (100 µg/ml), canamicina (50 µg/ml), tetraciclina (12,5 µg/ml).

#### 3.2. Plasmídeos, linhagens e oligonucleotídeos

Nas Tabelas 1 e 2 estão descritos os plasmídeos e as linhagens de *Caulobacter crescentus* e *Escherichia coli* utilizados neste trabalho, respectivamente. Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 3.

**Tabela 1** - Plasmídeos utilizados

(continua)

	Descrição	Referência
<b>pEL4</b>	Vetor de fusão de transcrição pRK <i>lacZ</i> 290 contendo a região promotora e a região ativadora do gene <i>cspD</i>	LANG, MARQUES, 2004
<b>pGEM-T Easy</b>	Vetor de clonagem, Ap <sup>r</sup>	Promega
<b>pMR20</b>	Vetor de baixo número de cópias e ampla gama de hospedeiros, Tc <sup>r</sup> , <i>oriT</i>	ROBERTS et al., 1996
<b>pRK<i>lacZ</i>290</b>	Vetor de fusão de transcrição <i>lacZ</i> , Tc <sup>r</sup> , replicon IncP1, <i>oriT</i>	GOBER, SHAPIRO, 1992

Tabela 1 – Plasmídeos utilizados.

(continuação)

<b>P<sub>H2</sub>/lacZ</b>	pRKlacZ290 com o fragmento de 240 pb correspondente à deleção parcial da região regulatória de <i>cspC</i>	BALHESTEROS, et al., 2010
<b>P<sub>cspC</sub>/lacZ</b>	pRKlacZ290 contendo a região regulatória total de <i>cspC</i>	LANG, MARQUES, 2004
<b>pUCBM21</b>	Vetor de clonagem, Replicon Co1E1, Ap <sup>r</sup>	BOHRINGER MANNEHEIM
<b>P<sub>dps</sub></b>	pRKlacZ290 contendo a região promotora de <i>dps</i>	M. RODRIGUES
<b>P<sub>katG</sub></b>	pRKlacZ290 contendo a região promotora de <i>katG</i>	ITALIANI et al. 2011

Tabela 2 - Linhagens de bactérias utilizadas

(continua)

	<b>Linhagens</b>	<b>Genótipo e/ou Fenótipo</b>	<b>Referência</b>
<i>Caulobacter crescentus</i>	NA1000	Linhagem sincronizável utilizada como padrão	EVINGER, AGABIAN, 1977
	SP0057	NA1000 $\Delta fur$	DA SILVA NETO et al., 2009
	SP3811	NA1000 $\Delta oxyR$ :: $\Omega spec$	ITALIANI et al., 2011
	$\Delta C$	NA1000 $\Delta CspC$ :: $\Omega spec$	BALHESTEROS, 2009
	$\Delta D$	NA1000 $\Delta CspD$	LANG, MARQUES, 2004
	$\Delta sigJ$	NA1000 $\Delta sigJ$	Dra. SUELY GOMES, IQ USP
	ML163	NA1000 $\Delta sigT$ :: $\Omega$	ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2007
	SG546	NA1000 $\Delta sigU$ :: $\Omega$	ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2007
<i>Escherichia coli</i>	DH5 $\alpha$	<i>supE44 lacU169</i> (80 <i>lacZ</i> M15) <i>hsdR</i> 17 <i>recA</i> 1 <i>endA</i> 11 <i>gyrA</i> 96 <i>thi-1</i> <i>relA</i> 1	HANAHAHAN, 1983

Tabela 2 – Linhagens de bactérias utilizadas.

(continuação)

S17-1	294::RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)	SIMON et al., 1983
-------	-----------------------------	--------------------

Tabela 3 – Sequência dos oligonucleotídeos utilizados.

Nome	Seqüência (5' → 3')*	Finalidade
Forward	TGACGGCTATCACCATCA	Sequenciamento
Reverse	TGACCGGCAGCAAAATG	Sequenciamento
R3	ATGTGACCTCCTAACATGGT	PCR reverso; Sequenciamento do produto de PCR reverso
L7	CCATCTCATCAGAGGGTAGT	PCR reverso; Sequenciamento do produto de PCR reverso
CSPC-F	CGGGGTTTTTTCGGTGCAATATCGC	BALHESTEROS, et al., 2010
CSPC-G	TTAGGATCCTGGCCGCCGTCCTCGGG	BALHESTEROS, et al., 2010
RicLacFow	GTTTTACAACGTCGTGACTGG	PCR
RicLacRev	GATGGGCGCATCGTAACC	PCR

### 3.3. Identificação de genes importantes para a expressão de *cspC*

#### 3.3.1 Conjugação

Foi utilizada a linhagem *E. coli* S17-1 como doadora de plasmídeos para a linhagem receptora NA1000 de *C. crescentus*. Os plasmídeos foram inseridos na linhagem *E. coli* S17-1 por eletroporação. Com o auxílio de uma alça de platina a linhagem NA1000 de *C. crescentus* foi misturada com a *E. coli* (portadora de plasmídeo com oriT) em meio PYE sólido e incubadas por 16 horas a 30 °C favorecendo assim, o processo de conjugação. Ao contrario de *C. crescentus*, *E. coli* S17-1 é sensível ácido nalidíxico. Desta forma, a seleção de *C. crescentus* portando o plasmídeo com o *pcspC* foi feita em placas PYE ácido nalidíxico e com o acréscimo do antibiótico cuja marca de resistência era codificada pelo plasmídeo.

### 3.3.2 Ensaio de atividade de $\beta$ -galactosidase

O ensaio de atividade de  $\beta$ -galactosidase foi feito conforme o método de Miller (1972). Foram inoculadas células da linhagem NA1000, em meio PYE contendo tetraciclina e incubadas a 30 °C durante a noite. Foram utilizadas culturas contendo o plasmídeo pRKlacZ290 contendo ou não o inserto com a região promotora de interesse. Em cada tubo adicionou-se 50  $\mu$ l de cada cultura, 800  $\mu$ l de tampão Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  60 mM;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  40 mM; KCl 10 mM;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mM;  $\beta$ -mercaptoetanol 50 mM), e 100  $\mu$ l de clorofórmio; o tubo de microcentrifuga foi agitado brevemente e incubado por 5 minutos a 30 °C. Em seguida, adicionou-se 200  $\mu$ l de ONPG (O-nitrofenil- $\beta$ -D-galactosídeo 4 mg/ml; tampão fosfato de potássio pH 7,0 100 mM) ao tubo, seguido de agitação e incubação novamente a 30 °C por 5 minutos. Em seguida, a reação foi finalizada com 400  $\mu$ l de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M e a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 12000 x g. A fase aquosa foi utilizada para a leitura da absorbância a 420 nm, e a absorbância das culturas foi lida a 600 nm antes de iniciar o ensaio. As unidades de atividade de  $\beta$ -galactosidase foram calculadas da seguinte maneira: Unidades =  $1000 \times [A_{420} / (T \times V \times A_{600})]$ , onde T = tempo em minutos e V = volume de células em ml.

### 3.3.3. Varredura da Biblioteca

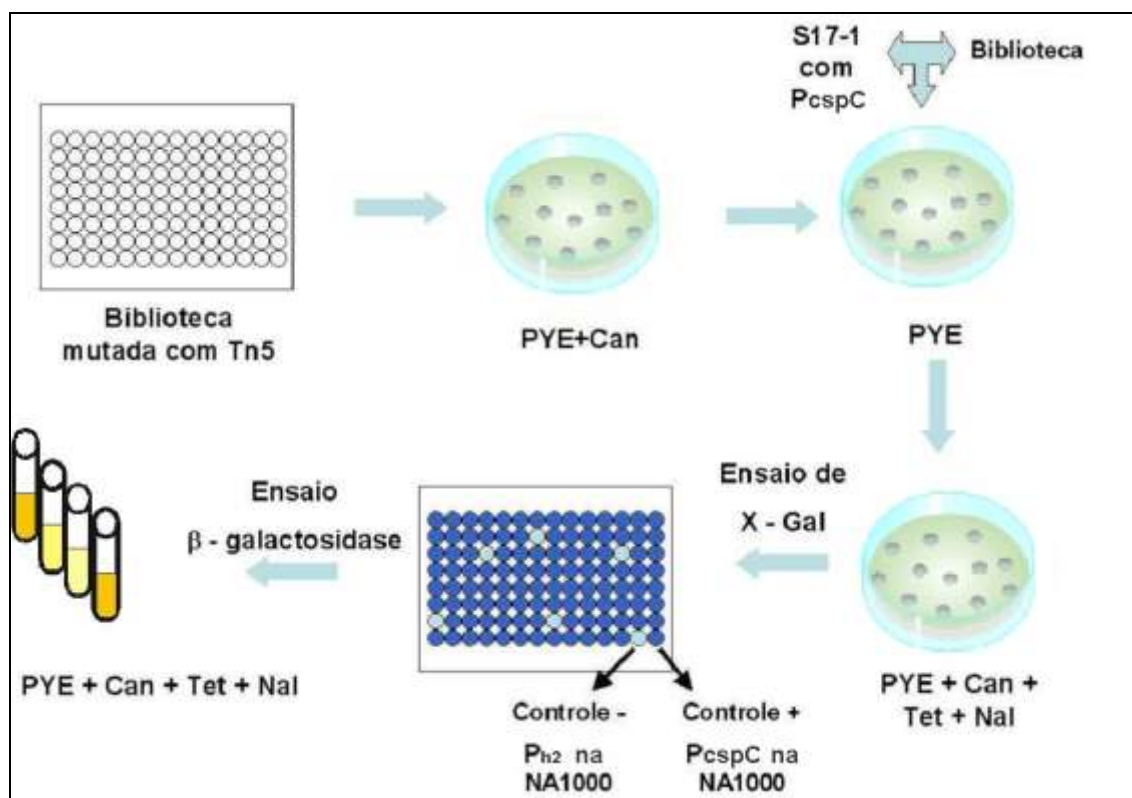
Foram construídas duas bibliotecas de mutantes de *C. crescentus* contendo 5000 (ITALIANI, MARQUES, 2003) e 2500 clones (SILVA et al., 2010), gerados por mutação aleatória induzida pelo transposon Tn5. Porém, parte da biblioteca de 5000 mutantes apresentou viabilidade reduzida ou nula, sendo assim, a varredura foi realizada em um total de 4000 clones. A figura 4 mostra a estratégia utilizada onde, os clones da biblioteca foram transferidos para placas de PYE contendo canamicina com a ajuda de um carimbo de metal as placas foram incubadas por 48 horas. Com auxílio de uma alça de Drigalski foi semeada uma cultura de *E. coli* S17-1 contendo o plasmídeo pCspC/lacZ em placas de PYE e incubadas a 37 °C por quatro horas. Para permitir a conjugação, as células dos mutantes da biblioteca de *C. crescentus* foram carimbadas sobre o tapete de *E. coli* e as placas foram mantidas a 30 °C por 16 horas. A seguir, esses mutantes foram transferidos para placas de PYE com canamicina (marca de



resistência do transposon), tetraciclina (marca de resistência do plasmídeo pRKlacZ290) e ácido nalidixíco e permaneceram na estufa a 30 °C por três dias.

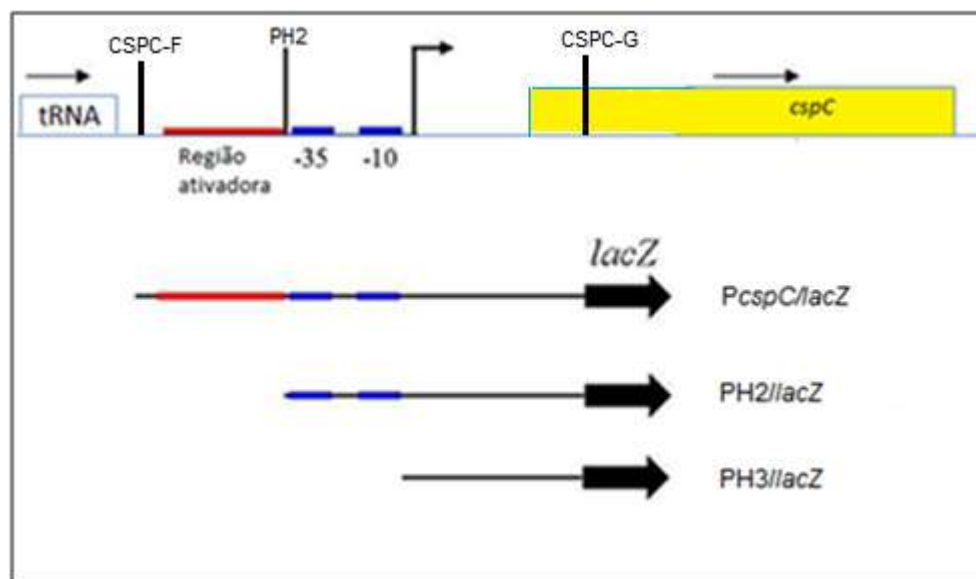
Posteriormente, as colônias foram transferidas para placas de 96 poços contendo 150 µl de meio PYE com canamicina, tetraciclina e ácido nalidixíco e mantidas sob constante agitação por 48 horas. Após dois dias foi aplicado X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolilD-galactopiranosídeo), adicionando-se a cada poço 5 µL de uma solução 20 mg/ml e depois de alguns minutos as culturas ficavam azuis. Foram utilizados para esse ensaio um controle positivo NA1000 (*PcspC/lacZ*) e um negativo NA1000 (*PH<sub>2</sub>/lacZ*) (Fig. 5). As colônias que ficassem azuis mais claras similares ao controle negativo eram selecionadas para ensaio de β-Galactosidase. Os clones com baixa atividade enzimática, menor que 2000 unidades foram selecionados para sequenciamento do DNA.

**Figura 4** - Esquema da estratégia de varredura da biblioteca



O processo de conjugação dos clones mutados da biblioteca de transposição com células de *E. coli* S17-1 contendo o plasmídeo com o *pcspC* e a seleção feita por ensaio com X-Gal para posterior ensaio de atividade de β-galactosidase.

**Figura 5** - Esquema das fusões transcricionais com a região regulatória de *cspC*.



Em amarelo, o gene *cspC*, a linha vermelha indica a região presumivelmente ativadora do gene; as linhas azuis indicam as regiões -35 e -10 do promotor. A seta dobrada indica o início de transcrição do gene. Abaixo, estão esquematizadas as regiões contidas em cada construção no vetor pRK*lacZ*290. As setas grossas pretas representam o gene repórter *lacZ*, que codifica a enzima  $\beta$ -galactosidase.

FONTE: Modificado de BALHESTEROS, 2009.

### 3.3.4. Identificação do sítio de inserção do transposon *Tn5*

Duas estratégias foram utilizadas (PCR reverso e clonagem direta no vetor pUCBM21) para identificar o gene interrompido em cada linhagem mutante e determinar o sítio de inserção do *Tn5*.

#### 3.3.4.1. Método de clonagem direta

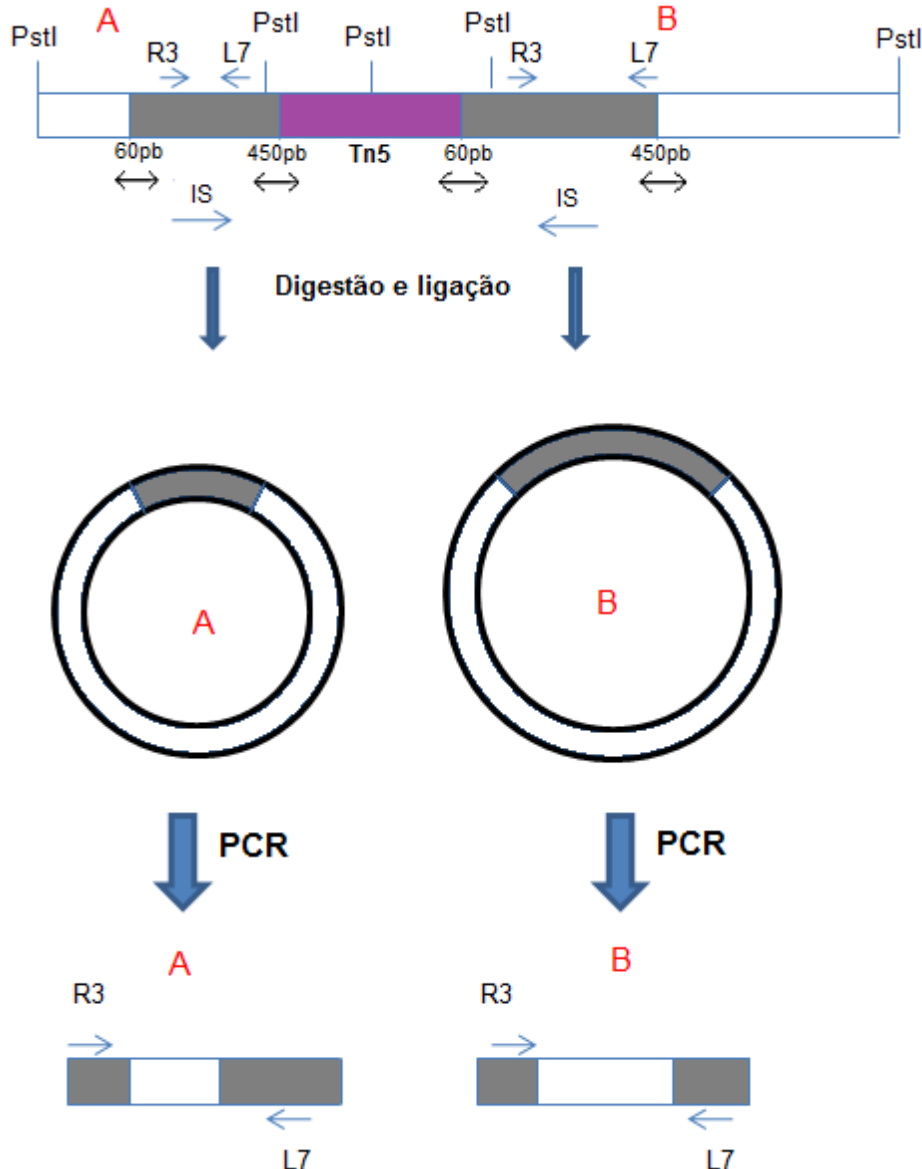
Após extração do DNA genômico, através do método descrito por Chen e Kuo (1993), este foi digerido com a enzima de restrição *Sall*, a qual reconhece vários sítios no genoma de *C. crescentus* NA1000 e um sítio no *Tn5* próximo ao gene de resistência a canamicina. Desta forma, o fragmento gerado apresenta uma parte do DNA de *C. crescentus*, a IR do *Tn5* e o gene de resistência a canamicina do transposon. Digerido o DNA genômico, os fragmentos foram ligados ao vetor de clonagem pUCBM21, a ligação foi inserida por eletroporação em *E. coli* DH5 $\alpha$  e a cultura foi semeada em placas LB contendo canamicina e ampicilina. Desta forma, os transformantes que

conseguiam crescer na presença destes antibióticos possuíam resistência do Tn5 e do vetor de clonagem respectivamente. Para confirmar a presença do fragmento, o DNA plasmidial foi digerido com SalI, e os clones nos quais visualizamos duas bandas, uma banda do vetor pUCBM21 (3,7kb) e uma do fragmento, foram selecionadas para sequenciamento do DNA. Através do sequenciamento foi possível determinar o sítio de inserção do transposon do inserto e identificar a IR do Tn5. A posição exata da inserção foi obtida pela comparação com a sequência do genoma de *C. crescentus* NA1000.

#### 3.3.4.2. PCR reverso

Foram extraídos os DNAs genômicos das linhagens mutantes selecionadas, e aproximadamente 500 ng de DNA foram digeridos com a enzima PstI (Invitrogen) durante 16 horas a 37 °C. Afim de que os fragmentos digeridos com PstI circularizassem, cerca de 5 ng do DNA cromossomal digerido foi ligado com 5 U de T4 DNA ligase (Invitrogen) em um volume final de 100 µl. Em seguida foram utilizados 5 µl da ligação para a reação de PCR. A reação foi feita com 50 pmol de cada oligonucleotídeo R3 e L7 que hibridizam na IS do transposon; 0,2 mM de cada dNTPs; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 U de Taq DNA Polymerase Platinum (Invitrogen) e tampão fornecido pelo fabricante. As condições de PCR foram de 95 °C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto. Após os 40 ciclos a reação permaneceu a 72 °C por 7 minutos e em seguida a temperatura foi mantida a 4 °C. As amplificações dos produtos de PCR foram confirmadas através de visualização em gel de agarose 1%. Posterior a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio e foi visualizado sob luz UV.

**Figura 6** - Esquema da estratégia para determinar o sítio de inserção do transposon Tn5 por PCR.



O cromossomo de *C. crescentus* é discriminado em branco e indicado pelas letras A e B. Em cinza estão as IS do Tn5 e em roxo os genes internos do Tn5 (incluindo o gene de resistência a canamicina). A enzima de restrição PstI foi utilizada para digerir o DNA genômico dos mutantes. Os círculos ilustram os fragmentos (parte do DNA genômico e das IS do Tn5) gerados pela ação da enzima PstI, ligados e circularizados. O produto das reações de PCR foi amplificado e sequenciado.

FONTE: Modificado de ITALIANI, 2001.

Após a corrida eletroforética, um corte foi feito no gel abaixo das bandas visualizadas, e em seguida uma membrana DE-81 foi posicionada neste corte. O gel foi reposicionado na cuba e a eletroforese se reiniciou por cerca de dez minutos, de modo que o fragmento fosse transferido para a membrana. Em seguida a membrana foi embebida em 500 µl de solução de isolamento de DNA (NaCl 1 M; Tris-HCl pH 8; 1

mM EDTA) e foram adicionados 10 mg de tRNA de levedura. Após 16 horas em temperatura ambiente, a solução foi submetida à extração com fenol:clorofórmio com a 2ª repetição da extração apenas com clorofórmio. O DNA foi precipitado com duas vezes o volume de etanol por uma hora a -80 °C e centrifugado por 15 minutos a 12.000 rpm a 4 °C. Após a precipitação foram efetuadas duas lavagens com etanol 70% e então, as amostras foram secas e ressuspensas em TE. Os fragmentos purificados foram clonados no vetor pGEM-T Easy e inseridos por eletroporação em *E.coli* DH5 $\alpha$ . Para confirmar a clonagem dos fragmentos corretos, 500 ng de DNA plasmidial foram digeridos com a enzima EcoRI.

### 3.3.5. Transformação de *E. coli* DH5 $\alpha$ por eletroporação

Foram inoculadas células da linhagem DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* em 5 ml de meio LB. Após incubação por 16 horas a 37 °C, esta cultura foi diluída para uma densidade óptica a 600 nm (DO<sub>600</sub>) de 0,1 em 500 ml de meio LB. Ao chegar a uma absorbância de 0,5-0,6, a cultura foi mantida no gelo por 15 minutos e em seguida foi transferida para tubos de centrífuga previamente resfriados e centrifugada por 40 minutos a 4 °C e 5000 x g. O sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 100 ml de água destilada estéril gelada, e após mais duas lavagens, foram ressuspensas em 5 ml de glicerol 10% gelado. Os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 4 °C e 5000 x g e as células foram ressuspensas em 500  $\mu$ l de glicerol 10% gelado. Enfim, as células foram distribuídas em alíquotas de 40  $\mu$ l nos tubos de microcentrifuga, congeladas em gelo seco até serem armazenadas a -80 °C. As transformações foram feitas utilizando para cada uma delas 40  $\mu$ l de *E. coli* DH5 $\alpha$  e 1  $\mu$ l da reação de ligação no vetor pGEM ou pUCBM21. A mistura foi inserida em uma cubeta de eletroporação gelada e a seguir, as células foram submetidas a choque de 200  $\Omega$ , 25  $\mu$ F e 1,8 kV. Rapidamente após a eletroporação, foi adicionado às células 1 ml de meio LB, o meio contendo as células foi transferido para um tubo de vidro estéril e incubado sob agitação constante a 37 °C por 1 hora. Depois a cultura foi dividida em alíquotas e semeadas em placas LB ágar. Dependendo do vetor utilizado, foi adicionado antibióticos, contendo 25  $\mu$ l de X-gal (20 mg/ml) e IPTG (25  $\mu$ l de um estoque 100 mM).

### 3.3.6. Sequenciamento de DNA dos insertos

Após confirmação da clonagem do inserto nos plasmídeos (através da digestão destes com PstI ou SalI), a extração do DNA plasmidial foi feita com o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) para o sequenciamento automático com o BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems do Brasil). Para o sequenciamento, foram utilizados oligonucleotídeos internos ao transposon Tn5 (R3 e L7). Aproximadamente 1 µg de cada minipreparação de DNA plasmidial foi transferido para um tubo contendo 3,2 pmol de um dos oligonucleotídeos, adicionando-se 2 µl do tampão 5 X e 1 µl do “Cycle Sequencing Mix”, em um volume final de 10 µl. Os sequenciamentos foram realizados nas seguintes condições de PCR: 95 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 52 °C por 20 segundos e 60 °C por 4 minutos. Foram adicionados 50 µl de isopropanol 75% aos 10 µl de cada reação para precipitação. Em seguida, esta mistura foi homogeneizada e permaneceu à temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir, os tubos foram centrifugados por 50 minutos a 1500 x g e 20 °C. Os precipitados passaram por duas lavagens com etanol 70% e então o DNA foi seco a 37 °C por 30 minutos e ressuspendido em 2,5 µl de tampão apropriado. As amostras foram mantidas em temperatura ambiente por 2 horas ou durante a noite a 4 °C. Enfim, estas amostras foram desnaturadas por calor para serem aplicadas no aparelho de sequenciamento ABI-377-36 Autosequencer (Perkin-Elmer Biosystems Inc., Foster City, CA, E.U.A.).

## 3.4. Ensaio para avaliar a meia vida de mRNA

### 3.4.1. Preparação das amostras

Para obter uma cultura de fase estacionária, 40 ml de células de *Caulobacter crescentus* NA1000 ou do mutante  $\Delta C$  contendo o vetor *pcspC/lacZ* foram incubadas por 16 horas a 30 °C sob constante agitação e diluídas para uma  $DO_{600}$  igual a 0,1. Após 24 horas, as células foram divididas em 4 tubos, cada tubo correspondeu a um ponto (0', 2', 4', 6') e em ordem decrescente, iniciando do ponto 6', foram adicionados 2 µl de 10 µg/µl de rifampicina com exceção do ponto 0' que não recebeu nenhum tipo de adição.

Durante todo o ensaio as células permaneceram sob constante agitação. A seguir, as células foram transferidas para tubos livre de RNAses e centrifugadas por 2 minutos a 14000 x g a 20 °C. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 1 ml de trizol. A suspensão foi transferida para tubos de microcentrifuga e armazenada a -80 °C.

#### *3.4.2. Extração de RNA com Trizol*

As suspensões de células em Trizol foram incubadas por 10 minutos a 65 °C. A seguir, adicionou-se 200 µl de clorofórmio para cada 1 ml de trizol, os tubos foram invertidos com constante agitação por 15 segundos e depois incubados à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 12000 x g por 15 minutos a 4 °C. Após a centrifugação, formaram 3 fases na mistura (uma rosa, uma branca e fina e uma transparente) A fase superior (transparente) foi removida e transferida para um novo tubo de microcentrifuga. Precipitou-se o RNA da fase aquosa adicionando 500 µl de isopropanol para cada ml de trizol utilizado na homogeneização. Após a precipitação o RNA permaneceu 1 hora no gelo seco. Em seguida, centrifugou-se por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 1 ml de etanol 75% para cada 1 ml de trizol utilizado, centrifugando por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi removido, os pellets foram secos e ressuspensos com 100 µl de H<sub>2</sub>O MilliQ tratada com DEPC.

#### *3.4.3. Conversão de RNA em cDNA*

Os RNAs foram convertidos a cDNA conforme instruções do kit (“SuperScript III first strand synthesis for RT-PCR”) da Invitrogen, utilizando 5 µg de molde de RNA para uma reação total de 20 µl.

#### *3.4.4. PCR*

O PCR foi realizado conforme o item 3.4.2.2, porém a quantidade de ciclos foi alterada: para a linhagem NA1000 foram realizados 23 ciclos e para o mutante ΔC foram realizados 28 ciclos. Os iniciadores utilizados foram os RicLacFow e RicLacRev. As

amplificações dos produtos de PCR foram confirmadas através de eletroforese em gel de agarose 1%. O gel foi corado com brometo de etídio e visualizado sob luz UV.

### 3.5. Ensaio de atividade de enzimas

#### 3.5.1. Ensaio de atividade de catalase

##### 3.5.1.1. Preparação das amostras

Um extrato total de células foi obtido de uma cultura de fase estacionária tardia de NA1000,  $\Delta C$ , NA1000 (pMR20),  $\Delta C$  (pMR20-*cspC*). Após crescerem em meio PYE durante 48 horas sob constante agitação, as células foram centrifugadas por 15 minutos a 10.000 x g a 4 °C. O sobrenadante foi descartado, as células foram ressuspensas em 1 ml de tampão fosfato de potássio (25 mM, pH 7,0), e em seguida foram transferidas para tubos de microcentrifuga, centrifugando-se por 5 minutos a 4 °C. Ressuspendeu-se cada precipitado em 800  $\mu$ l de tampão fosfato de potássio e adicionou-se 1 ml de coquetel inibidor de protease (Sigma) e 1 mM de PMSF. A seguir as células foram sonicadas nas seguintes condições: amplitude 30%, dois pulsos de 15 minutos com intervalos de 30 segundos. A seguir, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 x g a 4 °C, o pellet foi desprezado e as proteínas dos extratos contidas no sobrenadante foram separadas em um gel não desnaturante.

##### 3.5.1.2. Montagem, corrida e revelação

Foram montados dois géis, um gel de corrida e um gel de empilhamento. O gel de corrida foi montado com a adição de uma solução contendo 3,2 g de acrilamida; Tris HCl pH 8,9 500 mM; 0,13% TEMED (v/v) e 0,25  $\mu$ g/ml de persulfato de amônia. Para a montagem do gel de empilhamento foram adicionados: 0,6 g de acrilamida; Tris ( $H_3PO_4$ ) pH 7,2 0,058 M, 1  $\mu$ l de uma solução contendo 5% TEMED e 5  $\mu$ g/ml de riboflavina. Foram aplicados 25  $\mu$ g, 50  $\mu$ g, ou 100  $\mu$ g dos extratos de proteína acrescidos de 3  $\mu$ l de glicerol no gel não desnaturante e este foi submetido à eletroforese com as seguintes condições de corrida: 50V, 15 mA por 2 horas. O gel foi corado com a adição de 100 ml de fosfato de potássio 50 mM pH 7,0, 20  $\mu$ l de EDTA 0.1 mM e 50 mg de horseradish peroxidase (HPR) sob agitação por 45 minutos. Em seguida, foi



aplicado 71  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. A solução foi removida e lavou-se o gel com H<sub>2</sub>O destilada. A seguir, adicionou-se 100 ml de fosfato de potássio 50 mM e EDTA 0.1 mM e 50 mg de diaminobenzedina e o gel foi mantido sob constante agitação durante 10 minutos.

### 3.5.2. Ensaio de atividade da SOD

A obtenção do extrato total de proteínas, a montagem e a corrida do gel foram realizadas conforme descrito nas seções 3.5.1-1 e 3.5.1-2. A coloração do gel foi feita após a corrida: incubou-se o gel com NTB "nitroblue tetrazolium" 25 mM no escuro por 30 minutos, lavou-se o gel com H<sub>2</sub>O MilliQ e adicionou-se uma solução contendo fosfato de potássio 50 mM pH 7,8, EDTA 1 mM, TEMED 28 mM e riboflavina 30 mM.

## 3.6. Purificação de proteínas por afinidade ao promotor de *cspC*

### 3.6.1. Obtenção dos extratos

Para obter o extrato total de proteínas de fase estacionária, células de *Caulobacter crescentus* NA1000 foram incubadas durante a noite a 30 °C sob constante agitação. A seguir centrifugou-se 50 ml de cultura por 20 minutos a 5000 x g. As células foram ressuspendidas em 30 ml de tampão de lise (fosfato de sódio 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 1mM e glicerol 10%) e centrifugou-se por 15 minutos a 5000 x g. Em seguida, adicionou-se 3 ml de tampão de lise contendo 10  $\mu$ g/ml de lisozima e PMSF 1 mM. As células foram sonicadas com os seguintes parâmetros: amplitude 30%, 8 pulsos de 15 segundos com intervalo de 30 segundos. Os extratos foram transferidos para tubos de microcentrifuga e centrifugados por 15 minutos a 13000 x g.

### 3.6.2. Ligação do fragmento do promotor de *cspC* a matriz

A fim de obter a região promotora de *cspC* biotinizada, foi sintetizado o oligonucleotídeo CSPC-F biotinizado na extremidade 5' (Invitrogen). Para amplificar esta região, uma reação de PCR foi realizada. Foi utilizado 1  $\mu$ l de DNA molde (o vetor pGEM contendo o fragmento da região do gene *cspC*), 50 pmol de cada oligonucleotídeo (CSPC-F biotinizado e CSPC-G), de uma mistura de dNTPs 0,2 mM

(Invitrogen), 5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen),  $MgCl_2$  1,5 mM, dimetilsulfóxido 10% e 1 X tampão de PCR fornecido com a enzima. As condições de PCR foram de 95 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 56 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. Após os ciclos, a reação permaneceu a 72 °C por 7 minutos e foi mantida a 4 °C. Os produtos de PCR, de 300 pb, tiveram suas ampliações confirmadas por visualização em gel de agarose 1%, em tampão de corrida TBE 1 X (Tris base 90 mM; ácido bórico 88 mM; EDTA 0,1 M), utilizando como marcador de peso molecular o 1kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). As reações de amplificação foram purificadas com o QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) segundo instruções do fabricante.

A ligação do fragmento da região promotora de *cspC* biotilada na resina foi feita conforme orientações do fabricante com kit Dynal® kilobaseBINDER™ (Invitrogen). Após a ligação do DNA biotilado na resina, estas foram equilibradas com tampão TGED (Tris HCL 20 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, 10 % de glicerol, DTT 1 mM e Triton X-100 0,01%) e NaCl 50 mM.

### 3.6.3. Cromatografia de afinidade e eletroforese

Nos ensaios de ligação foram utilizados 20 µg de extrato total de proteínas e a concentração de NaCl foi variada para padronização do ensaio, a temperatura adotada foi 25 °C e o tempo de ligação foi de uma hora. A eluição também foi feita em diferentes concentrações de NaCl, as concentrações constam descritas na figura 10.

Após a passagem e eluição das proteínas na resina contendo o promotor de *cspC* biotilado, as amostras foram fervidas por 3 minutos para desnaturação das proteínas e centrifugadas por 5 minutos para separação das impurezas. Foram retirados 10 µl do sobrenadante para aplicação em gel de poliacrilamida-SDS 10%, 12% ou 15%, e procedeu-se à eletroforese com voltagem a 200 V, amperagem constante por 45 minutos. O padrão de peso molecular utilizado foi Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen). A visualização das proteínas foi feita após coloração do gel com uma solução de Coomassie Blue R-250 0,05% em metanol 50% e ácido acético 10%, e descoloração do fundo com solução Destain (ácido acético 7%; metanol 5%).

### 3.7. Ensaios de expressão gênica em condições de estresses

Para os ensaios de expressão gênica as culturas de NA1000(*P<sub>cspC</sub>/lacZ*) foram incubadas por 16 horas em meio PYE/tetraciclina ou em meio M2/tetraciclina e incubadas a 30 °C sob constante agitação. Em seguida, as culturas foram diluídas para uma DO<sub>600</sub> 0,1 e ao atingirem a DO<sub>600</sub> de 0,5, estas foram divididas em dois tubos estéreis. O estresse foi aplicado ao primeiro tubo e ao segundo tubo (controle) não foi adicionado nada. A seguir, foram realizados ensaios de β-galactosidase.

#### *3.7.1. Ensaio de expressão de cspC em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

Para este ensaio o meio de crescimento utilizado foi PYE/tetraciclina, e foram adicionados H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para 60 μM ao tubo que recebeu o estresse. Os ensaios de atividade de β-galactosidase foram feitos nos tempos 15, 30 e 60 minutos após a adição do estresse.

#### *3.7.2. Ensaio de expressão de cspC em presença de Sacarose*

O meio utilizado para realizar este ensaio foi M2/tetraciclina, e foi adicionada sacarose para 150 mM ao primeiro tubo. Os ensaios de atividade de β-galactosidase foram feitos nos tempos 1, 2, 3, e 5 horas após a adição do estresse.

#### *3.7.3. Ensaio de expressão de cspC em presença de NaCl*

Utilizou-se o meio M2/tetraciclina, sendo adicionado NaCl para 85 mM ao primeiro tubo. Os ensaios de atividade de β-galactosidase foram feitos nos tempos 1, 2, 3, e 5 e 24 horas após a adição do estresse.

#### *3.7.4. Ensaio de expressão em meio condicionado*

Um meio de cultura condicionado (meio de fase estacionária após remoção das células) foi preparado a partir de uma cultura de *C. crescentus* NA1000 em fase estacionária, incubada por 16 horas a 30 °C sob constante agitação. Após o crescimento, a cultura foi centrifugada durante 20 minutos e depois foi filtrada em uma membrana de 0,2 μm para remoção das bactérias. Para manter a concentração dos nutrientes, adicionou ao sobrenadante, um meio PYE concentrado 20X. As culturas a serem

testadas no meio condicionado (10 ml de NA1000 *PcspC/lacZ*, NA1000 *PcspD/lacZ*) foram incubadas por 16 horas. Em seguida, as culturas foram diluídas para uma  $DO_{600}$  0,1 e ao atingirem a  $DO_{600}$  de 0,3 a depois centrifugadas por 20 minutos, o sobrenadante foi desprezado, e em seguida, foi adicionado o meio condicionado ou o meio normal (PYE). Foram realizados ensaios de atividade de beta-galactosidase para avaliar a expressão de *cspC* e *cspD* nos tempos 30, 60 e 90 minutos após a adição do meio condicionado.

### 3.8. Ensaio Fenotípicos

#### 3.8.1. Ensaio de viabilidade

As linhagens NA1000 e o  $\Delta C$  foram incubadas em meio PYE em temperatura ótima (30 °C), sob agitação por uma noite. A seguir, as culturas foram diluídas para um volume de 10 ml e, ao chegar a uma  $DO_{600}$  de 0,5, retirou-se a primeira alíquota (considerada como tempo 0) para contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs). Estas foram determinadas em meio sólido PYE, utilizando diluições seriadas das culturas ( $10^{-1}$  a  $10^{-6}$ ). Nesta densidade óptica foi adicionado paraquat para 5 mM ou *tert*-butil hidroperóxido para 5 mM nas culturas e foram coletados pontos de 15, 30 e 60 minutos após a aplicação do agente oxidante. Adicionalmente, as células foram expostas a NaCl para 85 mM ou sacarose para 150 mM e alíquotas foram retiradas antes e após 3 e 24 horas do início do estresse. Calculou-se a sobrevivência relativa como sendo a razão entre o número de UFCs obtido e o número de UFCs inicial.

#### 3.8.2. Curva de crescimento

O monitoramento do crescimento de culturas de NA1000 e do clone 12-5F com a adição de 2,2-dipiridil (quelante de ferro) para 0,1 mM ou de sulfato ferroso para 0,1 mM foi feito através de medidas de absorbância a 600 nm, As alíquotas foram retiradas com o ponto inicial a uma  $DO_{600}$  próxima a 0,15 e pontos de 2,4,6,8 e 24 horas.

#### 3.8.3. Ensaio de resistência a peróxido de hidrogênio

As linhagens ( $\Delta CspC$  portando o pMR20 sem o inserto,  $\Delta CspC$  complementada com pMR20-*cspC* e NA1000 pMR20 sem o inserto) foram crescidas durante a noite em meio PYE tetraciclina e incubadas a 30 °C sob agitação constante. A seguir, as culturas foram diluídas para  $DO_{600} = 0,1$  e ao atingirem uma  $DO_{600}$  de 0,5, foram espalhadas em placas de meio PYE e tetraciclina. Após as placas secarem, foi inserido um disco estéril de papel em cada placa e adicionado ao disco 10  $\mu$ l de  $H_2O_2$  (3%), e a seguir, as placas foram incubadas a 30 °C. As células diluídas inicialmente continuaram a crescer nas mesmas condições e foram utilizadas para realização deste mesmo ensaio nos tempos 24 e 48 horas após o crescimento. A inibição do crescimento foi avaliada pela medida do diâmetro do halo de inibição.

## 4 Resultados e Discussão

### 4.1. Identificação de fatores importantes para a expressão de *cspC*

Foi determinado que a ausência de *cspC* em *C. crescentus* provoca sensibilidade a baixa temperatura, queda severa na viabilidade em fase estacionária a 30 °C e morfologia alterada (BALHESTEROS et al., 2010). Além disso, *cspC* apresenta uma alta expressão já em fase logarítmica, e esta expressão aumenta conforme a entrada na fase estacionária, sendo a maior quando comparada com os outros genes *csp* de *C. crescentus* (BALHESTEROS, 2009). Anteriormente também havia sido definida uma região importante pela ativação da expressão de *cspC*, indicando que este gene possui uma regulação transcricional (BALHESTEROS, 2009). Essas informações apontam para a importância deste gene para a adaptação da célula a esta fase, e levaram à proposição deste trabalho, que está dividido em duas partes: estudo da regulação e análise do papel de *cspC*.

Baseando-se na varredura da biblioteca de mutantes que levou a identificação do regulador de *cspD*, SpdR, foi realizada uma varredura da biblioteca de mutantes de 4000 clones que receberam por conjugação o pRK*lacZ*290 contendo a região regulatória do gene *cspC* a 5' do gene *lacZ*. Após incubação por 48 horas, foram adicionados 4 µl de X-Gal 20 mg/ml, aguardou-se alguns minutos e o processo inicial de seleção se fez por diferenciação visual de clones mais claros e mais escuros em presença de X-Gal, produzidos pela atividade de beta-galactosidase ou interrupção desta. O controle positivo, *C. crescentus* NA1000 contendo *PcspC/lacZ*, apresenta neste ensaio a coloração azul escuro, pois o gene repórter *lacZ* é expresso pelo promotor de *cspC* que está induzido em seus níveis máximos. O controle negativo utilizado foi *C. crescentus* NA1000 contendo p*H<sub>2</sub>lacZ*290, com a região promotora de *cspC* clonada a 5' do gene *lacZ*, mas sem a região presumivelmente ativadora (Fig. 5) (BALHESTEROS, 2009). Nesta construção o promotor de *cspC* está expressando o gene *lacZ* em menor quantidade, propiciando uma coloração azul clara.

Esse processo de seleção foi dificultado pela variação de tons de azul gerados. Eram identificados três tons de azul (um azul claro, um azul médio e um azul mais escuro). Essa variação provavelmente foi gerada devido a alta expressão do gene *cspC* que já ocorre na fase exponencial do crescimento. Após esta seleção, os 500 clones visivelmente mais claros foram submetidos à avaliação quantitativa da expressão por

meio de ensaios de atividade de beta-galactosidase. Uma parte dos clones inicialmente selecionados confirmou realmente ter os níveis de expressão diminuída, até mesmo número de unidades menor que o controle negativo. Este resultado sugere que vários sinais celulares podem estar envolvidos na expressão de *cspC*. Estes ensaios quantitativos levaram à seleção de 15 clones com expressão diminuída, arbitrariamente escolhida como menor que 2000 unidades (Tabela 4). Sete destes clones tiveram os genes mutados identificados por sequenciamento do sítio de inserção do Tn5.

Tabela 4 - Ensaio de atividade de  $\beta$ -galactosidase da fusão *cspC/lacZ* em alguns clones da biblioteca.

<b>Mutantes</b>	<b>Unidades</b>
Controle +	10538 $\pm$ 112
Controle -	5832 $\pm$ 80
<u>3/9E</u>	1218 $\pm$ 192
2/5E	1476 $\pm$ 18
1/9F	1246 $\pm$ 3
<u>3/5D</u>	1559 $\pm$ 429
5/12C	1168 $\pm$ 89
<u>5/2G</u>	1271 $\pm$ 143
1/1H	1367 $\pm$ 296
1/1F	1131 $\pm$ 136
<u>1/9E</u>	1629 $\pm$ 36
<u>5/4E</u>	1113 $\pm$ 226
<u>5/12D</u>	1053 $\pm$ 14
5/3F	784 $\pm$ 82
5/3G	1010 $\pm$ 49
<u>12/5F</u>	723 $\pm$ 175
4/9H	1762 $\pm$ 230

Nesta tabela estão apresentados os resultados dos mutantes da biblioteca que mostraram atividade menor que o controle positivo. Os clones sublinhados são os que foram sequenciados. Os valores são expressos em unidades Miller, e representam a média de três ensaios e seu desvio-padrão.

#### 4.1.1. Identificação dos genes interrompidos

Para identificar o gene interrompido em cada linhagem mutante e determinar o sítio de inserção do Tn5, duas técnicas foram utilizadas: clonagem direta e PCR reverso. Através da técnica de clonagem direta, onde os DNAs cromossomais são digeridos com a enzima Sall e posteriormente ligados no vetor pUCBM21, não foi possível identificar nenhum gene. Três clones (5/12D 2/5E e um dos clones com menor indução enzimática, o 5/3G) foram clonados no vetor pUCBM21 e tentativas de sequenciamento foram feitas. Entretanto, o sequenciamento destes clones com os oligonucleotídeos “Forward” e “Reverse” do vetor de clonagem pUCBM21 ou com oligonucleotídeo R3, não permitiu localizar a IR do Tn5. Desta forma, outra estratégia, a de PCR reverso descrito por Brun e Shapiro em 1992, foi utilizada.

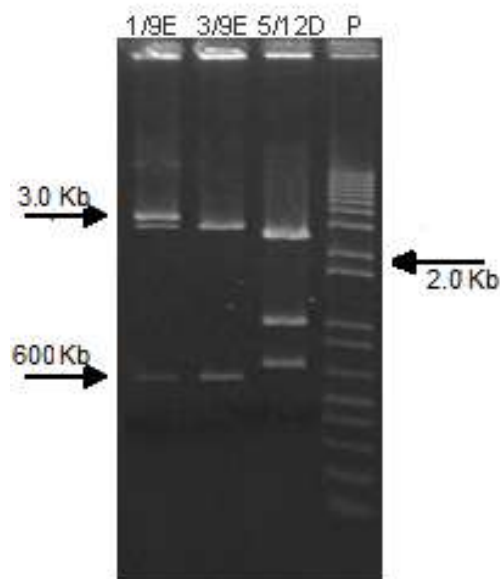
Neste método a enzima para digerir o DNA cromossomal de cada clone selecionado foi a PstI, que apresenta 3 sítios de restrição no Tn5 (um na parte central do transposon e os outros estão um em cada IR) e sítios ao longo do genoma de *C. crescentus*. Após a digestão, estes fragmentos foram ligados em reações contendo uma concentração baixa de DNA, facilitando assim, a circularização dos fragmentos. Através dos oligonucleotídeos R3 e L7 (que hibridizam nas IR), estas ligações foram utilizadas para realizar a reação de PCR com a finalidade de amplificar parte do gene onde o transposon foi inserido. Devido ao oligonucleotídeo R3 encontrar-se a 80 pb do final das IR e o L7 a 450 pb do sítio de PstI das IR, o tamanho das bandas amplificadas não poderia ser menor que 530 pb. Este método possibilitou a identificação de sete clones (Tabela 5). Nos mutantes 5/3F, 1/1F e 4/9H, os DNAs não foram amplificados, mesmo após três tentativas alterando as concentrações de DNA e condições da reação de PCR.



**Tabela 5** - Identificação dos genes interrompidos nos mutantes da biblioteca sequenciados.

<b>Mutante</b>	<b>ORF</b>	<b>ORF</b>	<b>Produto provável</b>
1/9E	CCNA 03569	CC 3456	Proteína hipotética
3/9E	CCNA 02510	CC 2428	Deacetilase de oligossacarídeos
1/1H	CCNA 01594	CC 1526	Metiltransferase da proteína ribossomal L11
5/4E	CCNA 02186	CC 2101	Pequena subunidade da acetato lactato sintase
5/2G	CCNA 00084	CC 0086	Fosforibosil aminoimidazol carboxamida formiltransferase/ IMP ciclohidrase
12/5F	CCNA 03616	CC 3501	Sulfito redutase dependente de NADPH
3/5D	CCNA 01448	CC 1384	Frutose-1,6-bisfosfatase

**Figura 7** - Eletroforese em gel de agarose contendo as digestões das minipreparações de DNA plasmidial de três mutantes da biblioteca selecionados para seqüenciamento.



Os plasmídeos foram digeridos com PstI nos clones 1/9E e 3/9E, e com SalI no clone 5/12D. Na primeira e na segunda canaleta estão os plasmídeos dos clones 1/9E e 3/9E, (a banda de 3,0kb corresponde ao pGEM e as outras aos fragmentos clonados e seqüenciados). A terceira canaleta contém o plasmídeo do clone 5/12D (a banda de 2.5 kb corresponde ao vetor pUCBM21 e as bandas menores correspondem ao fragmento clonado). A última canaleta corresponde ao marcador de peso molecular o 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen).

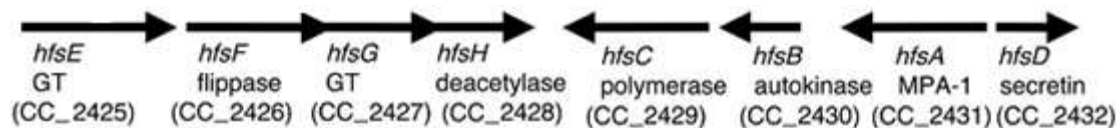
### **Mutante 1/9E**

O clone 1/9E tem o Tn5 inserido no gene cujo produto é uma proteína hipotética com dois domínios, um de função desconhecida e um domínio rico em glicina, e os genes adjacentes também possuem como produto proteínas hipotéticas.

### **Mutante 3/9E**

O clone 3/9E tem o Tn5 inserido no gene *hfsH* que é parte do operon *hfsEFGH*, e participa da biossíntese do *holdfast* junto com os outros componentes do operon. Este operon está adjacente ao operon de genes responsáveis por exportar o *holdfast*. O *holdfast* é uma adesina polar que facilita a *C. crescentus* se aderir a superfícies abióticas e bióticas e também, em conjunto com o flagelo e o pili, permite a formação de biofilmes nesta bactéria.

**Figura 8** - Organização do operon *hfsEFGH* e do o operon adjacente *hfsABCD*.



O gene *hfsH* foi interrompido pelo Tn5 no clone 3/9E. As setas indicam a direção da transcrição de cada gene.

FONTE: TOH et al., 2008

Através de análises fenotípicas, foi observado que *hfsG* e *hfsH* possuem um papel crucial na adesão a superfícies e na biossíntese do *holdfast* (TOH et al., 2008). Como até o momento não foi relatado nenhuma ligação entre CSPs e adesão a superfície, ou até mesmo formação de biofilme, não é possível fazer qualquer tipo de associação sobre a mutação neste gene e a regulação de *cspC*.

### Mutante 5/4E

No clone 5/4E, está interrompido o gene que codifica uma pequena subunidade da acetato lactato sintase, que sintetiza aminoácidos como isoleucina, valina e leucina. Pode-se especular que a carência destes aminoácidos, ou talvez carência de aminoácidos em geral seja uma sinalização para a ativação de *cspC*. Interessantemente, este mutante também apresentou menor expressão de *cspD* (SILVA et al., 2010), sendo possível que este gene participe de uma mesma via de ativação entre *cspC* e *cspD*.

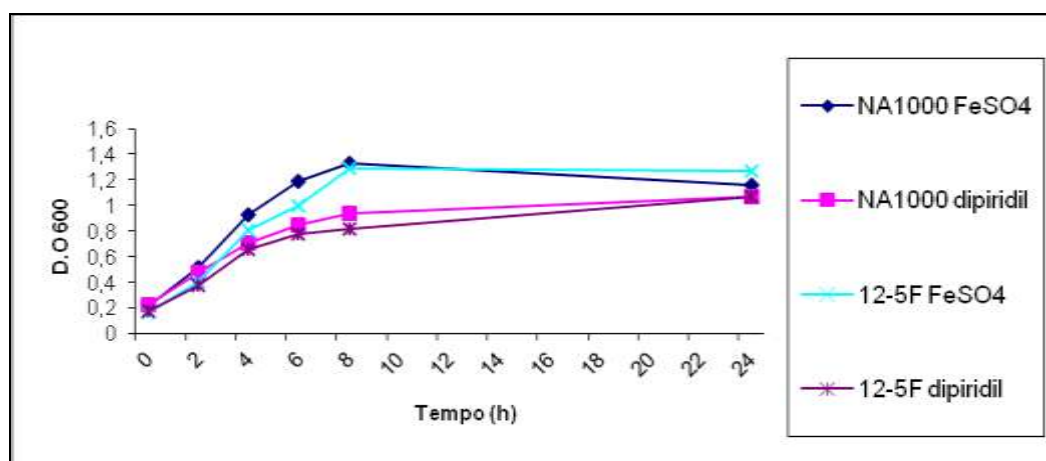
### Mutante 5/2G

O mutante 5/2G tem o Tn5 inserido no gene *purH* que codifica a proteína fosforibosil aminoimidazol carboxamida formiltransferase. Em *C. crescentus*, *purH* participa de diversa vias metabólicas, como o metabolismo de purinas, biossíntese de metabólitos, co-fatores e vitaminas. Com tantas possibilidades, não fica claro o papel de *purH* quanto a regulação de *cspC*, embora esteja envolvido na biossíntese de precursores para a célula.

### Mutante 12/5F

O clone com menor indução da atividade enzimática da biblioteca (Tabela 4), 12/5F, tem o Tn5 interrompendo o gene que codifica uma NADPH- sulfito redutase. NADPH-sulfito redutase (*SiR*) de *Escherichia coli* e de *Salmonella typhimurium* catalisa a redução de sulfito para sulfeto e é necessária para a síntese de L-cisteína. A enzima nativa tem uma estrutura de subunidades  $\alpha_8\beta_4$ , onde  $\alpha_8$  é uma flavoproteína (Sir-FP), contendo tanto um dinucleotídeo flavina-adenina como um mononucleotídeo flavina e  $\beta_4$  é uma hemoproteína (Sir-HP), que inclui um centro de  $Fe_4S_4$  e uma única molécula de siroheme (WU, SIEGEL, KREDICH, 1991). NADPH-sulfito redutase esta envolvida na homeostase de ferro em *Salmonella entérica*, tendo um efeito indireto no estresse oxidativo (THORGERSEN, DOWNS, 2009). Com base nestes dados, tentamos identificar se há relação entre o clone 12-5F e a homeostase de ferro em *C. crescentus*. Foi realizada uma medida de crescimento do mutante 12/5F em meio de cultura contendo 2,2-dipiridil para 0,1 mM (quelante de ferro) ou de sulfato ferroso para 0,1 mM. As culturas foram previamente diluídas para  $DO_{600}$  0,5, e neste momento os agentes foram adicionados. Como verificado na figura 9, não foram observadas diferenças no crescimento da linhagem selvagem (NA1000) e do mutante testado. Sendo assim, não foi encontrada nenhuma relação aparente entre o mutante 12/5F e a homeostase de ferro. Talvez seu papel na biossíntese de cisteína possa ter algum efeito sobre a expressão de *cspC*.

**Figura 9** - Curva de crescimento em meio PYE.



A linhagem NA1000 foi cultivada em meio PYE líquido, enquanto a linhagem mutante 12/5F foi cultivada em meio PYE líquido acrescido de canamicina. O crescimento foi avaliado através do monitoramento da densidade óptica das culturas a 600 nm ( $DO_{600}$ ) nos pontos indicados. A cada cultura foram adicionados sulfato ferroso para 0,1 mM ou 2,2- dipiridil para 0,1 mM como indicado.

### Mutante 1/1H

O mutante 1/1H tem o Tn5 inserido no gene *prmA*, e o produto deste é uma metiltransferase, que em *E. coli* é responsável por metilar a proteína ribossomal L11 (POLEVODA, SHERMAN, 2007). A metilação é uma das modificações mais comuns encontradas em proteínas, e tanto em procariotos como em eucariotos, muitas proteínas ribossomais são metiladas. Aparentemente a metilação de proteínas ribossomais modula interações inter e intramoleculares de proteínas-alvo ou afetam a afinidade por RNA. Deste modo, influencia em vários processos celulares, incluindo regulação transcricional, processamento de RNA, montagem do ribossomo, precisão da tradução, metabolismo e sinalização celular (POLEVODA, SHERMAN, 2007). O gene *prmA* é ubíquo e altamente conservado em bactérias, e o processo de metilação exercido pelo seu produto exige um grande gasto energético, sugerindo ter uma importante função ribossomal (CAMERON et al., 2004). Pode-se esperar que esta metilação afete a função de L11, entretanto, mutantes *prmA* são fenotipicamente idênticos às linhagens selvagens, sendo PrmA dispensável em *E. coli* e *Thermus thermophilus*. Demirci et al. (2007) sugerem que o papel da metilação na L11 pode ser modular a translocação, ou participar de alguma forma na exatidão de tradução ou função ribossomal, tal como a decodificação. Entretanto, relata que o efeito de metilação pode ser detectado apenas através de cautelosa análise cinética *in vitro* ou em combinação com outra mutação na L11 ou em outra proteína ou componente envolvido na tradução.

PrmA de *E. coli* mostrou 57% de semelhança com a sequência de aminoácidos da orf35 de *Staphylococcus aureus*, também presente no operon *dnaK* de *Bacillus subtilis*. Esta ORF foi considerada como uma “heat shock protein” em *S. aureus* devido ao aumento da expressão deste gene quando as células eram colocadas sob estresse de 37 °C para 46 °C (OHTA et al., 1994; HOMUTH et al., 1997). Estudos recentes mostraram que esta ORF corresponde ao gene *prmA* e também foi identificado que este faz parte de um locus de proteção contra múltiplos estresses, incluindo estresse oxidativo, choque de calor e antibióticos (SINGH et al., 2007).

Em linhagens de *Bacillus subtilis* resistentes a tiostrepton devido a perda da proteína ribossomal L11, foi demonstrado que *sigB*, sigma de resposta a geral a estresse, é bloqueado na resposta a estresses (ZHANG; SCOTT; HALDENWANGHANG, 2001). Em *E. coli*, L11 é conhecida por se ligar diretamente ao rRNA 23S. O mutante no gene *rlpK*, que codifica a proteína ribossomal L11 em *E. coli*, não consegue ativar a

síntese de ppGpp via RelA, exibindo um fenótipo relaxado. Yang e Ishiguro (2001) propuseram que L11 regula indiretamente a ativação de RelA por meio do domínio N-terminal através de construção e análise de um mutante em L11 resistente ao antibiótico tiosstrepton que apresenta uma substituição em um resíduo de aminoácido do domínio N-terminal. Tendo em vista estes resultados, bem como o fato de que *cspC* é um gene importante para a sobrevivência em fase estacionária e já foi demonstrado que é induzido na carência de glicose (BALHESTEROS, 2009), poderíamos especular que a diminuição da expressão de *cspC* no mutante 1/1H estaria relacionada com a diminuição da síntese de ppGpp. Porém, em *C. crescentus* não foi identificada nenhuma alteração na expressão de *cspC* na ausência do único gene que sintetiza ppGpp (*spoT*) (SILVA et al., 2010). No entanto, com base em todas as observações feitas sobre o clone 1/1H, o que se pode especular é que uma possível diminuição da função ribossomal tenha efeito sobre a expressão de *cspC*.

### **Mutante 3/5D**

O mutante 3/5D tem o Tn5 interrompendo o gene *glpX*, que codifica a frutose 1,6-bifosfatase II (FBPase II), enzima que converte frutose 1,6-bisfosfato em frutose-6-fosfato e fosfato inorgânico. Em *E. coli* *glpX* é terceiro gene do operon *glpFKX*, que codifica uma enzima que parece ser redundante com FBPase I, codificada por *fbp*. No entanto, mutantes *glpX* não possuem fenótipo aparente, enquanto mutantes *fbp* não crescem em presença de substratos gliconogênicos como única fonte de carbono, indicando que a função GlpX é insuficiente para compensar a falta de *fbp* nestas condições (COL, 2004). Análises por Western blotting em *E. coli* usando anticorpos policlonais anti-GlpX revelou que os níveis de GlpX aumentaram em culturas cultivadas com apenas glicerol como fonte de carbono em comparação com os níveis de culturas cultivadas com maltose ou glicose (glicerol > maltose > glicose) (COL, 2004). Em *Caulobacter crescentus*, ortólogos de *glpX* e *fbp* são adjacentes e transcritos na mesma direção (CC1384 e CC1385, respectivamente), onde *glpX* é o primeiro gene. O espaço intergênico entre *glpX* e *fbp* é de 28 nucleotídeos, sugerindo que estes dois genes podem constituir um operon. Não está claro por que esses dois genes estão presentes em conjunto neste organismo, mas pode significar que os dois produtos de genes funcionam como FBPases, em conjunto ou individualmente (COL, 2004). A repressão catabólica gerada por glicose em *E. coli* inclui a repressão da expressão do operon *glp* (ISHIZUKA

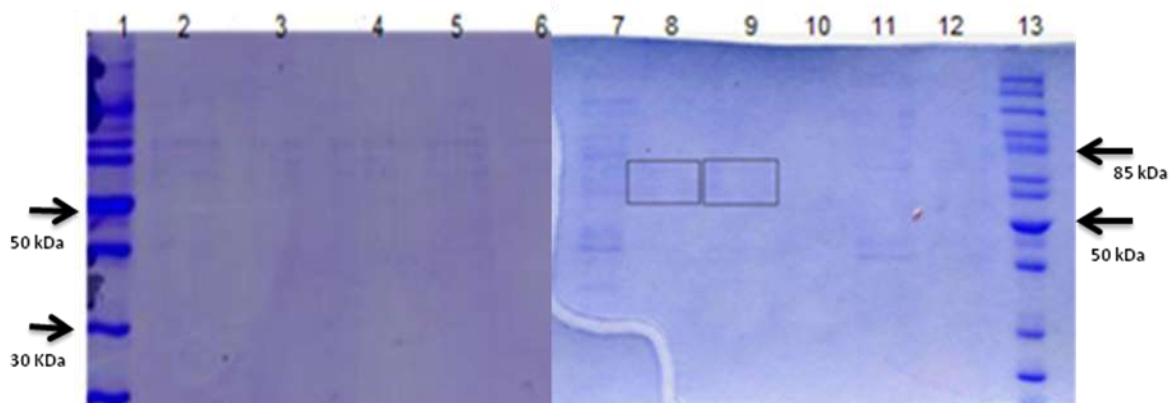
et al., 1994). Resultados anteriores do nosso grupo demonstram que glicose reprime a expressão de *cspC* (BALHESTEROS, 2009), sugerindo que uma alteração no metabolismo de glicose neste mutante, possa afetar a expressão de *cspC*.

#### **4.4.1 Purificação de proteínas que ligam ao promotor de *cspC***

Uma nova abordagem foi iniciada para buscar e identificar fatores de transcrição diretamente envolvidos na regulação de *cspC*. A técnica empregada utiliza uma cromatografia de afinidade, onde fragmentos biotinilados contendo a região promotora de *cspC* foram acoplados a resina de estreptavidina (GABRIELSEN, HUET, 1993). As proteínas purificadas por este método foram separadas por eletroforese em gel de poli(acrilamida)-SDS a 10%, 12% ou 15%. Nos primeiros ensaios realizados visualizávamos duas bandas, de 60 e 70 kDa, que se repetiam em todas as ligações (Fig. 10 gel à esquerda), entretanto, aparentemente uma delas também se repetia no lavado (Fig. 10 gel à direita), podendo ser uma proteína com altos níveis basais celulares e devido a sua alta concentração estaria tendo uma ligação inespecífica à resina. Novos ensaios foram realizados com diferentes concentrações de NaCl nos tampões de ligação e lavagem e testamos também concentrações diferentes de DNA, proteínas e resina. As concentrações testadas estão descritas na tabela 6 e figura 10. Foram feitas várias ligações, sendo que além do lavado, foi utilizado mais um controle, uma ligação sem o DNA, contendo apenas a resina e o extrato de proteínas. Mesmo após vários testes onde aumentávamos a quantidade de DNA ou a de resina ou de proteínas, o que visualizávamos era que as mesmas bandas que estavam presentes nas ligações contendo DNA, se repetiam nas ligações sem o DNA, como pode ser verificado na figura 11. Sendo assim, consideramos que as proteínas que estavam ligando eram inespecíficas. Adicionalmente, as concentrações de proteínas que se ligavam ao DNA eram insuficientes para recuperar as bandas do gel para posterior análise em espectroscopia de massa.

**Figura 10** - Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS das proteínas que ligaram ao promotor de *cspC*.

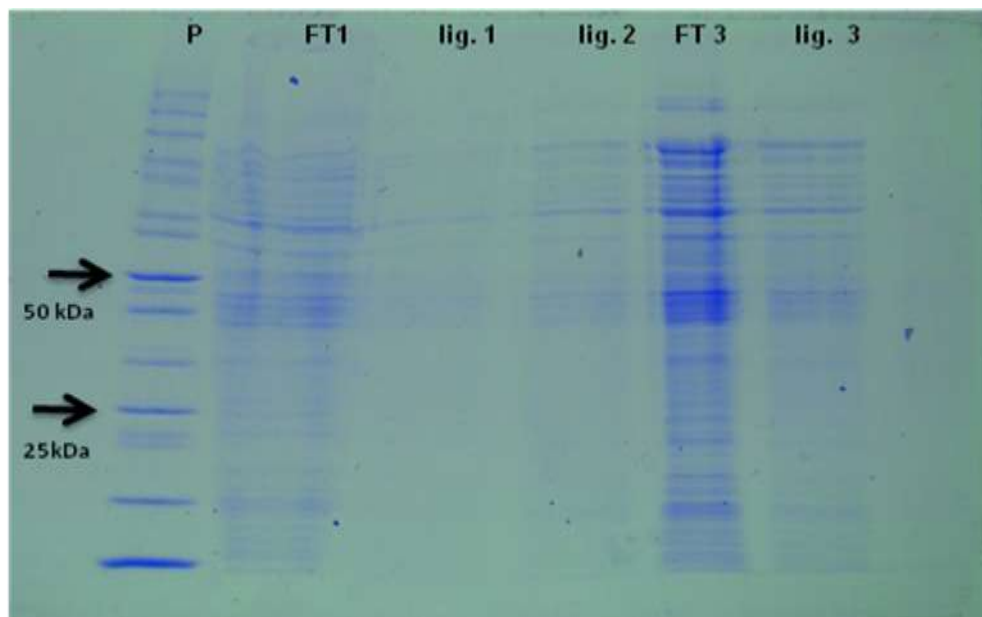
Canaletas	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ligação com NaCl	100 mM	300 mM	400 mM	300 mM	400 mM	50 mM	300 mM	400 mM	FT 7	FT 8	FT9
Eluição com NaCl	1 M	1 M	1 M	1 M	1 M	400 mM	800 mM	1 M			



O quadro descreve um resumo das concentrações de NaCl utilizadas nas ligações e eluições das canaletas dos géis abaixo. Gel da esquerda: poliacrilamida-SDS a 12%, canaleta 1 corresponde ao peso molecular. As canaletas 2, 3 e 4 correspondem as ligações do DNA biotilado acoplado a resina com o extrato de proteínas (1). As canaletas 5 e 6 correspondem às ligações com o extrato de proteínas (2). As canaletas de 7 a 13 estão em um gel poliacrilamida-SDS a 10%. As canaletas 7, 8, e 9 contêm as ligações com extrato de proteínas (3). As canaletas 10,11 e 12 correspondem ao volume remanescente das ligações (FT) 7, 8 e 9 respectivamente. A canaleta 13 corresponde ao peso molecular. As bandas que se repetem em concentrações diferentes estão destacadas. O ensaio foi reproduzido três vezes com extratos de proteínas de dias diferentes (extrato de proteínas 1, 2 e 3).



**Figura 11** - Eletroforese em gel de poliacrilamida-SDS com duas concentrações diferentes de poliacrilamida.



A parte superior do gel é poliacrilamida-SDS a 12% e a parte inferior é SDS a poliacrilamida-15%; P corresponde ao peso molecular e o volume remanescente das ligações descrito como FT. As ligações e as eluições foram feitas com 300 mM e 1M de NaCl, respectivamente. A descrição contendo o resumo das concentrações de DNA, proteínas e resina utilizados nas ligações (1, 2 e 3) constam na tabela 6.

**Tabela 6** - Concentrações de DNA, proteínas e resina utilizados no ensaio de ligação

	Ligação 1	Ligação 2	Ligação 3
<b>DNA</b>	—	10 µg	10 µg
<b>Proteínas</b>	200 µg	1 mg	3 mg
<b>resina</b>	5 µg	50 µg	50 µg

Massa de cada componente utilizado no ensaio para ligar o DNA biotilado acoplado à resina com os extratos de proteínas mostrado no gel da Figura 11.

#### 4.2. Autoregulação de *cspC* e o envolvimento de fatores sigmas na expressão de *cspC*

Deleções sucessivas da região regulatória de *cspC* demonstraram a importância das regiões descritas na figura 5 (*P<sub>cspC</sub>/lacZ*, *P<sub>H2</sub>/lacZ*, e *P<sub>H3</sub>/lacZ*) (BALHESTEROS, 2009). Foi identificada uma possível região regulatória do gene *cspC* com duas repetições diretas imperfeitas, similar a uma sequência encontrada na região regulatória de *cspD*. Esta região está ausente na construção de *P<sub>H2</sub>/lacZ*, e é necessária para os máximos níveis de expressão de *cspC*. Apesar de *P<sub>H2</sub>/lacZ* não possuir esta região ativadora, ainda assim há indução de *cspC* na fase estacionária, embora os níveis sejam menores do que na construção *P<sub>cspC</sub>/lacZ*. A construção *P<sub>H3</sub>/lacZ*, que não possui a região promotora e a possível região ativadora de *cspC*, ainda apresenta uma pequena indução na fase estacionária, da ordem de 1,7 vezes a expressão em fase exponencial (BALHESTEROS, 2009). Esta construção deve estar expressando o gene *lacZ* por um promotor do plasmídeo, mas a indução na fase estacionária pode ser devida a um efeito sobre o mRNA. Como não identificamos um regulador com envolvimento direto na regulação de *cspC*, analisamos a possibilidade de ocorrer uma regulação pós-transcricional por meio de sua autoregulação. Realizamos ensaios de  $\beta$ -galactosidase, onde culturas da linhagem NA1000 *pcspC/lacZ* e do mutante  $\Delta C$  *pcspC/lacZ* foram incubadas a 30 °C até a  $DO_{600}$  0,5. Neste ponto foi realizado o primeiro ensaio da atividade de  $\beta$ -galactosidase e o ensaio foi repetido depois de 24 e 48 horas de crescimento. Foi verificado que *cspC* de *Caulobacter crescentus* sofre uma autoregulação positiva, necessária para os máximos níveis de expressão do gene, e este evento poderia ocorrer através de estabilização de seu próprio mRNA (Fig. 12).

Além da eficiência na transcrição e na tradução, o nível de expressão de um gene pode ser afetado por estabilização do mRNA, sendo que a regulação da degradação do mRNA pode ser uma eficiente resposta às mudanças nas condições de crescimento. A estabilidade metabólica do mRNA de uma bactéria é definida por meio de sua meia vida na célula. A meia vida de mRNA de bactérias é bem curta comparando com a meia vida do mRNA de eucariotos: em média em bactérias pode variar de 0,5 a 50 minutos, já em eucariotos chegar a 15 horas (GRUNBERG-MANAGO, 1999).

Um ensaio preliminar foi realizado para confirmar a hipótese de que CspC estabiliza o seu próprio mRNA. Primeiramente culturas de células de NA1000 e do mutante  $\Delta C$  contendo a fusão de transcrição de *cspC* em fase estacionária foram coletadas

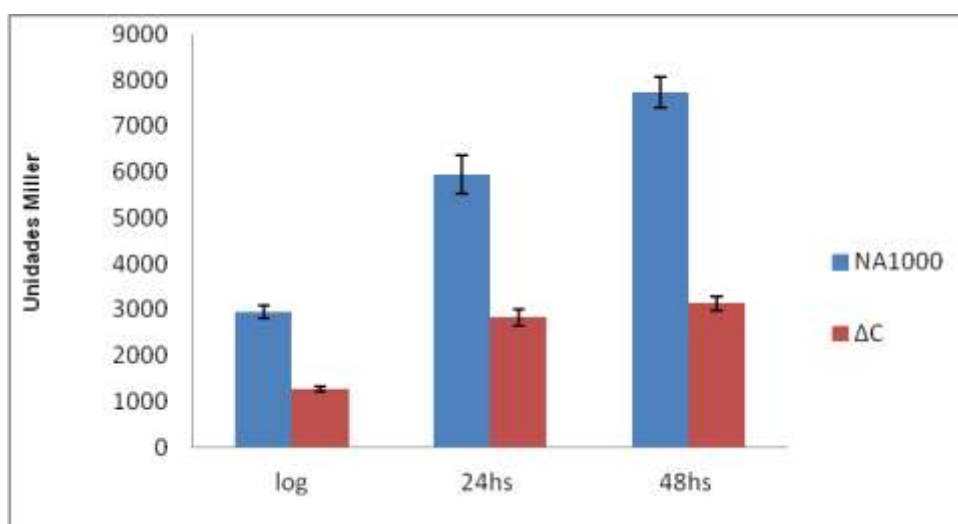
e divididas em cinco alíquotas. Foram adicionados 20 µg/ml de rifampicina, de modo que a transcrição fosse interrompida, e o RNA total foi extraído em vários tempos após a adição. Posteriormente o RNA total destas células foi convertido a cDNA e este foi utilizado em uma reação de PCR com os iniciadores amplificando o gene *lacZ*. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e, como é observado na Figura 13, as curvas de decaimento da meia vida do mRNA no mutante *cspC* e na linhagem NA1000 estão muito similares. Apesar dos pontos a partir de 2 minutos apresentarem uma pequena queda no mutante *cspC*, ainda não se pode concluir se ocorre ou não uma estabilização do mRNA de *cspC* pela proteína CspC. Fang e colaboradores, 1997 mostraram que em *E. coli*, o mRNA de *cspA* apresenta uma meia vida ( $t_{1/2}$ , < 12 segundos) a 37 °C e sua estabilização aumenta drasticamente, após a queda da temperatura para 15 °C ( $t_{1/2}$ , > 20 minutos), sendo estes processos são provocados pela região 5'UTR de *cspA*. CspA é responsável por desestabilizar o seu próprio mRNA durante e após a fase de aclimatização (BAE; JONES; INOUE, 1997).

Observou-se que provavelmente uma parte da regulação de *cspC* ocorre via estabilização do seu próprio mRNA, (Fig. 12) porém, o aumento de sua expressão na fase estacionária continua ocorrendo, sugerindo que outro fator ou fatores poderiam estar envolvidos na regulação de *cspC*. A produção de proteínas importantes para adaptação a longos períodos de carência nutricional deve ocorrer enquanto a célula é capaz de uma expressão gênica robusta (SCHELLHORN et al., 1998), e esta afirmativa corrobora a alta transcrição de *cspC* que já acontece durante a fase exponencial. Alguns dos genes regulados por em *E. coli* demonstraram adotar o mesmo padrão de expressão (SCHELLORN et al., 1998). Um sigma equivalente ao  $\sigma^S$  de *E. coli* ainda não foi encontrado em  $\alpha$ -proteobactérias, porém SigT e SigU recentemente foram demonstrados serem importantes para a resposta geral a estresses em *C. crescentus*, nesta fase SigT é ativo sob diversas condições de estresse como: estresse osmótico, exposição a cromo, crescimento em meio mínimo e durante a entrada na fase estacionária, e SigU também contribui, mas de uma forma mais restrita, para a ativação da expressão de genes relacionados à resposta geral a estresses (LOURENÇO et al., 2011).

Com base nestes dados e considerando que o promotor de *cspC* é responsável por um maior nível de expressão do gene na fase estacionária (2,5 vezes em 24 horas) (BALHESTEROS, 2009), esta indução poderia estar ocorrendo pela ligação de um fator sigma a este promotor. Selecionamos fatores sigmas com base na similaridade entre o promotor de *cspC* e as regiões consensos. Testamos os sigmas ECF, SigT, SigU e SigJ,

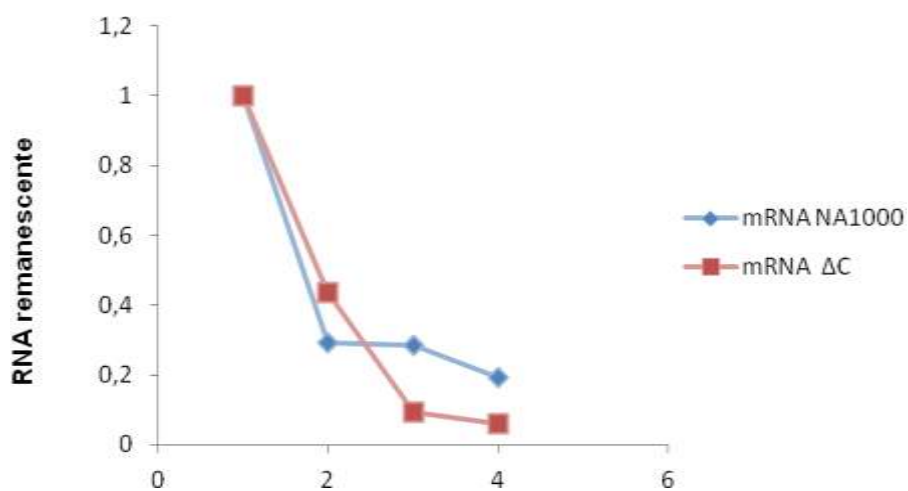
sendo que este último também é de fase estacionária (comunicação pessoal Dra. SUELY GOMES). A fusão *cspC/lacZ* foi inserida nas linhagens mutantes destes sigmas via conjugação. Foram feitos ensaios de atividade de  $\beta$ -galactosidase na  $DO_{600} = 0,5$ , e depois os ensaios foram repetidos em 24 e 48 horas de crescimento. Os resultados (Fig. 14a e 14b) apontam que a expressão de *cspC* não foi afetada nos mutantes Sigma T e Sigma U, porém diferente do esperado, no mutante Sigma J a expressão de *cspC* aumenta na fase estacionária. Esta regulação provavelmente é indireta, já que fatores sigmas não atuam como repressores, e deve ocorrer por meio de outro repressor regulado por SigJ. Outra hipótese seria de SigJ competir com um fator sigma importante para a ativação de *cspC*, e na ausência de SigJ em fase estacionária, este fator sigma seria favorecida na competição pelo cerne da polimerase, aumentando assim a expressão de *cspC*.

**Figura 12** - Ensaio da expressão de *cspC* no mutante  $\Delta C$ .



Culturas de NA1000 e culturas do mutante  $\Delta C$  carregando o plasmídeo *PcspC/lacZ* foram incubadas em meio PYE/tetraciclina pelos tempos indicados. A expressão foi avaliada por ensaios de  $\beta$ -galactosidase. Os valores representam a média de medidas com três replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam o desvio padrão.

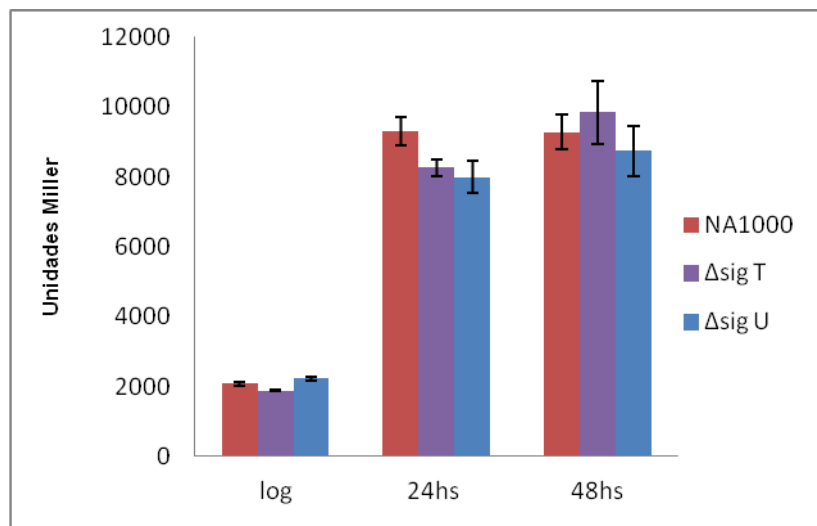
**Figura 13** - Grafico representativo do ensaio para avaliar a estabilidade do mRNA de *cspC* na fase estacionária.



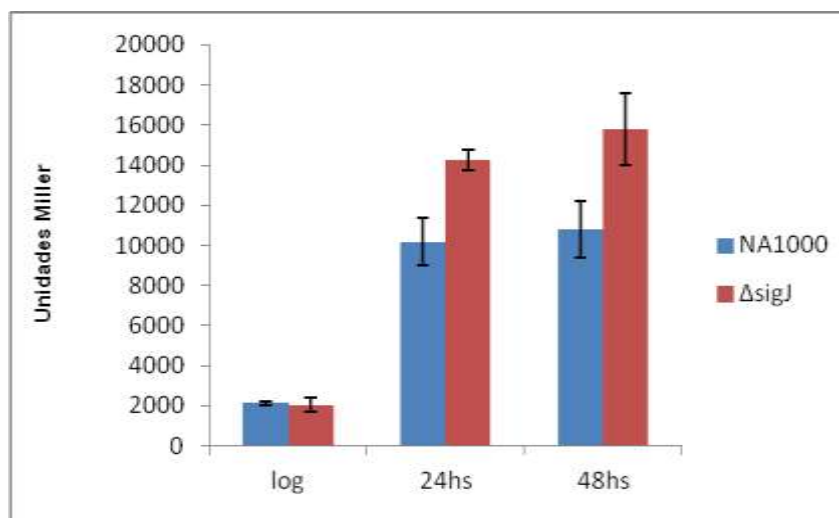
Células de NA1000 e do mutante  $\Delta C$  contendo a fusão de *cspC/lacZ* foram incubadas em meio PYE até o meio da fase exponencial. No ponto 0' a rifampicina não foi adicionada, e os pontos 2', 4' e 6' correspondem aos tempos após a adição de rifampicina.

**Figura 14** - Ensaio da expressão de *cspC* nos mutantes (A)  $\Delta sigT$  e  $\Delta sigU$ , e em (B) no mutante  $\Delta sigJ$ .

(A)



(B)



Culturas de NA1000 e dos mutantes contendo o plasmídeo pRKlacZ290 com o promotor *cspC* foram incubadas em meio PYE/tetraciclina pelos tempos indicados. A expressão foi avaliada por ensaios de  $\beta$ -galactosidase. Os valores representam a média de medidas com três replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam o desvio padrão.

#### 4.3. Ensaio de expressão em meio condicionado

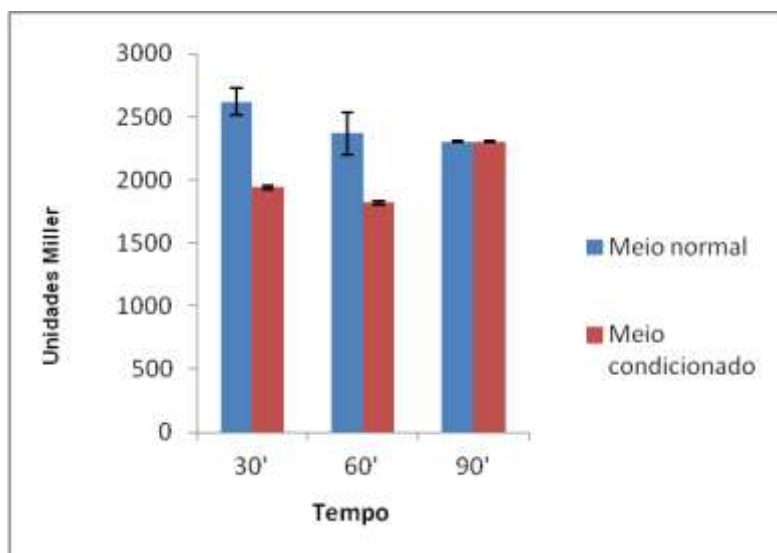
O termo *quorum sensing* é caracterizado pela capacidade das bactérias se comunicarem, e determinarem sua densidade populacional, através da produção e

liberação de pequenas moléculas sinalizadoras denominadas autoindutores. À medida que a população alcança uma alta densidade populacional, o aumento da concentração do autoindutor no meio leva a várias respostas nas bactérias, através da alteração da expressão de diferentes genes (GONZALEZ, KESHAVAN, 2006). Pelo fato de *cspC* e *cspD* se tratarem de genes induzidos na fase estacionária e vários estudos terem mostrado que uma série de genes ativados nesta fase são regulados via *quorum sensing*, um meio de cultura de células da linhagem NA1000 em fase exponencial foi substituído por um meio condicionado (meio de uma cultura de *C. crescentus* incubada por 24hs a 30 °C) com o intuito de observar se algum componente do meio (um provável autoindutor) seria o sinal para a ativação da expressão dos genes *cspC* e *cspD*.

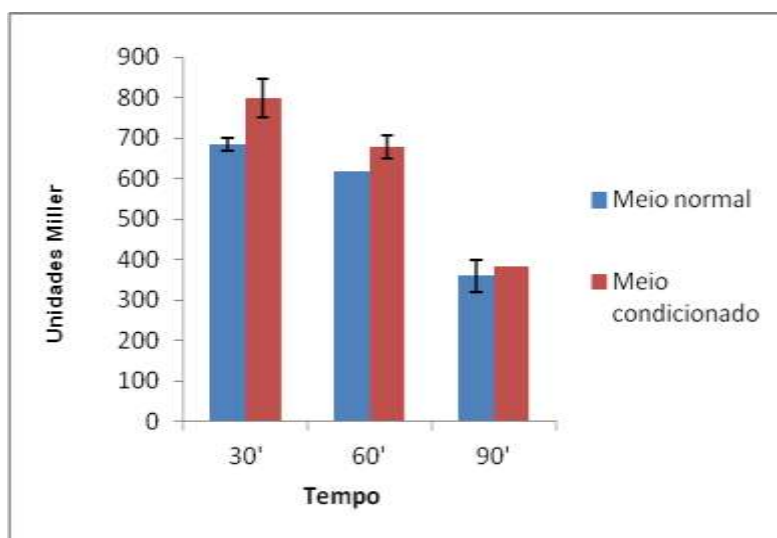
A figura 15a aponta uma queda na indução de *cspC* e na figura 15b há um pequeno aumento da indução de *cspD*. Porém estes valores não são equiparáveis, aos resultados obtidos no trabalho de Subsin *et al.*, 2007. Este trabalho identificou genes regulados por *quorum sensing* em *Burkholderia cenocepacia*, uma bactéria patogênica oportunista, e os autores apresentam como parâmetro significativo uma indução maior que cinco vezes. Deste modo, os resultados apresentados nas figuras 15a e 15b mostram que tanto *cspD* quanto *cspC* não são provavelmente induzidos via *quorum sensing* em *C. crescentus*.

**Figura 15** - Ensaio de expressão de *cspC* e *cspD* em meio condicionado.

(A)



(B)



(A): Culturas de NA1000 carregando o plasmídeo *P<sub>cspC</sub>/lacZ* em meio PYE (normal) ou em meio condicionado. (B): Culturas de NA1000 carregando o plasmídeo *P<sub>cspD</sub>/lacZ* em meio PYE (normal) ou em meio condicionado. A expressão foi avaliada por ensaios de  $\beta$ -galactosidase. Os valores representam a média de medidas com três replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam o desvio padrão.



#### 4.4. O papel de *cspC* em diferentes condições de estresses

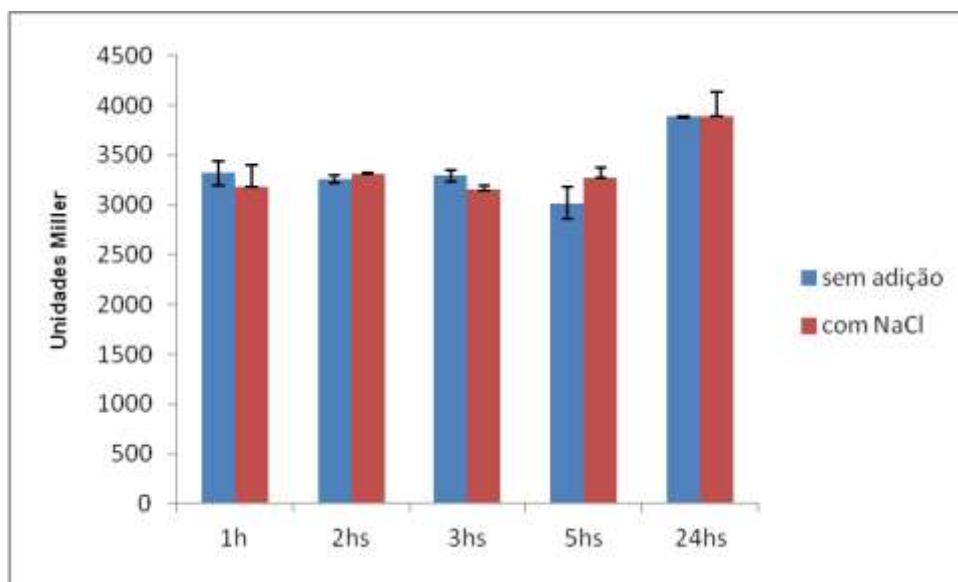
##### 4.4.1 Estudo do papel de *cspC* frente ao estresse osmótico

A membrana citoplasmática é altamente permeável a água, mas é responsável por gerar uma barreira efetiva contra a passagem de solutos presentes no meio; o efluxo de água e a perda de turgor celular são ocasionados pelo aumento da osmolaridade extracelular. Quando as bactérias são submetidas a estresse osmótico, respondem em três fases que se sobrepõem: desidratação (fase I), o ajuste da composição do solvente citoplasmática e reidratação (fase II) e remodelamento celular (fase III) (WOOD, 1999).

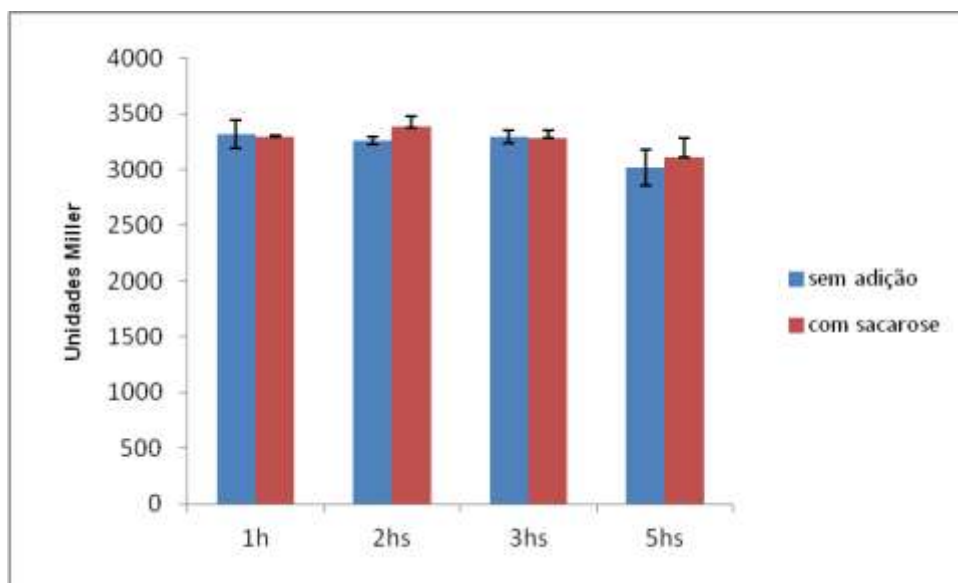
Considerando que *C. crescentus* é uma bactéria de vida livre e precisa enfrentar constantemente mudanças na osmolaridade, realizamos ensaios de expressão na linhagem selvagem (NA1000) na presença de NaCl 85 mM ou na presença de sacarose 150 mM. Também realizamos ensaios de viabilidade com a linhagem selvagem (NA1000) e o mutante *cspC* nestas mesmas condições, a fim de verificar se *cspC* estaria envolvido na adaptação ao estresse osmótico. Os resultados sugerem que a expressão de *cspC* e a resposta a estresse osmótico tanto na presença de NaCl quanto na presença de sacarose não foram significativamente afetadas, como mostra nas figuras 16 e 17. *Listeria monocytogenes* possui três CSPs, CspA, CspB e CspD e análises fenotípicas de mutantes permitiram identificar que estas CSPs apresentam um papel importante na adaptação a estresse osmótico por alta concentração de NaCl (SCHMID et, al., 2009). O mecanismo que as CSPs utilizam para contribuir para a adaptação a este estresse ainda não é conhecido. Uma possível explicação é que estas chaperones possam facilitar a transcrição e tradução de proteínas transportadoras de Na<sup>+</sup>, promovendo o aumento da produção destas proteínas e conseqüentemente o aumento da proteção das células de *L. monocytogenes* contra concentrações tóxicas de NaCl. Outra possibilidade é que as CSPs, por meio de atividade de chaperones de DNA, facilitem o reparo aos danos no DNA provocados pela alta concentração de NaCl (SCHMID et, al., 2009).

**Figura 16** - Ensaio de expressão de *cspC* na presença de NaCl 85 mM (A) ou na presença de sacarose 150 mM (B).

(A)



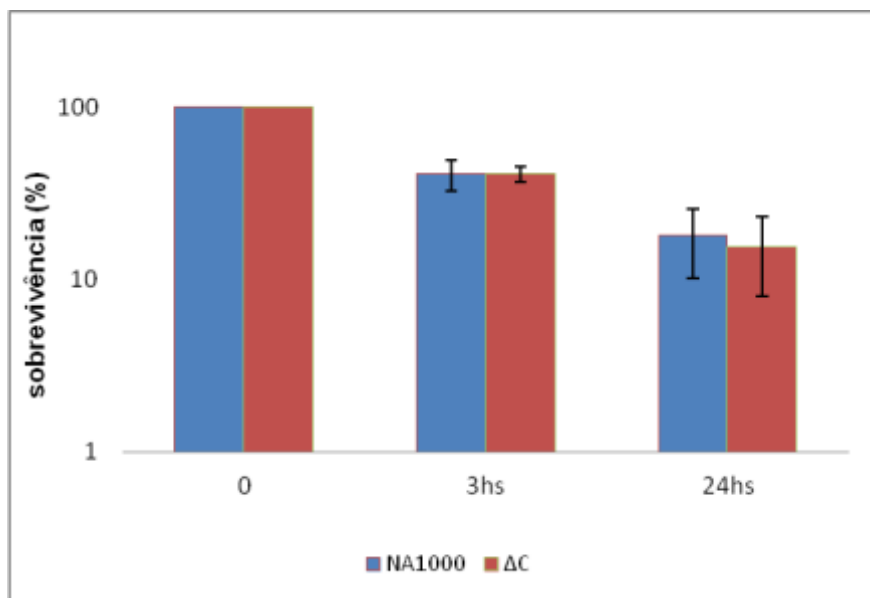
(B)



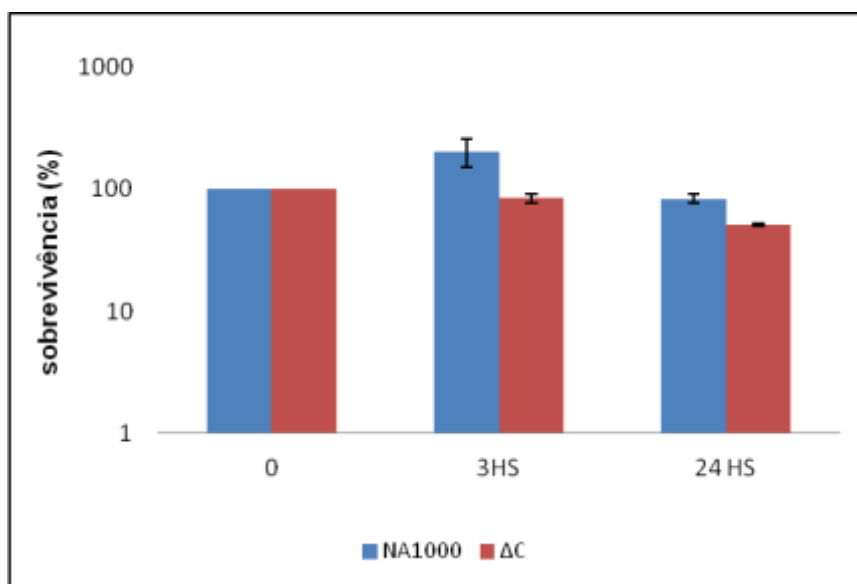
Culturas de NA1000 carregando o plasmídeo *PcspC/lacZ* foram ou não incubadas na presença dos específicos estresses. A expressão foi avaliada por ensaios de  $\beta$ -galactosidase. Os valores representam a média de medidas com duas replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam o desvio padrão.

**Figura 17** - Sobrevivência relativa das linhagens em meio PYE contendo NaCl (A) ou contendo sacarose (B)

(A)



(B)



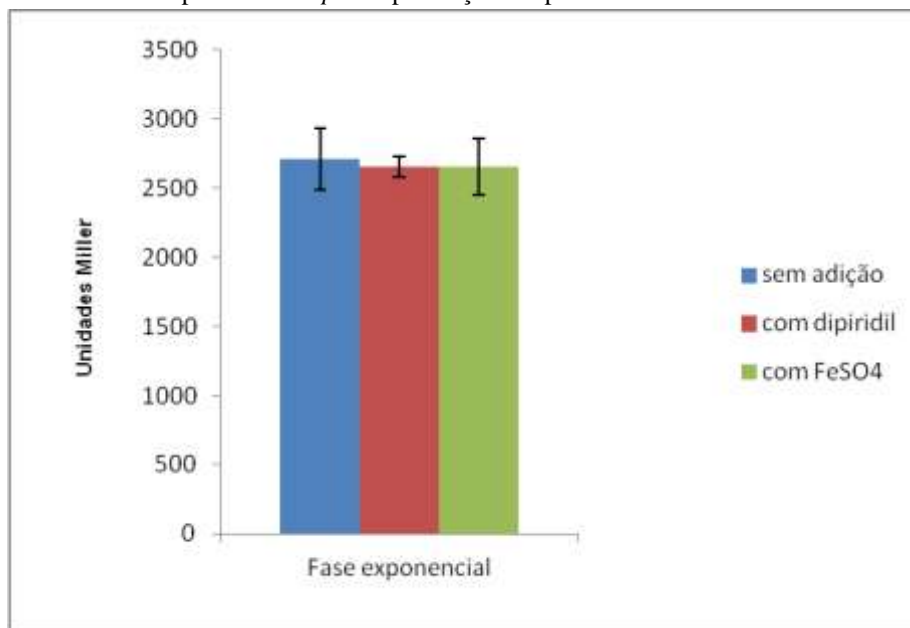
na linhagem NA1000 e no  $\Delta CspC$ . Nos pontos indicados, alíquotas foram removidas e plaqueadas para a contagem das colônias. A sobrevivência relativa foi determinada como sendo a razão entre o número de UFCs obtido e o número de UFCs inicial. Os valores representam a média de medidas com três replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam o desvio padrão.

#### 4.4.2. Expressão de *cspC* frente a homeostase de ferro

O mutante 12-5F, que foi identificado como tendo baixos níveis de expressão de *cspC*, tem o Tn5 interrompendo o gene cujo produto é uma sulfito redutase, e esta mesma enzima em *Salmonella entérica* é responsável pela homeostase de ferro (THORGERSEN, DOWNS, 2009). Há uma relação forte entre o metabolismo de ferro e estresse oxidativo, já que através de reação Fenton, ferro promove a formação de radicais hidroxilas que são altamente prejudiciais a todos componentes celulares. A alta concentração de ferro no meio intracelular é prejudicial à célula, produzindo espécies reativas de oxigênio (ROS) e conseqüentemente gerando estresse oxidativo. Deste modo, as bactérias utilizam um fator de transcrição denominado Fur (regulador de captação de ferro) responsável por regular negativamente muitos genes envolvidos na captação de ferro no meio ambiente. Em baixa concentração de ferro, a maioria dos genes regulados por *fur* são desreprimidos e são reprimidos em alta concentração de ferro

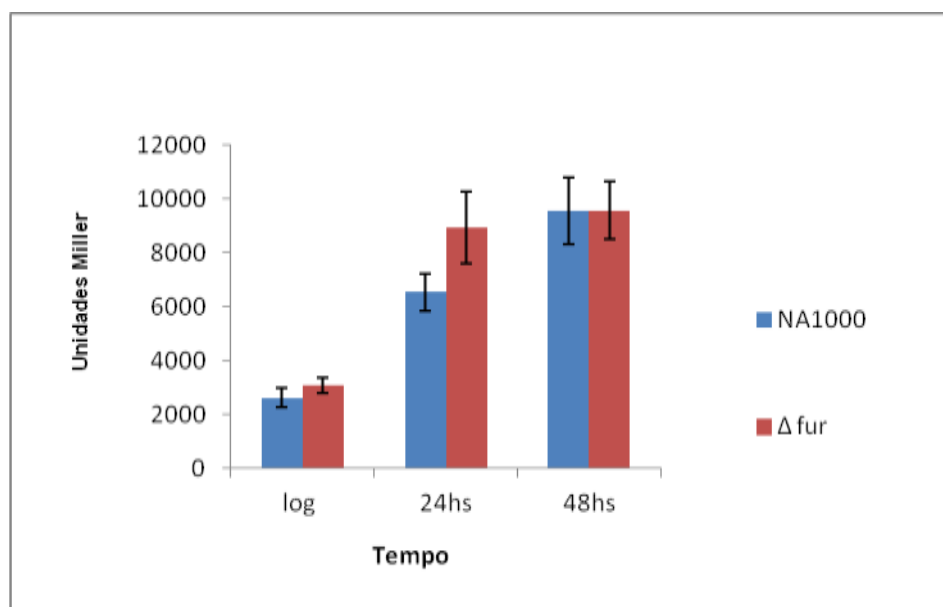
Desta forma, foi avaliado se *cspC* poderia ser regulado em resposta à homeostase de ferro, já que também foi observada uma sensibilidade a estresse oxidativo do mutante *cspC*. Para a realização deste ensaio culturas de NA1000 contendo o plasmídeo *PcspC/lacZ* foram incubadas a 30 °C sob constante agitação até atingirem aproximadamente a  $DO_{600} = 0,3$ . As células foram divididas em três tubos estéreis, no primeiro tubo foi adicionado o quelante de ferro 2,2- dipiridil para 0,1 mM, no segundo tubo foi adicionado  $FeSO_4$  para 0,1 mM e no terceiro tubo não foi adicionado nenhum agente. Após alcançarem o meio da fase exponencial (aproximadamente  $DO_{600} = 0,5$ ) foi realizado um ensaio de atividade de  $\beta$ -galactosidase. Neste ensaio a expressão de *cspC* não sofreu nenhuma alteração em situação de aumento ou diminuição de ferro, como é observado na figura 18, mostrando que a expressão de *cspC* não responde a variações nos níveis deste metal. A expressão de *cspC* também foi avaliada no mutante *fur*, por ensaios de atividade de  $\beta$ -galactosidase na  $DO_{600}$  de aproximadamente 0,5, e após 24 e 48 horas de crescimento. Como é verificado na figura 19 ocorrem pequenas diferenças na expressão de *cspC* no mutante *fur*, mas não são significativas, e conclui-se que não ocorre regulação de *cspC* por Fur.

**Figura 18** - Ensaio de expressão de *cspC* na presença de dipiridil ou de FeSO<sub>4</sub> no meio.



Culturas de NA1000 carregando o plasmídeo *PcspC/lacZ* foram incubadas em meio PYE sem nenhuma adição, com adição de 2,2 dipiridil 0,1 mM ou adição FeSO<sub>4</sub> 0,1 mM, respectivamente. A expressão foi avaliada por ensaios de  $\beta$ -galactosidase. Os valores representam a média de medidas com duas replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam o desvio padrão.

**Figura 19** - Ensaio da expressão de *cspC* no mutante  $\Delta fur$ .



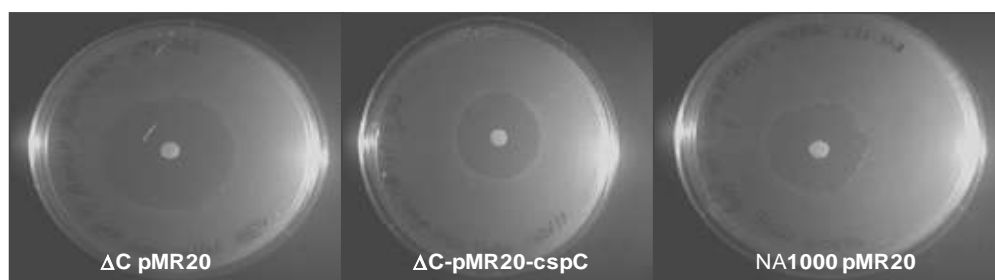
Culturas de NA1000 e culturas do mutante *fur* carregando o plasmídeo *PcspC/lacZ* foram incubadas em meio PYE/tetraciclina pelos tempos indicados. A expressão foi avaliada por ensaios de  $\beta$ -galactosidase. As barras pretas indicam o desvio padrão.

#### 4.4.3. Caracterização do papel de *cspC* na resposta a estresse oxidativo

##### 4.4.3.1 *cspC* e a resposta a peróxido de hidrogênio

Organismos aeróbios utilizam o oxigênio para respiração e oxidação de substratos. Produtos reativos de oxigênio, como radical ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ) são gerados constantemente em células em crescimento aeróbio, afetando macromoléculas (DNA, lipídeos e proteínas) (CABISCOL; TAMARIT; ROS, 2000). Para enfrentar estas espécies reativas de oxigênio (ROS) as bactérias aumentam a expressão de enzimas de destoxificação e proteínas de reparo de DNA. Em *E. coli*, um fator de transcrição sensível a peróxido de hidrogênio, OxyR, regula a expressão de várias proteínas envolvidas com estresse oxidativo, incluindo catalase, glutathiona redutase e até mesmo importantes reguladores como Fur (STORZ, TARTAGLIA 1992; MONGKOLSUK, HELMANN, 2002). Realizamos ensaios iniciais para verificar se o mutante *cspC* é sensível a peróxido de hidrogênio através de teste de inibição de crescimento por  $H_2O_2$  (Fig. 20). Como é observado na tabela 7 o mutante *cspC* se mostrou extremamente sensível a  $H_2O_2$ . Essa sensibilidade é aumentada na fase estacionária (48 horas), coincidentemente com o período de maior expressão de *cspC*. Esse resultado demonstra que *cspC* é importante para a resposta ao estresse oxidativo por  $H_2O_2$  e com base neste resultado iniciamos uma busca para avaliar o perfil de sensibilidade a outros tipos de estresse oxidativo.

**Figura 20** - Formação dos halos de inibição por  $H_2O_2$  na fase exponencial.



Nas linhagens,  $\Delta C(pMR20)$ ,  $\Delta C(pMR20-cspC)$  e NA1000( $pMR20$ ) respectivamente. A medição dos halos foi feita depois de 24 horas após a aplicação do estresse.

**Tabela 7** - Sensibilidade a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da linhagem mutante *cspC*. Os resultados mostram o diâmetro da zona de inibição (em cm). Os valores representam a média de três experimentos e o desvio padrão.

<b>Linhagens</b>	<b>Fase log</b>	<b>24hs</b>	<b>48hs</b>
NA1000 pMR20	3,10 ± 0,37	3,18 ± 0,09	3,50 ± 0,08
Δ <i>cspC</i> pMR20	3,95 ± 0,18	3,40 ± 0,16	4,50 ± 0,34
Δ <i>cspC</i> pMR20- <i>cspC</i>	3,63 ± 0,22	2,83 ± 0,13	3,83 ± 0,15

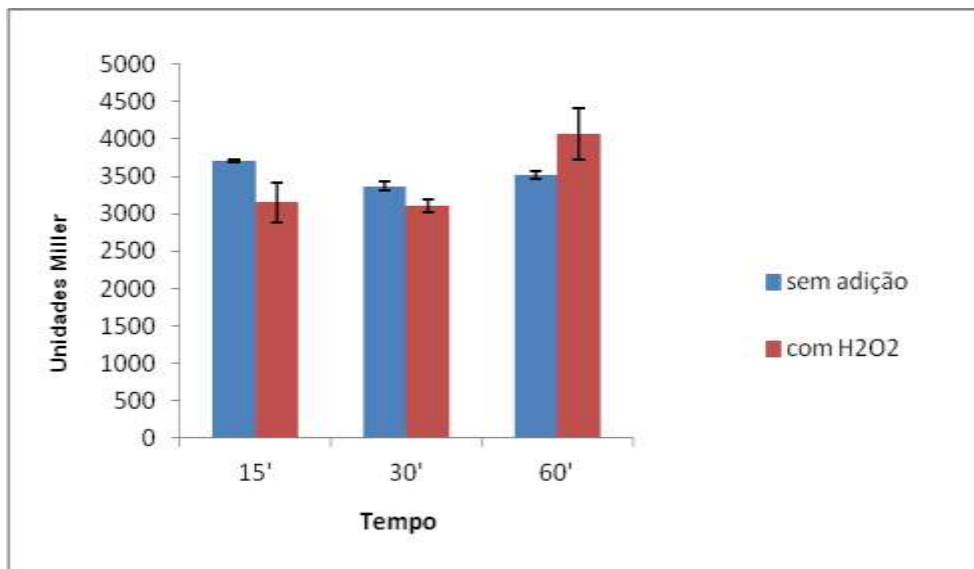
#### 4.4.3.2. Expressão de *cspC* em presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

Ensaio preliminares foram realizados para verificar se *cspC* é ativado na presença de peróxido de hidrogênio, assim como ocorre com *katG* em *C. crescentus*. Foram feitos ensaios de atividade de β-galactosidase nos tempos 15, 30 e 60 minutos após a adição do estresse (60 μM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Este ensaio foi repetido na fase estacionária, sendo que, depois de diluídas as culturas foram incubadas por 24 horas e então foi adicionado o estresse e realizado o ensaio de atividade de β-galactosidase.

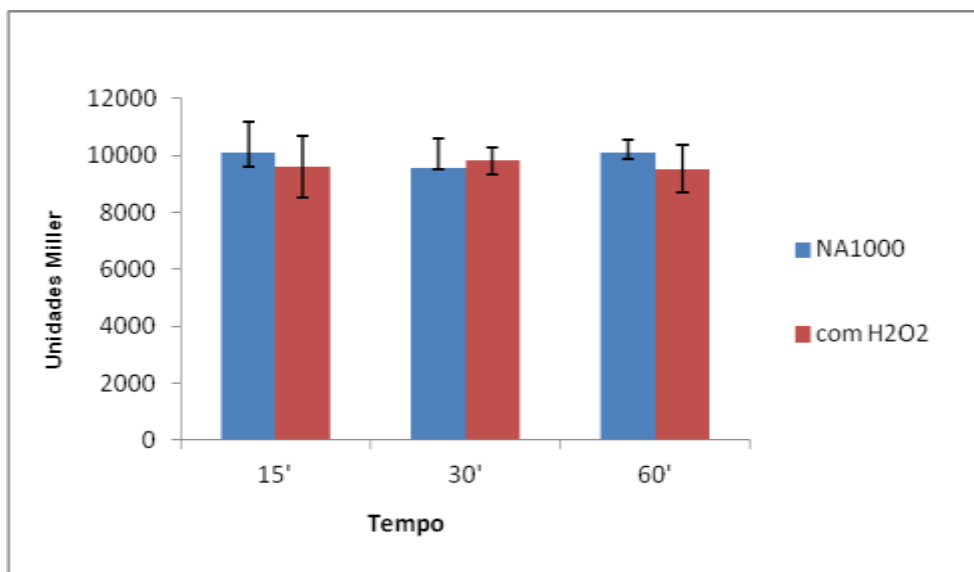
A expressão de *cspC* mostrou um pequeno aumento após 60' da adição de peróxido de hidrogênio ao meio de cultura em fase exponencial, mas este efeito não se mostrou consistente em outros tempos (Fig. 21a e 21b). O nosso grupo também observou resultado semelhante para o regulador de ferro, *fur* em *C. crescentus*. O mutante *fur* mostrou-se sensível a peróxido de hidrogênio (uma sensibilidade menor comparado ao mutante *cspC*) e o gene *fur* não foi induzido na presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DA SILVA NETO et al., 2009). Este resultado indica que *cspC* não é induzido em condições de estresse oxidativo por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e a sensibilidade do mutante Δ*C* deve ser devida a um efeito indireto da perda deste gene.

**Figura 21** - (A) Ensaio de expressão de *cspC* em presença de  $H_2O_2$  na fase exponencial e (B) na fase estacionária.

(A)



(B)



Culturas de NA1000 carregando o plasmídeo *PcspC/lacZ* foram ou não incubadas na presença de  $60 \mu M$  de  $H_2O_2$ . A expressão foi avaliada 15 minutos, 30 minutos e 60 minutos após a adição de peróxido de hidrogênio. A expressão foi avaliada por ensaios de  $\beta$ -galactosidase. Os valores representam a média de medidas com duas replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam o desvio padrão.

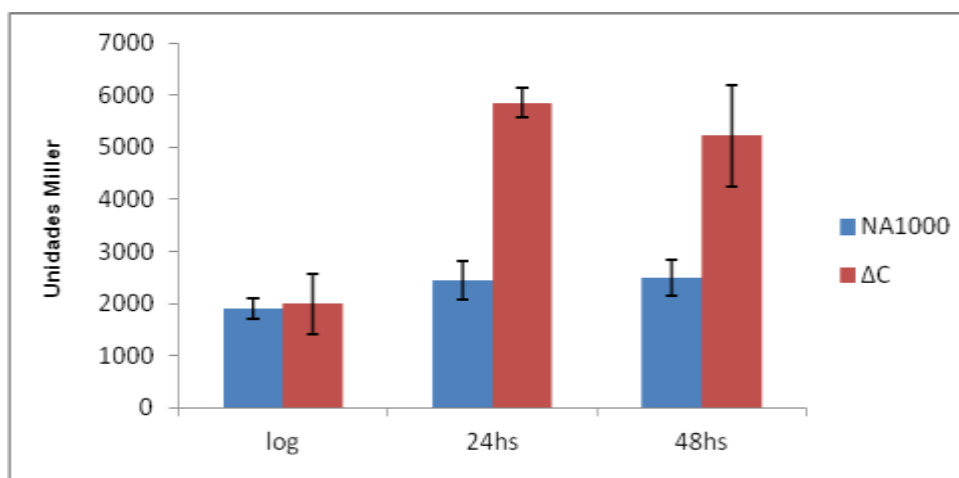


#### 4.4.3.3 Expressão de genes relacionados ao estresse oxidativo na linhagem do mutante $\Delta C$

As proteínas Dps são largamente distribuídas entre as bactérias e são caracterizadas pela capacidade de se ligar a DNA sem uma sequência específica aparente. Esta ligação forma um complexo muito estável, proporcionando ao DNA uma resistência a danos oxidativos e ação de DNAses. Apresentam um centro de ferroxidase que confere a essas proteínas uma atividade de ferritina e baseado nessa estrutura, foi proposto que a proteção contra danos oxidativo pode ser também por meio de sequestro de metal. Dps em *E. coli* possui a capacidade de proteger a célula da ação de peróxido de hidrogênio e além desta função, membros desta família em outras bactérias também foram identificados conferindo proteção a múltiplos estresses incluindo a estresses provocados por metal, choque de calor e choque frio (Revisto em HAIKARAINEN, PAPAGEORGIOU, 2009; CHIANCONE, CECI, 2010).

Na presença de peróxido de hidrogênio na fase logarítmica, a expressão de *dps* de *E. coli* é dependente de OxyR, já na fase estacionária esse controle ocorre via RpoS e IHF (ALTUVIA et al. 1994). Para atingir os níveis máximo de expressão, *dps* em *E. coli*, se mostrou dependente de CspC e CspE, sendo essa regulação provavelmente indireta, ocorrendo por meio da estabilização do mRNA de *rpoS* feita por estas proteínas de choque frio (PHADTARE et al., 2006). Em *Caulobacter crescentus* estudos estão sendo feitos pelo nosso grupo sobre a função de Dps nesta bactéria, e ensaios preliminares apontam a Dps como sendo importante para a resposta a peróxido de hidrogênio (MIRIAN RODRIGUES, comunicação pessoal). Com base nestas informações, foi realizado um ensaio de atividade de beta-galactosidase com uma fusão do promotor do gene *dps* ao gene *lacZ* no mutante  $\Delta C$ . A figura 22 mostra que os níveis de expressão do gene *dps* foram alterados na fase estacionária, indicando um aumento da expressão em  $\Delta C$ . Este resultado poderia sugerir que CspC e Dps atuem na mesma via de resposta ao estresse oxidativo, de modo que a falta de CspC seja compensada na célula por aumento da proteína Dps. Há também a possibilidade de que este aumento seja provocado via desrepressão da expressão de *dps*, podendo ser direta ou indireta. Porém, como a expressão do gene *dps* aumenta na fase estacionária (MIRIAN RODRIGUES, comunicação pessoal) e como já foi mostrado em algumas bactérias a Dps é importante na defesa contra vários tipos de estresse que geralmente estão presentes nesta fase, é pouco provável que *cspC* esteja agindo como repressor por meio de desestabilização do mRNA de *dps* ou de algum gene que atue sobre este.

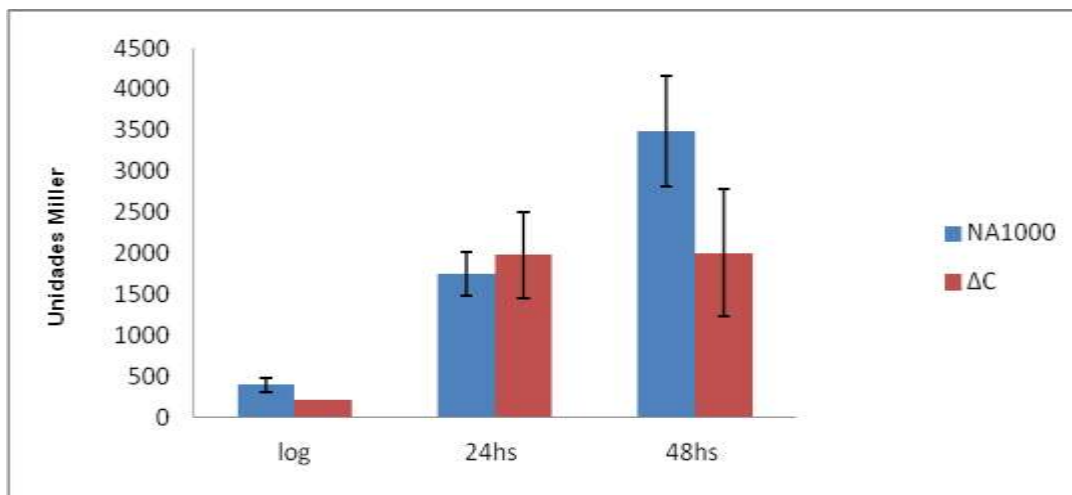
**Figura 22** - Análise da expressão mediada pelo promotor do gene *dps*.



As linhagens NA1000 e  $\Delta C$  carregando o plasmídeo, *Pdps/lacZ* foram utilizadas em ensaios de atividade de  $\beta$ -galactosidase. Os valores representam a média de medidas de três replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam o desvio padrão.

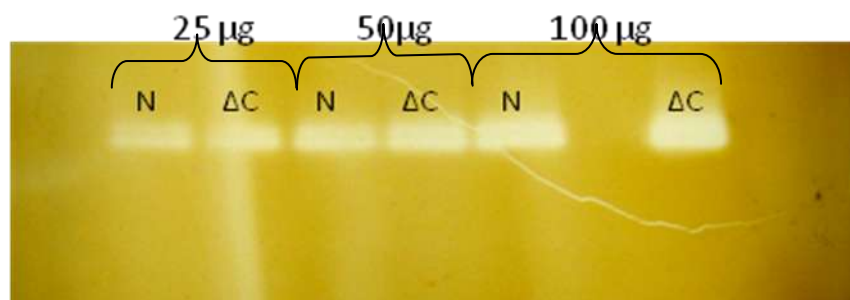
O gene da catalase-peroxidase *katG* em *C. crescentus* é regulado por OxyR, um fator de transcrição responsável por regular diferentes proteínas envolvidas na resposta a estresse oxidativo (ITALIANI et al., 2011). Considerando vários fatores, como: a) CspC é uma provável chaperone de RNA, b) a sensibilidade a peróxido de hidrogênio que observamos no mutante *cspC*, c) estudos relatando que CspC e CspE de *E. coli* auxiliam *katG* a atingir os níveis máximo de expressão; especulamos se CspC em *C. crescentus* estaria envolvida na estabilização do mRNA de *katG*. Para testar esta possibilidade, realizamos ensaios de atividade de  $\beta$ -galactosidase avaliando a expressão de *katG* no mutante  $\Delta C$  na fase exponencial e nos tempos 24 e 48 horas de crescimento. Os resultados mostram uma grande diferença na expressão de *katG* na ausência de *cspC* na fase estacionária tardia (48 horas) (Fig. 23), corroborando os resultados de formação de halo visivelmente maiores neste período. Porém, devido aos grandes desvios do ensaio realizamos um ensaio que avalia a atividade de catalase em um gel não desnaturante com células de fase estacionária tardia (48hs de crescimento). O ensaio foi realizado com as linhagens NA1000 e o mutante  $\Delta C$  em gel, utilizando peróxido de hidrogênio e diaminobenzidina. Este último composto é oxidado por peróxido de hidrogênio, e desta maneira a atividade de KatG pode ser verificada *in situ*. Como é observado na figura 24 no mutante  $\Delta C$  a atividade de KatG está normal, sendo assim, a possibilidade de *cspC* estabilizar o mRNA de *katG* parece pouco provável e o efeito sobre a transcrição pode ter outras causas.

**Figura 23** - Análise da expressão dirigida pelo promotor do gene *katG* no mutante  $\Delta C$ .



As linhagens NA1000 e  $\Delta C$  carregando o plasmídeo, *PkatG/lacZ* foram utilizadas em ensaios de atividade de  $\beta$ -galactosidase. Os valores representam a média de medidas com três replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam o desvio padrão.

**Figura 24** - Detecção *in situ* de atividade de catalase.



As concentrações de extrato proteico que foram aplicadas em cada canaleta estão discriminadas nos géis. N, NA1000;  $\Delta C$ ,  $\Delta cspC$ .

#### 4.4.3.4. *CspC* e a resposta à hidropéroxido e superóxido

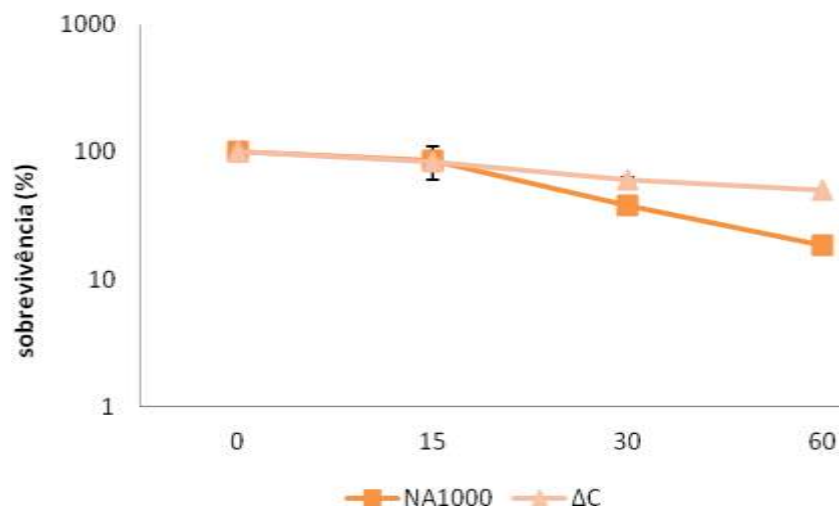
Foi realizado um ensaio de viabilidade comparando a sobrevivência das linhagens NA1000 e do mutante  $\Delta C$  na presença de *tert*-butil hidropéroxido e de paraquat, sendo que este último composto provoca a formação de ânion superóxido ( $O_2^-$ ). As culturas foram incubadas até o meio da fase exponencial ( $DO_{600}$  entre 0,5 e 0,6) e uma alíquota foi removida para a medida da UFC no ponto inicial. Em seguida, o agente oxidante foi adicionado, e alíquotas foram retiradas nos pontos 15, 30 e 60 minutos após a adição do agente oxidante e semeadas em placas PYE para posterior contagem das UFC. Como é observado na figura 25a, o mutante não mostrou sensibilidade a *tert*-butil

hidroperóxido, porém, é bastante sensível a paraquat, indicando que *cspC* é importante para a resposta a superóxido (Figura 25b).

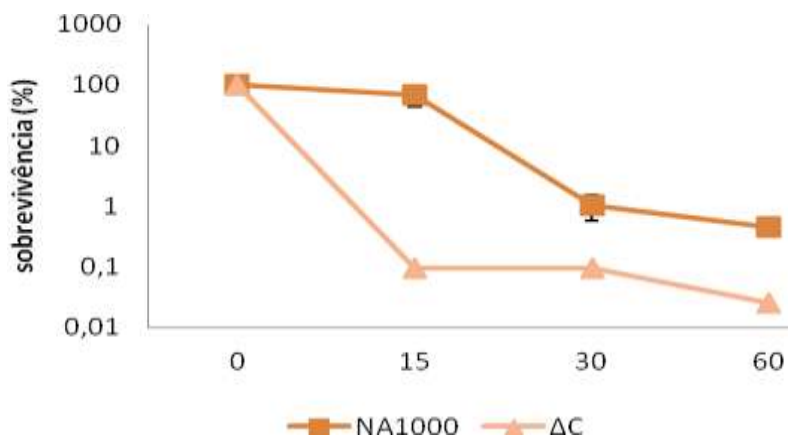
Superoxido dismutases (SODs) são enzimas antioxidantes responsáveis por catalisar a decomposição de superóxidos, e três tipos diferentes foram descritas, MnSOD (SodA), FeSOD (SodB) e CuZnSOD (SodC). Em *Caulobacter crescentus*, o grupo do Dr. Howard Steinman estudou o papel da SodC, uma superóxido dismutase localizada no periplasma (STEINMAN et al., 1990), e verificou que a ausência da SodC não afeta a sensibilidade a paraquat nesta bactéria, pois este composto gera o radical superóxido no citoplasma da célula. Como os ânions superóxidos são incapazes de atravessar a membrana celular, Steinman e colaboradores descreveram a SodC em *C. crescentus* como sendo responsável por proteger a célula de superóxido oriundo apenas de fontes exógenas. Visto que o mutante *cspC* se mostrou bastante sensível a paraquat, realizamos o ensaio de atividade da enzima superóxido dismutase (FeSOD). Conforme mostrado na figura 26, a atividade da enzima superóxido dismutase (FeSOD) não foi afetada, mas pode ser que *cspC* esteja envolvido na regulação das outras SODs encontradas em *C. crescentus* cujas atividades não foram detectadas no gel.

**Figura 25** - Sobrevivência relativa das linhagens NA1000 e mutante  $\Delta C$  em meio PYE contendo tert-butil (A) e paraquat (B).

(A)

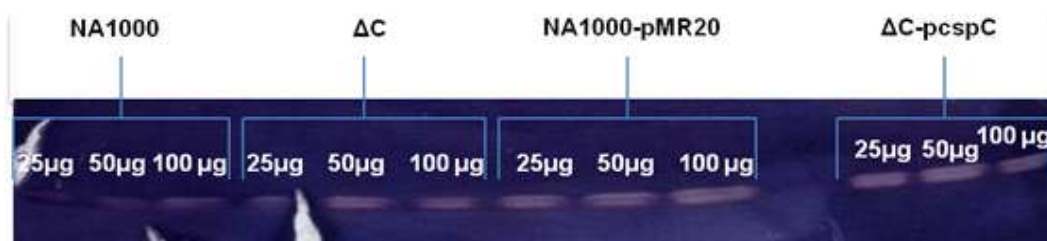


(B)



Nos pontos indicados, alíquotas foram removidas e plaqueadas para a contagem das colônias. A sobrevivência relativa foi determinada como sendo a porcentagem da razão entre o número de UFCs obtido e o número de UFCs inicial. Os valores representam a média de medidas com três replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras indicam o desvio padrão.

**Figura 26** - Detecção in situ de atividade da FeSOD.

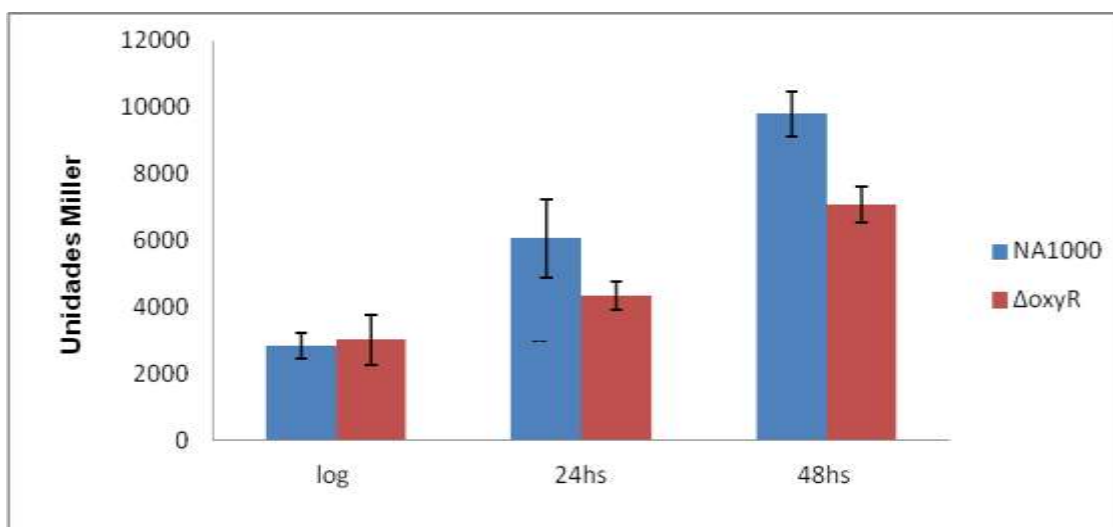


As concentrações de extrato proteico que foram aplicadas em cada canaleta estão discriminadas nos géis.  $\Delta C$ ,  $\Delta cspC$

#### 4.4.3.5. Expressão do gene *cspC* no mutante $\Delta oxyR$

Visto a sensibilidade do mutante  $\Delta C$  frente a peróxido de hidrogênio, foi verificado se OxyR estaria de alguma forma envolvida na regulação de *cspC*. A fusão *cspC/lacZ* foi inserida no mutante *oxyR* via conjugação, e foram feitos ensaios de atividade de  $\beta$ -galactosidase na  $DO_{600} = 0,5$ , e em 24 e 48 horas de crescimento. Os resultados mostraram que *cspC* apresentou uma expressão diminuída no mutante (Fig. 27). É provável que OxyR atue de forma indireta na expressão de *cspC*, já que não há uma sequência consenso para a ligação deste fator na região regulatória do gene.

**Figura 27** - Ensaio da expressão de *cspC* no mutante *oxyR*.



Culturas de NA1000 e do mutante *oxyR* carregando o plasmídeo *PcspC/lacZ* foram incubadas em meio PYE/tetraciclina pelos tempos indicados. A expressão foi avaliada por ensaios de  $\beta$ -galactosidase. Os valores representam a média de medidas com duas replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam o desvio padrão.

Em outras bactérias o envolvimento de CSPs com o estresse oxidativo não é bem caracterizado. As únicas CSPs envolvidas já descritas são CspC e CspE de *E. coli*, e é de forma indireta, através de estabilização do gene *rpoS*, um regulador central da fase estacionária, importante na ativação de enzimas antioxidantes em *E. coli*. Em membros de  $\alpha$ -proteobactérias não há um regulador equivalente a *rpoS* e *sigB* descrito, demonstrando que a resposta geral a estresses é provavelmente intermediada por diferentes reguladores. Em *C. crescentus*, uma bactéria de vida livre, que vive em constante contato com estresses ambientais, a resposta ao estresse oxidativo não é ainda bem caracterizada e vem recentemente sendo melhor estudada. Com base nestes dados, é de extrema relevância o esclarecimento do papel de CspC, que pode identificar o papel de outras proteínas também envolvidas nesta resposta.

## 4 Conclusões

Este trabalho permitiu uma melhor compreensão da regulação do gene *cspC* e de sua importância para a bactéria *Caulobacter crescentus*. Através de varreduras em duas bibliotecas de mutantes, análise de *cspC* em condições de estresses, expressão deste gene em diferentes mutantes e avaliação da expressão do promotor de *cspC* em mutantes relacionados a estresse oxidativo, foram obtidas as seguintes conclusões:

- Foram identificados vários genes que afetam a expressão de *cspC* na fase estacionária, mas nenhum destes codificavam fatores de transcrição.
- *cspC* é importante para a resposta a estresse oxidativo, já que o mutante *cspC* é sensível a paraquat e a peróxido de hidrogênio mas é resistente a *tert*-butil hidroperóxido.
- A expressão de *cspC* não é afetada em condições de estresses provocados por peróxido de hidrogênio, sacarose e sal e os genes *cspC* e *cspD* não respondem a *quorum sensing*.
- Os fatores sigmas *sigT* e *sigU* não estão envolvidos na regulação de *cspC*, mas no mutante  $\Delta sigJ$  a expressão de *cspC* aumenta. Foi observado que o gene *cspC* é autoregulado positivamente.
- A expressão de *dps* aumenta no mutante  $\Delta C$ , possivelmente, para compensar a ausência de *cspC*, e a transcrição de *katG* diminui, mas as atividades de KatG e SodB não são afetadas no mutante *cspC*.
- O regulador de transcrição OxyR provavelmente regula indiretamente a expressão de *cspC*, já Fur não está envolvido na regulação de *cspC*.



### Referências

- ABYZOV, S. S.; MITSKEVICH, I. N.; POGLAZOVA, M. N.; BARKOV, N. I.; LIPENKOV, V. Y.; BOBIN, N. E.; KOUDRYASHOV, B. B.; PASHKEVICH, V. M.; IVANOV, M. V. Microflora in the basal strata at Antarctic ice core above the Vostok lake. **Adv. Space Res.**, v. 28, p. 701-706, 2001.
- ALVAREZ-MARTINEZ, C. E.; BALDINI R. L.; GOMES S. L. A *Caulobacter crescentus* extracytoplasmic function sigma factor mediating the response to oxidative stress in stationary phase. **J. Bacteriol.**, v. 188, n. 5, p. 1835-1846, 2006.
- ALVAREZ-MARTINEZ, C. E.; LOURENÇO, R. F.; BALDINI, R.L.; LAUB, M.T.; GOMES S.L. The ECF sigma factor  $\sigma^T$  is involved in osmotic and oxidative stress response in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 66, p. 1240-1255, 2007.
- AMICK, J. D.; BRUN, Y. V. Anatomy of a bacterial cell cycle. **Gen. Biol.**, v. 2, n. 7, REVIEWS p. 1020.1–1020.4, 2001.
- AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Ed.). **Short protocols in molecular biology**. New York: John Wiley, 900 p. 1995.
- AUSMEES, N. e JACOBS-WAGNER, C. Spatial and temporal control of differentiation and cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 57, p. 225-247, 2003.
- ALTUVIA, S.; ALMIRON, M.; HUISMAN, G.; KOLTER, R.; STORZ, G. The *dps* promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and  $\sigma_s$  in stationary phase. **Mol. Microbiol.**, v. 13, n. 2, p. 265-272, 1994.
- BAE, W.; JONES, P. G.; INOUYE, M. CspA, the major cold shock protein of *Escherichia coli*, negatively regulates its own gene expression. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 22, p.7081-7088, 1997.
- BALHESTEROS, H. Análise do papel do gene *cspC* de *Caulobacter crescentus* e de sua regulação. 2009. 126 f. (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.
- BALHESTEROS H.; MAZZON R.R.; DA SILVA C.A.; LANG, E.A.; MARQUES, M.V. CspC and CspD are essential for *Caulobacter crescentus* stationary phase survival. **Arch. Microbiol.**, v. 192, n. 9, p. 747-758, 2010.
- BASHYAM, M. D.; HASNAIN, S. E. The extracytoplasmic function sigma factors: role in bacterial pathogenesis. **Infect. Genet. Evol.**, v. 4, p. 301-308, 2004.
- BRITOS, L.; ABELIUK, E.; TAVERNER, T.; LIPTON, M.; MCADAMS, H.; SHAPIRO, L. Regulatory response to carbon starvation in *Caulobacter crescentus*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 4, e18179, 2011.

BROOKS, B. E.; BUCHANAN S. K. Signaling mechanisms for activation of extracytoplasmic function (ECF) sigma factors. **Biochim Biophys Acta**, v. 1178 n. 9, p. 1930–1945, 2009.

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

CABISCOL, E.; TAMARIT, J.; ROS, J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. **Int. Microbiol.**, v. 3, n. 1, p. 3-8. REVIEW, 2000.

CAMERON, D. M.; GREGORY, S., T.; THOMPSON, J.; SUH, M. J.; LIMBACH, P. A. DAHLBERG, A. E. *Thermus thermophilus* L11 *Methyltransferase*, PrmA, is dispensable for growth and preferentially modifies free ribosomal protein L11 prior to ribosome assembly. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 17, p. 5819-5825, 2004.

CASES, I.; DE LORENZO, V.; OUZOUNIS, C. A. Transcription regulation and environmental adaptation in bacteria. **Trends Microbiol.**, v. 11, p. 248-253, 2003.

CHAIKAM V E KARLSON D.T. Comparison of structure, function and regulation of plant cold shock domain proteins to bacterial and animal cold shock domain proteins. **BMB reports**, v. 43, n. 1, p. 1-8, 2009.

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

CHIANCONE, E.; CECI P. The multifaceted capacity of Dps proteins to combat bacterial stress conditions: Detoxification of iron and hydrogen peroxide and DNA binding. **Biochim Biophys Acta**, v. 1800, n. 8, p. 798–805, 2010.

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

COHEN-OR, I.; SHENHAR, Y.; BIRAN, D.; RON, Z. E. CspC regulates *rpoS* transcript levels and complements *hfq* deletions. **Res. Microbiol.**, v. 161, p. 694-700, 2010.

COL, B. Regulation of Fructose 1,6-bisphosphatase II (GlpX) Gene Expression in *Escherichia coli*. September 29, 2004. 127 f. Thesis (Doctor of Philosophy in Biochemistry) - Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia, 2004.

CROSSON, S.; MCADAMS, H.; SHAPIRO, L. A genetic oscillator and regulation of cell cycle progression in *Caulobacter crescentus*. **Landes Bioscience.**, v. 3, n. 10, e55-e57, 2004.

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

DA SILVA NETO, J.F.S.; BRAZ; V.S.;ITALIANI, V.C.S.; MARQUES, M.V. Fur controls iron homeostasis and oxidative stress defense in the oligotrophic alpha-proteobacterium *Caulobacter crescentus*. **Nucleic Acids Res.**, v. 37, n. 14, p. 4812–4825, 2009.

DEMIRCI, H.; GREGORY, S.T.;DAHLBERG, A.E.; JOGL G. Recognition of ribosomal protein L11 by the protein trimethyltransferase PrmA. **Embo J.**, v. 26, n. 2, p. 567–577, 2007.

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

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

ERIKSSON, S.; HURME, R.; RHEN M. Low-temperature sensors in bacteria. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.**, v. 357, n. 887-893, REVIEW, 2002.

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

GABRIELSEN, S. O.; HUET J. Magnetic DNA Affinity Purification of Yeast Transcription Factor. **Methods Enzymol.**, v. 18, p. 508-525, 1993.

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

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

GOMES, S. L.; JULIANI, M. H.; MAIA, J. C.; SILVA, A. M. Heat shock protein synthesis during development in *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 168, n. 2, p. 923 – 930, 1986.

GONZALEZ, E.; KESHAVAN, N. D. Messing with Bacterial Quorum Sensing. **Microbiol Mol Biol Rev.**,v. 70, p. 859-875, 2006.

GOURION, B.; ROSSIGNOL, M.; VORHOLT, J. A. A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, n. 35, p. 13186-13191, 2006.

GRAUMANN, P.L.; MARAHIEL, M.A. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. **Trends Biochem. Sci.**, v. 23, p. 286-290, 1998.

\_\_\_\_\_. Cold shock proteins CspB and CspC are major stationary-phase-induced proteins in *Bacillus subtilis*. **Arch. Microbiol.**, v. 171, n. 2, p. 135-138, 1999.

GRAUMANN, P. L.; WENDRICH, T. M.; WEBER, M. H.; SCHRÖDER, K.; MARAHIEL, M.A. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. **Mol. Microbiol.**, v. 25, n. 4, p. 741- 756, 1997.

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

HAIKARAINEN, T.; PAPAGEORGIOU, A. C. Dps-like proteins: structural and functional Insights into a versatile protein family. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 67, p. 341–351, 2009.

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

HOLTZENDORFF, J.; HUNG, D.; BRENDE, P.; REISENAUER, A.; VIOLLIER, P. H.; MCADAMS, H. H.; SHAPIRO, L. Oscillating Global Regulators Control the Genetic Circuit Driving a Bacterial Cell Cycle. **Science**, v. 304, p. 983-987, 2004.

HOMUTH, G.; MASUDA, S.; MOGK, A.; KOBAYASHI, Y.; SCHUMANN, W. The *dnaK* operon of *Bacillus subtilis* is heptacistronic. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 1153–1164, 1997.

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

INOUYE, M.; PHADTARE, S. Cold shock response and adaptation at near-freezing temperature in microorganisms. **Sci STKE.**, v. 2004, pe26. 2004.

ITALIANI, V. C. Identificação de genes envolvidos na resposta a estresses ambientais em *Caulobacter crescentus*. 2001. 103 f. (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

ITALIANI, V. C.; DA SILVA NETO, J.; BRAZ V. S.; MARQUES, M. V. Regulation of catalase-peroxidase KatG is OxyR-dependent and Fur independent in *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 193, n. 7, p. 1734-1744, 2011.

ITALIANI, V. C.; MARQUES, M. V. Isolation and characterization of *Caulobacter* mutants impaired in adaptation to stationary phase. **J. Microbiol.**, v. 34, p. 85-90, 2003.

ISHIZUKA, H.; HANAMURA, A.; INADA, T.; AIBA, H. Mechanism of the down-regulation of cAMP receptor protein by glucose in *Escherichia coli*: role of autoregulation of the *crp* gene. **Embo J.**, v. 13, n. 13, p. 3077-3082, 1994

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

- KIM, Y.; WANG, X.; ZHANG, X. S.; GRIGORIU, S.; PAGE, R.; PETI, W.; WOOD, K. T. *Escherichia coli* toxin/antitoxin pair MqsR/MqsA regulate toxin CspD. **Environ. Microbiol.**, v. 12, n. 5, p. 1105-1121, 2010.
- KLINKERT, B. ; NARBERHAUS F. Microbial thermosensors. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 66, p. 2661–2676, 2009.
- LAUB, M. T.; CHEN, S. L.; SHAPIRO, L.; MCADAMS H. H. Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 99, n. 7, p. 4632-4637, 2002.
- LAUB, M. T.; MCADAMS, H. H.; FELDBLYUM, T.; FRASER, C. M.; SHAPIRO, L. Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. **Science.**, v. 290 n. 5499, p. 2144-2148, 2000.
- LAUB, T. M.; SHAPIRO, L.; MCADAMS, H. H. Systems Biology of *Caulobacter* **Annu. Rev. Genet.**, v. 41, p. 429–441, 2007.
- LANG, E. A.; MARQUES, M.V. Identification and transcriptional control of *Caulobacter crescentus* genes encoding proteins containing a cold shock domain. **J Bacteriol.**, v. 186, n. 17, p. 5603-5613, 2004.
- LESLEY, J. A.; SHAPIRO, L. SpoT regulates DnaA stability and initiation of DNA replication in carbon-starved *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 20, p. 6867-6880, 2008.
- LOURENÇO, R. F.; KOHLER; GOMES S. L. A two-component system, an anti-sigma factor and two paralogous ECF sigma factors are involved in the control of general stress response in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 80, n. 6, p. 1598-1612, 2011.
- LOURENÇO, R. F.; GOMES, S. L. The transcriptional response to cadmium, organic hydroperoxide, singlet oxygen and UV-A mediated by the sigmaE-ChrR system in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 72, n. 5, p. 1159-1170, 2009.
- LUSHCHAK, V. I. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.**, v. 153, n. 2, p. 175-190, 2010.
- MAGNUSSON, L.; U. FAREWELL, A.; NYSTRÖM, T. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. **Trends. Microbiol.**, v. 13, n. 5, p. 236-242 2006.
- MAZZON, R.R., LANG, E.A.S., BRAZ, V.S. E MARQUES, M.V. Characterization of *Caulobacter crescentus* response to low temperature and identification of genes involved in freezing resistance. **FEMS Microbiol.**, v. 288, p. 178-185, 2008.
- MCADAMS, H. H.; SHAPIRO, L. System-level design of bacterial cell cycle control. **FEBS Lett.**, v. 583, n. 24, p. 3984-3991, 2009.
- MILLER, J. H. **Experiments in molecular genetics**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972, 466 p.

MONGKOLSUK, S.; HELMANN J.D. Regulation of inducible peroxide stress responses. **Mol. Microbiol.**, v. 45, n. 1, p. 9-15. REVIEW, 2002.

NIERMAN, W. C.; FELDBLYUM, T. V.; LAUB, M. T.; PAULSEN, I. T.; NELSON, K. E.; EISEN, J. A.; HEIDELBERG, J. F.; ALLEY, M. R.; OHTA, N.; MADDOCK, J. R.; POTOCKA, I.; NELSON, W. C.; NEWTON, A.; STEPHENS, C.; PHADKE, N. D.; ELY, B.; DEBOY, R. T.; DODSON, R. J.; DURKIN, A. S.; GWINN, M. L.; HAFT, D. H.; KOLONAY, J. F.; SMIT, J.; CRAVEN, M. B.; KHOURI, H.; HETTY, J.; BERRY, K.; UTTERBACK, T.; TRAN, K.; WOLF, A.; VAMATHEVAN, J.; ERMOLAEVA, M.; WHITE, O.; SALZBERG, S. L.; VENTER, J. C.; SHAPIRO, L.; FRASER, C. M. Complete genome sequence of *Caulobacter rescentus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 98, p. 4136-4141. 2001.

NOGUEIRA, T.; SPRINGER, M. Post-transcriptional control by global regulators of gene expression in bacteria. **Curr Opin Microbiol. Apr.**, v. 3, n. 2, p. 154-158, 2000.

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

OHTA, T.; SAITO, K.; KURODA, M.; HONDA, K.; HIRATA, H.; HAYASHI, H. Molecular cloning of two new heat shock genes related to the *hsp70* genes in *Staphylococcus aureus*. **J. Bacteriol.**, v. 176, p. 4779-4783, 1994.

PHADTARE, S.; TADIGOTLA, V.; SHIN, WH.; SENGUPTA, A.; SEVERINOV, K. Analysis of *Escherichia coli* global gene expression profiles in response to overexpression and deletion of CspC and CspE. **J. Bacteriol.**, v. 188, n. 7, p. 2521-2527, 2006.

PHADTARE S. Recent developments in bacterial cold-shock response. **Mol. Biol.**, v. 6, p. 125-136, 2004.

PHADTARE, S.; YAMANAKA, K.; INOUE, M. The cold shock response. In: STORZ, G.; HENGGE-ARONIS, R. (Ed.). **Bacterial stress responses**. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 2000. p. 33-45.

PHADTARE, S.; ALSINA, J.; INOUE, M. Cold-shock response and cold-shock proteins. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 2, n. 2, p. 175-180 1999.

POINDEXTER, J. S. The caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. **Microbiol Rev.**, v. 45, n. 1, p.123-179, 1981.

POLEVODA, B.; SHERMAN, F. Methylation of proteins involved in translation. **Mol. Microbiol.**, v. 65, n. 3, p. 590-660, 2007.

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

- QUON, K. C.; YANG, B.; DOMIAN, I. J.; SHAPIRO, L.; MARCZYNSKI, G. T. Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** v. 95, n. 1, p. 120-125, 1998.
- ROBERTS, R. C.; TOOCHINDA, C.; AVEDISSIAN, M.; BALDINI, R. L.; GOMES, S. L.; SHAPIRO, L. Identification of a *Caulobacter crescentus* operon encoding *hrcA*, involved in negatively regulating heat-inducible transcription, and the chaperone gene *grpE*. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 1829-1841, 1996.
- SCHMID, B; KLUMPP, J.; RAIMANN, E.; LOESSNER, M. J.; STEPHAN R.; TASARA, T. Role of Cold Shock Proteins in Growth of *Listeria monocytogenes* under Cold and Osmotic Stress Conditions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 6, p. 1621–1627, 2009.
- SCHELLHORN, H. E.; AUDIA, J. P.; WEI, L. I.; CHANG, L. Identification of conserved, RpoS-dependent stationary-phase genes of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 23, p.6283-6291, 1998.
- SKERKER, J. M.; LAUB, M.T. Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, p. 325-337. 2004.
- SILVA, C. A. P. T.; BALHESTEROS, H; MAZZON, R.R.; MARQUES, M. V. SpdR, a response regulator required for stationary phase induction of *Caulobacter crescentus cspD*. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 22, p. 5991-6000, 2010.
- SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. **J. Biotechnol.**, v. 1, p. 784-790, 1983.
- SINGH, V. K.; UTAIDA, S.; JACKSON, S.L.; JAYASWAL, R.K.; WILKINSON, B.J.;CHAMBERLAIN, N.R. Role for *dnaK* locus in tolerance of multiple stresses in *Staphylococcus aureus*. **J. Microbiol.**, v. 153, p. 3162-3173, 2007.
- STEINMAN, H.M; ELY, B. Copper-Zinc Superoxide Dismutase of *Caulobacter crescentus*: Cloning, Sequencing, and Mapping of the Gene and Periplasmic Location of the Enzyme. **J. Bacteriol.**, v. 172, n. 6, p. 2901-2910, 1990.
- STEINMAN, H.M; FAREED, F.; WEINSTEIN, L. Catalase-peroxidase of *Caulobacter crescentus*: function and role in stationary-phase survival. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 21, p. 6831-6836, 1997.
- STORZ G; TARTAGLIA, L.A. OxyR: a regulator of antioxidant genes. **J. Nutr.**, v. 122 (Suppl. 3), p. 627-630. REVIEW, 1992.
- SUBSIN B.; CHAMBERS C. E.; VISSER M.B.; SOKOL P. A. Identification of Genes Regulated by the *cepIR* Quorum-Sensing System in *Burkholderia cenocepacia* by High-Throughput Screening of a Random Promoter Library. **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 3, p. 968-979, 2007.

TOH, E.; KURTZ H.D. JR.; BRUN, Y.V. Characterization of the *Caulobacter crescentus* Holdfast Polysaccharide Biosynthesis Pathway Reveals Significant Redundancy in the Initiating Glycosyltransferase and Polymerase Steps. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 21, p. 7219-7231, 2008.

THORGERSEN, M. P.; DOWNS, D. M. Oxidative stress and disruption of labile iron generate specific auxotrophic requirements in *Salmonella enteric*. **Microbiol.**, v. 155, p. 295-304, 2009.

ULUSU N. N., TEZCAN E. F. Cold Shock Proteins. **Turk J. Med. Sci.**, v. 31, p. 283-290, 2001.

UPPAL, S.; MAURYA, S. R.; HIRE, R.; JAWALI, N. Cyclic AMP receptor protein (CRP) regulates *cspE*, an early cold-inducible gene, in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 2011.

UPPAL, S.; RAO AKKIPEDDI, V. S. N.; JAWALI, N. Posttranscriptional regulation of *cspE* in *Escherichia coli* : involvement of the short 50 -untranslated region. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 279, p. 83–91, 2007.

WEBER, M. H.; MARAHIEL, M. A. Bacterial cold shock responses. **Sci. Prog.**, v. 86, n. pt 1-2, p. 9-75, 2003.

WOLFFE, A. P. Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. **Bioessays**, v. 16, n.4, p. 245-251. REVIEW, 1994.

WOOD, J.M. Osmosensing by bacteria: signals and membrane-based sensors. **Microbiol. Mol. Biol., Rev.** v. 63, p. 230–262, 1999.

WORTINGER, M.; QUARDOKUS, E.; BRUN Y. Morphological adaptation and inhibition of cell division during stationary phase in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 40, p. 179-88, 1998.

WU, J.Y.; SIEGEL, L.M.; KREDICH, N.M. High-level expression of *Escherichia coli* NADPH-sulfite reductase: requirement for a cloned *cysG* plasmid to overcome limiting siroheme cofactor. **J. Bacteriol.**, v. 173, n. 1, p. 325-333, 1991.

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

YAMANAKA, K.; MITANI, T.; OGURA, T.; NIKI, H.; HIRAGA, S. Cloning, sequencing, and characterization of multicopy suppressors of a *mukB* mutation in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 13, n. 2, p. 301-312, 1994.

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



YAMANAKA, K.; ZHENG, W.; CROOKE, E.; WANG, Y. H.; INOUE, M. CspD, a novel DNA replication inhibitor induced during the stationary phase in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 39, n. 6, p. 1572-1584, 2001.

YANG, X.; ISHIGURO E.E. Involvement of the N Terminus of Ribosomal Protein L11 in Regulation of the RelA Protein of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 22, p. 6532-6537, 2001.

ZHANG S, SCOTT JM, HALDENWANG WG. Loss of ribosomal protein L11 blocks stress activation of the *Bacillus subtilis* transcription factor sigma(B). **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 7, p. 2316-2321.