

MARISTELA PREVIATO

**ESTUDO DA REGULAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA
RESPOSTA A ESTRESSE OXIDATIVO EM *Caulobacter crescentus***

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

São Paulo
2014

MARISTELA PREVIATO

**ESTUDO DA REGULAÇÃO DE GENES ENVOLVIDOS NA
RESPOSTA A ESTRESSE OXIDATIVO EM *Caulobacter crescentus***

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Dr.^a Marilis do Valle Marques

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

São Paulo
2014

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

Previato, Maristela.

Estudo da regulação de genes envolvidos na resposta a estresse oxidativo em *Caulobacter crescentus* / Maristela Previato. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Marilis do Valle Marques.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Resposta a estresses em bactérias.

Versão do título para o inglês: Regulation of genes involved in oxidative stress response in *Caulobacter crescentus*.

1. Estresse oxidativo 2. Regulação gênica 3. Superóxido dismutase
4. Peroxirredoxina 5. *Caulobacter* I. Marques, Profa. Dra. Marilis do Valle II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0153/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Maristela Previato.

Título da Dissertação: Estudo da regulação de genes envolvidos na resposta a estresse oxidativo em *Caulobacter crescentus*.

Orientador(a): Profa. Dra. Marilis do Valle Marques.

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

Aprovado(a)

Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
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) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 448/11 referente ao projeto intitulado: "*Estudo da regulação de genes envolvidos na resposta a estresse oxidativo em *Caulobacter crescentus**" sob a responsabilidade de **Maristela Previato**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS 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, 23 de março de 2011.

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

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

*Aos meus pais, Laerte e Lourdes,
minhas irmãs Mariana e Mariângela e
meu querido namorado Adriano,
pelo carinho, dedicação e incentivo.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Marilis do Valle Marques, por me acolher em seu laboratório, pelos ensinamentos, dedicação e confiança.

Aos colegas de laboratório Angel, Carolina, Daniela, Heloise, Ivan, Juliana, Mirian, Ricardo e Ynés, e aos colegas de grupo José, Vânia e Carina pelos ensinamentos, companhia e conversas filosóficas sobre os mais diversos assuntos.

Aos técnicos Emílio e Íris por sempre me ajudarem.

À Prof.^a Dr.^a Suely Lopes Gomes por disponibilizar as linhagens mutantes de *C. crescentus*, $\Delta sigJ$, $\Delta sigF$, $\Delta sigE$, $\Delta sigT$ e $\Delta sigU$, utilizadas neste trabalho.

Aos professores Dr.^a Nadja Cristhina de Souza Pinto e Dr. Josef Wilhelm Baader, por doarem os agentes oxidantes menadiona e pirogalol para realização deste trabalho.

Aos professores Dr. Carlos Frederico Martins Menck, Dr.^a Irma Nelly Gutierrez Rivera, Dr.^a Heloiza Ramos Barbosa e Dr. Rodrigo Da Silva Galhardo por disponibilizarem seus equipamentos.

Ao serviço de esterilização, em especial ao senhor José, por compreender e auxiliar nos momentos de necessidade.

Aos secretários Bruno, Elisabete e Gisele pela competência e prontidão ao me ajudarem nos processos burocráticos do departamento.

À Fapesp e Capes pelo auxílio financeiro.

Aos professores da USP e Instituto Butantan que durante a minha pós-graduação, com seus ensinamentos, enriqueceram minha formação.

Aos professores da UNESP que durante minha graduação, com seus ensinamentos e dedicação, aumentaram minha paixão e curiosidade pela biologia.

Aos membros do grupo Seminários de Microbiologia Molecular, os corretores dos relatórios do departamento e Fapesp, e aos professores da banca de qualificação pelas sugestões e ensinamentos.

Aos pais do Adriano, Luis Roberto e Emília pela preocupação e carinho.

Às minhas amigas Naila, Laís e Renata e ao amigo Tiago pelo carinho, apoio e amizade à distância.

Aos meus colegas Roberta, Tássia, Guilherme e Celma pelo carinho e por entenderem a saudade devido à distância da família.

Aos meus tios Cleonice, José, Clarice e Renato e à minha prima Telma por me acolherem no início da pós-graduação e por me dedicarem carinho e afeto.

À vó Christina (*in memoriam*) pela preocupação e afeto.

Aos meus padrinhos vó Polônia e vô Alcides pelo amor e por não entenderem, mas acharem importante o meu trabalho.

Aos meus pais Lourdes e Laerte, pelo amor, dedicação, força e esperança ver as filhas formadas.

Às minhas irmãs Mariângela e Mariana pelo amor, companhia, carinho, incentivo e por fazerem a minha vida mais feliz. Em especial à Mariângela por morar comigo e diversificar as refeições, e à Mariana por cuidar de mim sem ser formada.

Ao meu querido e amado Adriano pela paciência, cumplicidade, companheirismo, compreensão, amor e por completar o meu coração.

Às pessoas que não foram citadas, mas fazem parte da minha família de coração. Todos foram muito importantes na minha caminhada, pois sem o incentivo e o amor de vocês esta conquista teria sido menos especial.

"Nada em biologia faz sentido senão sob a luz da evolução."

Theodosius Dobzhansky

RESUMO

PREVIATO, M. **Estudo da regulação de genes envolvidos na resposta a estresse oxidativo em *Caulobacter crescentus***. 2013. 134 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

O estresse oxidativo, causado por níveis aumentados do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ou do radical hidroxila ($OH\cdot$), pode levar a danos em todos os componentes celulares. Várias enzimas são responsáveis por remover da célula estas espécies reativas. As subunidades da alquil-hidroperóxido redutase (AhpC e AhpF) protegem contra os efeitos tóxicos dos peróxidos através de eliminação direta dos oxidantes. As enzimas superóxido dismutases (SOD) são importantes na remoção de íons superóxido. Para começar a definir os mecanismos de regulação da expressão gênica de *C. crescentus* para os genes *ahpC*, *sodA*, *sodB* e *sodC*, os níveis de transcrição destes genes foram avaliados inicialmente na cepa selvagem NA1000 para verificar os agentes oxidativos que induzem cada gene. Fusões de transcrição com o gene repórter *lacZ* foram construídas, permitindo a quantificação da expressão por ensaios da atividade de β -galactosidase, e também analisamos a expressão dos genes por meio de qRT-PCR. As culturas foram cultivadas em meio PYE (meio rico) ou M2 (meio mínimo) e a expressão de cada gene foi avaliada na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), tert-butil hidroperóxido (tBOOH), paraquat, menadiona, pirogalol, $FeSO_4$ ou DDPI. Em PYE, tBOOH e H_2O_2 foram capazes de induzir a transcrição de *ahpC*. Assim, peróxidos causam estresse oxidativo em *C. crescentus* e AhpCF é responsável pela eliminação dessas espécies oxidantes. Além disso, na linhagem mutante *oxyR*, esta resposta foi perdida, indicando que este gene é regulado por OxyR. As fusões de transcrição com os promotores de SOD não responderam à presença de paraquat, contudo *sodB* e *sodC* tiveram suas expressões induzidas na fase estacionária. Nos ensaios de qRT-PCR em M2, a expressão de *sodA* foi induzida na presença de H_2O_2 , paraquat, menadiona, pirogalol e DDPI, mas foi reprimida na presença de $FeSO_4$. *sodB* teve sua expressão induzida na presença de menadiona, no entanto foi reprimida na presença de $FeSO_4$ e DDPI. A expressão de *sodC* foi induzida na presença de menadiona. *ahpC* teve sua expressão induzida na presença de H_2O_2 , paraquat e menadiona, mas foi mantida na presença de tBOOH. Nos ensaios de qRT-PCR com as linhagens mutantes *fur*, *sigF* e *sigJ*, observamos que o gene *sodA* é regulado por σ^F e σ^J , enquanto os genes *sodB* e *sodC* podem ser regulados por σ^J . Em conclusão, o gene *ahpC* de *C. crescentus* é induzido por peróxidos e está sob o controle de OxyR. As SODs são induzidas principalmente por superóxidos, *sodB* e *sodC* possuem indução de fase na fase estacionária e possivelmente estão sob o controle do sigma J, enquanto o gene *sodA* é regulado por sigma F e sigma J.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Regulação gênica. Superóxido dismutase. Peroxirredoxina. *Caulobacter*.

ABSTRACT

PREVIATO, M. **Regulation of genes involved in oxidative stress response in *Caulobacter crescentus***. 2013. 134 p. Masters thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Oxidative stress, caused by increased levels of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), or the hydroxyl radical (OH^{\bullet}), can lead to damage in all cellular components. Several enzymes are responsible for removing these reactive species from the cell. Alkyl hydroperoxide reductase (AhpC and AhpF) protects against the toxic effects of peroxides through the direct elimination of oxidants. The superoxide dismutases (SOD) are important for the removal of superoxide ions. To start defining the regulatory mechanisms of gene expression of *C. crescentus* *ahpC*, *sodA*, *sodB* and *sodC*, transcription levels of these genes were first evaluated in the wild type strain to determine the stress agents that induce each gene. Transcription fusions with the *lacZ* reporter gene were constructed, allowing the quantification of expression by β -galactosidase activity assays, and we have also analyzed gene expression by qRT-PCR assay. The cultures were grown in PYE and M2 medium, and gene expression was evaluated in the presence of hydrogen peroxide (H_2O_2), tert-butyl hydroperoxide (tBOOH), paraquat, menadione, pyrogallol, $FeSO_4$ or DDPI. In rich PYE medium, H_2O_2 and tBOOH were able to induce oxidative stress-dependent transcription of *ahpC*. Thus, both inorganic and organic peroxide cause oxidative stress to *C. crescentus* and AhpCF is responsible for clearance of these oxidizing species. Furthermore, in the mutant *oxyR* strain this response is lost, indicating that this gene is regulated by OxyR. The transcriptional fusions with the SOD promoters did not respond to the presence of paraquat, however *sodB* and *sodC* had their expressions induced in stationary phase. In qRT-PCR assays, in M2 medium, *sodA* expression was induced in the presence of H_2O_2 , paraquat, menadione, pyrogallol and DDPI, but was diminished in the presence of $FeSO_4$. *sodB* expression was induced in the presence of menadione, however was lower in the presence of $FeSO_4$ and DDPI. *sodC* expression was induced in the presence of menadione. *ahpC* expression was induced in the presence of H_2O_2 , paraquat and menadione, but was maintained in the presence of tBOOH. In qRT-PCR assays with the mutant strains *fur*, *sigF* and *sigJ*, we observed that the *sodA* gene is regulated by σ^F and σ^J while *sodC* and *sodB* genes may be regulated by σ^J . In conclusion, *C. crescentus* *ahpC* is induced by peroxides and is under the control of OxyR. The SODs are mainly induced by superoxide, *sodB* and *sodC* are induced in stationary phase and are possibly under the control of sigma J, while *sodA* is regulated by sigma F and sigma J.

Keywords: Oxidative stress. Gene regulation. Superoxide dismutase. Peroxiredoxin. *Caulobacter*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Redução do oxigênio molecular.....	20
Figura 2 - Reação de Fenton e ciclo de Harber-Weiss.....	21
Figura 3 - Ciclo catalítico de AhpC.....	25
Figura 4 - Sequência da transferência de elétrons nos centros redox da peroxirredoxina redutase.....	26
Figura 5 - Mecanismo da ativação da transcrição via formação de ponte dissulfeto intramolecular em 2-Cys OxyR.....	28
Figura 6 - Ciclo de vida de <i>Caulobacter crescentus</i>	33
Figura 7 - Mecanismo da toxicidade da droga ciclo-redox paraquat.....	53
Figura 8 - Crescimento na presença de paraquat.....	55
Figura 9 - Viabilidade em placa após a exposição a agentes oxidantes.....	57
Figura 10 - Mecanismo da toxicidade da droga ciclo-redox menadiona.....	58
Figura 11 - Crescimento na presença de menadiona.....	60
Figura 12 - Etapas da auto-oxidação do pirogalol.....	61
Figura 13 - Curva de crescimento na presença de pirogalol.....	63
Figura 14 - Curva de crescimento na presença de tert-butil hidroperóxido.....	64
Figura 15 - Regiões promotora e codificadora de <i>sodA</i> (CCNA_01855).....	67
Figura 16 - Regiões promotora e codificadora de <i>sodB</i> (CCNA_03672).....	67
Figura 17 - Regiões promotora e codificadora de <i>sodC</i> (CCNA_01650).....	68
Figura 18 - Regiões promotora e codificadora de <i>ahpC</i> (CCNA_03012).....	68

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos fragmentos clonados no pGEM-T Easy após digestão com EcoRI.....	69
Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos fragmentos clonados no pRK/lacZ290 amplificados por PCR.....	69
Figura 21 - Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de <i>ahpC</i> na fusão de transcrição.....	78
Figura 22 - Análise da expressão de <i>ahpC</i> em resposta a H ₂ O ₂ por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo.....	79
Figura 23 - Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de <i>ahpC</i> na fusão de transcrição em tempos diversos na presença de tBOOH.....	79
Figura 24 - Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de <i>ahpC</i> na fusão de transcrição em várias concentrações de tBOOH.....	80
Figura 25 - Análise da expressão de <i>ahpC</i> em resposta a tBOOH por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo.....	80
Figura 26 - Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de <i>ahpC</i> na fusão de transcrição nas linhagens de <i>C. crescentus</i> NA1000 e Δ oxyR.....	81
Figura 27 - Análise da expressão de <i>ahpC</i> em resposta a paraquat por meio de RT-PCR quantitativo.....	82
Figura 28 - Análise da expressão de <i>ahpC</i> em resposta a menadiona por meio de RT-PCR quantitativo.....	83
Figura 29 - Análise da expressão de <i>ahpC</i> em resposta a pirogalol por meio de RT-PCR quantitativo.....	84
Figura 30 - Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de <i>sodA</i> na fusão de transcrição.....	91
Figura 31 - Análise da expressão de <i>sodA</i> em resposta a peróxidos por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo.....	91

Figura 32 - Análise da expressão de <i>sodA</i> em resposta a ferro por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo.....	92
Figura 33 - Análise da expressão de <i>sodA</i> em resposta a paraquat por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo.....	93
Figura 34 - Análise da expressão de <i>sodA</i> em resposta a paraquat por meio de RT-PCR quantitativo.....	94
Figura 35 - Análise da expressão de <i>sodA</i> em resposta a menadiona por meio de RT-PCR quantitativo.....	95
Figura 36 - Análise da expressão de <i>sodA</i> em resposta a pirogalol por meio de RT-PCR quantitativo.....	96
Figura 37 - Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de <i>sodB</i> na fusão de transcrição.....	102
Figura 38 - Análise da expressão de <i>sodB</i> em resposta a peróxidos por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo.....	103
Figura 39 - Análise da expressão de <i>sodB</i> em resposta a ferro por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo.....	104
Figura 40 - Análise da expressão de <i>sodB</i> em resposta a paraquat por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo.....	104
Figura 41 - Análise da expressão de <i>sodB</i> em resposta a paraquat por meio de RT-PCR quantitativo.....	105
Figura 42 - Análise da expressão de <i>sodB</i> em resposta a menadiona por meio de RT-PCR quantitativo.....	106
Figura 43 - Análise da expressão de <i>sodB</i> em resposta a pirogalol por meio de RT-PCR quantitativo.....	107
Figura 44 - Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de <i>sodC</i> na fusão de transcrição.....	113

Figura 45 - Análise da expressão de <i>sodC</i> em resposta a peróxidos por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo.....	114
Figura 46 - Análise da expressão de <i>sodC</i> em resposta a paraquat por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo.....	115
Figura 47 - Análise da expressão de <i>sodC</i> em resposta a paraquat por meio de RT-PCR quantitativo.....	116
Figura 48 - Análise da expressão de <i>sodC</i> em resposta a menadiona por meio de RT-PCR quantitativo.....	117
Figura 49 - Análise da expressão de <i>sodC</i> em resposta a pirogalol por meio de RT-PCR quantitativo.....	118
Figura 50 - Análise da alteração do pH em culturas de <i>C. crescentus</i> NA1000 crescendo em meio mínimo ou meio complexo.....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes com seu respectivo nome nas linhagens de <i>Caulobacter crescentus</i> CB15 e NA1000 e na linhagem de <i>E. coli</i> K-12.....	45
Tabela 2 - Linhagens bacterianas.....	45
Tabela 3 - Plasmídeos utilizados nos procedimentos de clonagem e ensaios para caracterização fenotípica.....	46
Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados nas fusões de transcrição.....	46
Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de qRT-PCR.....	47
Tabela 6 - Variação da expressão dos genes normalizadores utilizados nos ensaios de qRT-PCR.....	78
Tabela 7 - Quadro resumo com os dados obtidos nos ensaios de RT-PCR quantitativo nas linhagens de <i>C. crescentus</i> em meio mínimo.....	123

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α : alfa

CuZnSOD: superóxido dismutase com cobre e zinco

DDPi: 2,2'-dipiridil

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO₆₀₀: densidade óptica a 600 nanômetros

ECFs: fator sigma de função extracitoplasmática

FAD: dinucleotídeo de flavina-adenina

FeSOD: superóxido dismutase com ferro

γ : gamma

kDa: quilodáton(s)

LB: Lúria-Bertani

M: molar

MnSOD: superóxido dismutase com manganês

NADH: nicotinamida adenina dinucleotídeo

NADPH: fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo

NiSOD: superóxido dismutase com níquel

RNA_m: RNA mensageiro

O₂: oxigênio molecular

O₂^{•-}: ânion superóxido

OH[•]: radical hidroxila

OH⁻: ânion hidroxil

ONPG: orto-nitrofenil- β -galactosídeo

pb: pares de bases

PCR: reação em cadeia da polimerase

qRT-PCR: PCR em tempo real (quantitativo)

RNA: ácido ribonucléico

ROS: espécies reativas de oxigênio

σ : sigma

SodN: superóxido dismutase com níquel

SODs: superóxido dismutases

UFC: unidade formadora de colônia

UV: radiação ultravioleta

X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

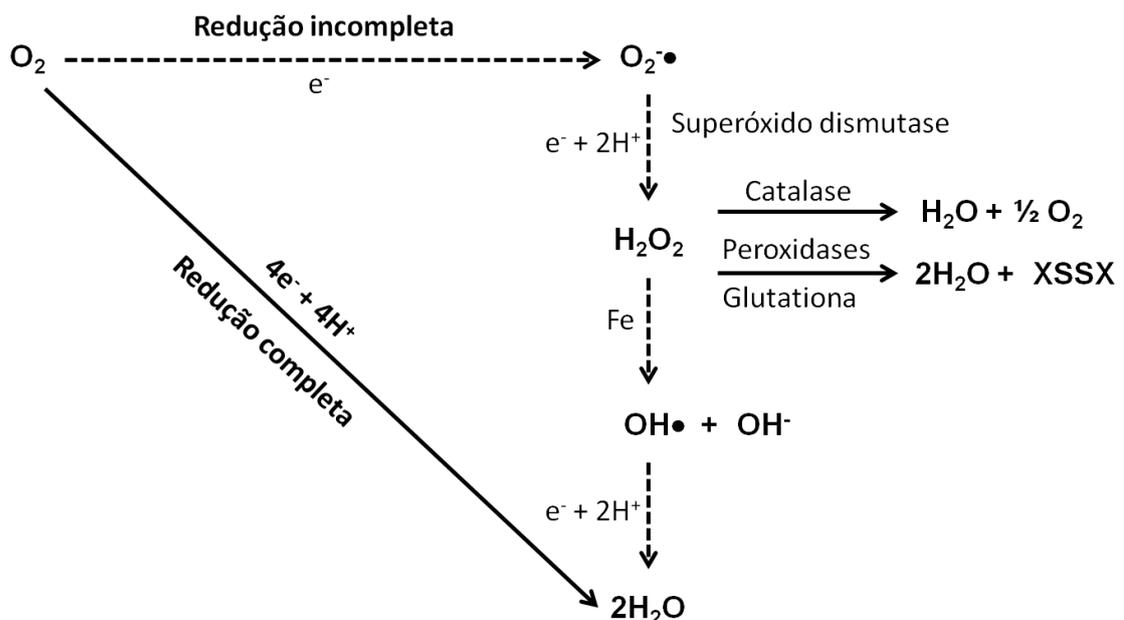
1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Superóxido dismutases	22
1.2 Peroxirredoxinas	24
1.3 Reguladores de estresse oxidativo	26
1.3.1 O ativador de transcrição OxyR	27
1.3.2 O regulador de estresse oxidativo SoxRS	29
1.3.3 Os fatores sigma (σ) da RNA polimerase	29
1.3.4 O regulador Fur	31
1.4 O modelo de estudo: <i>Caulobacter crescentus</i>	32
1.4.1 Estresse oxidativo em <i>Caulobacter crescentus</i>	34
2 MATERIAIS E MÉTODOS	37
2.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo	37
2.2 Preparo de células competentes para eletroporação	37
2.3 Transformação de células competentes por eletroporação	38
2.4 Minipreparação de DNA plasmidial (lise alcalina)	39
2.5 Reação para sequenciamento de DNA e precipitação	39
2.6 Construção da fusão de transcrição ao gene <i>lacZ</i>	40
2.7 Reações em cadeia da polimerase (PCR) com a Taq DNA polimerase	41
2.8 Conjugação	41
2.9 Ensaio de atividade da β-galactosidase	42
2.10 Padronização dos agentes oxidantes nos mutantes	42
2.11 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (quantitativo) - qRT-PCR	43
2.12 Quantificação do pH durante o crescimento de <i>C. crescentus</i>	44
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1 Padronização do cultivo das linhagens em condição de estresse oxidativo	49
3.2 Construção das fusões de transcrição	65
3.3 Análise da expressão de <i>ahpC</i>	70
3.4 Análise da expressão de <i>sodA</i>	85

3.5 Análise da expressão de <i>sodB</i>	97
3.6 Análise da expressão de <i>sodC</i>	108
3.7 Análise geral da expressão e regulação dos genes de resposta a estresse oxidativo	120
4 CONCLUSÕES	124
REFERÊNCIAS	125

1 INTRODUÇÃO

O estresse oxidativo é uma consequência inevitável da forma de vida aeróbica. Os organismos utilizam o oxigênio molecular (O_2) para a respiração ou para a oxidação de nutrientes a fim de obter energia, no entanto, as espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}), são geradas continuamente em células que estão crescendo sob condições aeróbicas. A exposição a concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS) que excedem a capacidade de defesa celular pode levar a danos às proteínas, aos ácidos nucleicos e aos lipídeos, constituindo o estresse oxidativo (revisto por STORZ; IMLAY, 1999).

Figura 1 - Redução do oxigênio molecular



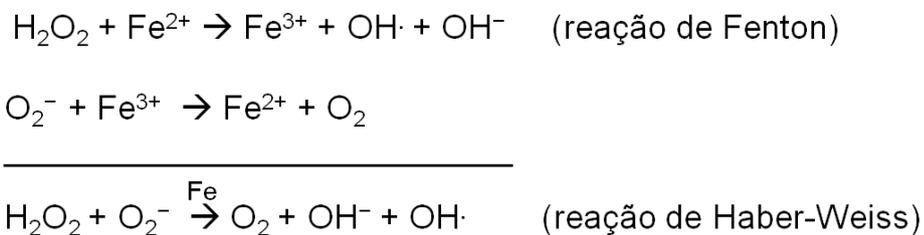
A redução do oxigênio molecular (O_2) pode ocorrer de forma completa ou incompleta. Quando o oxigênio molecular é reduzido completamente à água, não há formação de espécies reativas de oxigênio. No entanto, quando a redução é incompleta, ocorre a formação das espécies reativas: ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\bullet}), que serão retirados por enzimas antioxidantes específicas.

Fonte: adaptado de Gram (1997).

A incompleta redução do oxigênio molecular, que ocorre naturalmente pelo escape de elétrons na cadeia respiratória é a principal fonte endógena de H_2O_2 e de $O_2^{\bullet-}$ (Figura 1). Porém, agentes ambientais como a ionização, a radiação ultravioleta (UV), metais e numerosos componentes, como a menadiona e o paraquat, que

geram $O_2^{\bullet -}$ intracelular, também podem levar ao estresse oxidativo (revisto por CABISCOL et al., 2000). O oxigênio molecular é estável, no entanto espécies reativas de oxigênio podem ser geradas por meio de sua redução. O radical superóxido é resultante da adição de um elétron ao oxigênio molecular, e como esse elétron fica desemparelhado em um orbital, caracteriza o superóxido como radical livre (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O ânion superóxido causa danos às células porque é capaz de oxidar grupos tióis e proteínas com grupos ferro-enxofre levando à formação de ferro livre (DUBBS; MONGKOLSUK, 2007). A redução do O_2 por dois elétrons leva à produção de H_2O_2 , que embora não seja um radical, também é uma espécie reativa de oxigênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O peróxido de hidrogênio é precursor do radical hidroxila, que é gerado via reação de Harber-Weiss ou reação de Fenton (Figura 2). Ambas as reações estão acopladas em um ciclo onde cofatores, particularmente íons de metais de transição, aceleram a reação gerando mais radicais hidroxila que são capazes de oxidar proteínas, lipídeos e o DNA (DUBBS; MONGKOLSUK, 2007; IMLAY; CHIN; LINN, 1988).

Figura 2 - Reação de Fenton e ciclo de Harber-Weiss



Na reação de Fenton o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) sofre fissão eletrolítica com a aquisição de um elétron do Fe^{2+} , que é oxidado a Fe^{3+} , enquanto a H_2O_2 é reduzida gerando um ânion hidroxil (OH^-) e um radical hidroxila (OH^{\bullet}). Na próxima etapa, Fe^{3+} foi reduzido a Fe^{2+} por aceitar um elétron do ânion superóxido ($O_2^{\bullet -}$), o último sendo oxidado para O_2 . A reação ou ciclo de Harber-Weiss é a união da reação de Fenton com a reação entre um superóxido e um Fe^{3+} . Quando essas duas reações estão acopladas forma-se um ciclo, que resulta numa reação onde o ferro é o cofator.
Fonte: adaptado de Dubbs e Mongkolsuk (2007).

Outro processo bioquímico que também gera agentes oxidantes é o processo de desnitrificação: $NO^3- \rightarrow NO^2- \rightarrow NO^{\bullet} \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ (CHIANG; SCHELLHORN, 2012). O processo inicia-se com o nitrato que é reduzido a nitrito, óxido nítrico, óxido nitroso e nitrogênio elementar. O óxido nítrico (NO^{\bullet}) é um composto tóxico, que na presença de superóxido, converte-se espontaneamente a peroxinitrito: $NO^{\bullet} + O_2^{\bullet -} = ONOO^-$. O peroxinitrito ($ONOO^-$) é um oxidante forte que pode oxidar compostos

com grupos tióis (DUBBS; MONGKOLSUK, 2007; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Por estas razões, a maioria dos organismos aeróbicos possui mecanismos múltiplos e frequentemente sobrepostos para remover as espécies reativas de oxigênio. Para tanto, as células contam com uma quantidade considerável de enzimas com atividade antioxidante e de reparo que podem diferir no tempo de expressão, na localização subcelular ou na regulação. Muitas destas proteínas com propriedades antioxidantes são expressas em níveis baixos durante o crescimento normal, e tem a expressão aumentada em resposta a concentrações elevadas de H_2O_2 e de $O_2^{\cdot-}$ (STORZ; IMLAY, 1999).

Baseado no modelo de *Escherichia coli*, o paradigma simplificado do sistema de resposta a estresse oxidativo em bactérias assume que radicais superóxido são removidos pelas superóxido-dismutases (SodA, SodB e SodC), gerando peróxido de hidrogênio, o qual é removido pelas catalases (KatE e KatG) e pelas peroxidases (Ahp). Entretanto, mais de outras 100 proteínas acessórias foram identificadas em *E. coli* agindo nesta resposta (POOLE, 2005).

1.1 Superóxido dismutases

As superóxido dismutases (SODs) são enzimas antioxidantes encontradas em todos os organismos expostos a O_2 (BAFANA et al., 2011). Elas são responsáveis pela conversão do superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular (FRIDOVICH, 1995): $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$.

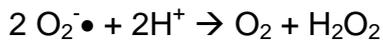
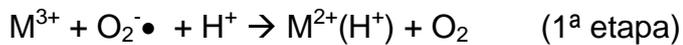
Quatro diferentes tipos de centros de metais são encontrados nas superóxido dismutases, dividindo essa família em Cu/ZnSOD, FeSOD, MnSOD e NiSOD. Enquanto os dois maiores grupos, CuZnSODs e FeSODs/MnSODs, tiveram origens independentes, FeSODs e MnSODs são resultado de duplicação gênica, sendo FeSOD o ancestral (BAFANA et al., 2011).

A CuZnSOD é encontrada em eucariotos, cloroplastos e bactérias. Em bactérias ela localiza-se no periplasma e é codificada pelo gene *sodC*. A MnSOD ocorre em procariontes e na mitocôndria, sendo codificada pelo gene *sodA* em procariontes. Enquanto que a FeSOD é codificada pelo gene *sodB* em procariontes, e também pode ser encontrada nos cloroplastos (BAFANA et al., 2011; CHIANG;

SCHELLHORN, 2012; IMLAY; IMLAY, 1996). A enzima dependente de níquel, SodN, foi descrita apenas em *Streptomyces* e cianobactérias (BAFANA et al., 2011).

A CuZnSOD é geralmente encontrada como homodímero, cada monômero pesa 14-33 kDa e contém um átomo de Cu e outro de Zn. A FeSOD e a MnSOD são tipicamente homodímeros ou tetrâmeros que contém um átomo de metal por subunidade de 14-30 kDa. Já a NiSOD, geralmente funciona como homohexâmero, com massa de aproximadamente 13 kDa para cada subunidade (BAFANA et al., 2011).

O mecanismo catalítico das SODs é uma reação de dismutação que ocorre em duas fases como demonstrado abaixo, onde a letra M representa o cofator metálico presente em cada enzima (AUCHÈRE; RUSNAK, 2002; BAFANA et al., 2011).



E. coli possui três superóxido dismutases: MnSOD, FeSOD e CuZnSOD, e a produção de cada enzima é dependente de reguladores transcricionais globais. Com isso, a expressão dessas enzimas é modulada de acordo com condições ambientais específicas (BAFANA et al., 2011; COMPAN; TOUATI, 1993). Nessa bactéria, o gene *sodA* que codifica a enzima MnSOD, é regulado por várias proteínas, indicando a existência de competição entre reguladores de resposta para diferentes sinais (BAFANA et al., 2011; COMPAN; TOUATI, 1993). A ativação desencadeada por SoxRS ocorre em resposta a geração de superóxido, e essa regulação não compete com outros reguladores aeróbicos. O regulador do metabolismo de ferro, Fur, também regula *sodA* reprimindo-o em aerobiose. Em anaerobiose, Fur ou ArcA (controle de regulação aeróbico) juntamente com Fnr (fumarato nitrato redutase) e IHF (fator de interação com o hospedeiro) reprimem *sodA* (COMPAN; TOUATI, 1993). Além disso MarA, o ativador transcricional do operon de resistência múltipla a antibióticos *marARB*, também ativa *sodA* (JAIR et al., 1995).

O gene *sodB* que codifica a enzima FeSOD em *E. coli*, é regulado positivamente por Fur por meio do pequeno RNA RyhB (MASSÉ; GOTTESMAN, 2002; MASSÉ; VANDERPOOL; GOTTESMAN, 2005). Além disso, a proteína

ligadora de RNA, denominada Hfq, auxilia Fur na regulação de *sodB*, possivelmente auxiliando RyhB no pareamento RNA-RNA, pois Hfq demonstrou-se necessária para a atividade de RyhB (MASSÉ; GOTTESMAN, 2002). As proteínas IHF e H-NS, também afetam a expressão de *sodB* (BAFANA et al., 2011). IHF é capaz de reprimir a expressão de *sodB* independentemente de Fur. Enquanto H-NS, uma proteína responsável pela condensação do DNA no nucleóide bacteriano em enterobactérias, regula-o negativamente apenas na ausência de Fur, (DUBRAC; TOUATI, 2000).

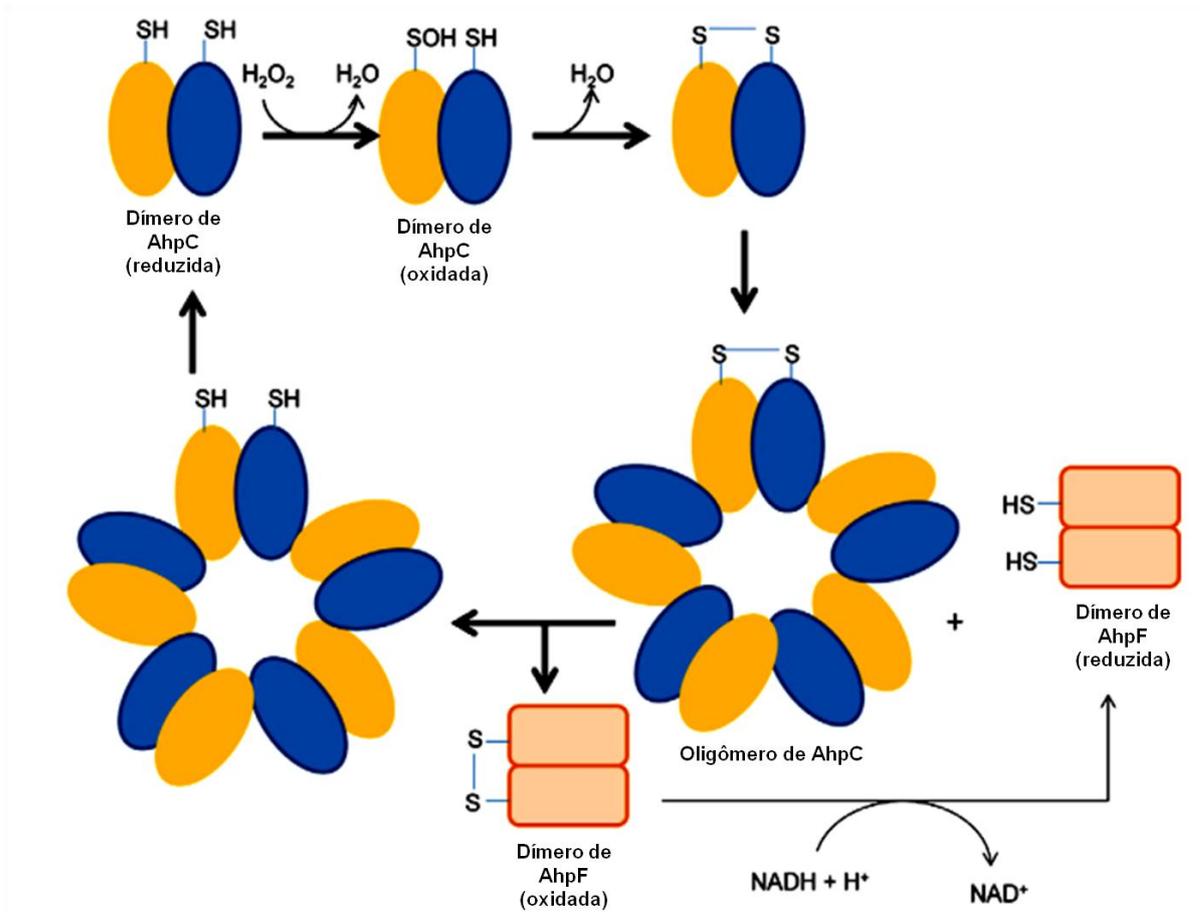
Quanto à regulação do gene *sodC* que codifica a proteína CuZnSOD em *E. coli*, sabe-se que ele é reprimido por Fnr em condição anaeróbica e é induzido em fase estacionária pelo fator sigma RpoS (GORT; FERBER; IMLAY, 1999).

1.2 Peroxirredoxinas

As peroxirredoxinas são um importante componente da defesa bacteriana contra a toxicidade dos peróxidos (DUBBS; MONGKOLSUK, 2007). A proteína AhpC (Alkylhydroperoxidase) faz parte de uma grande família de peroxidases baseadas em cisteína, chamadas de peroxirredoxinas (MISHRA; IMLAY, 2012; POOLE, 2005). O seu substrato pode variar entre os organismos, uma vez que essa proteína tem a habilidade de reduzir vários peróxidos devido à presença de um grande arcabouço hidrofóbico no sítio ativo (DUBBS; MONGKOLSUK, 2007; WOOD et al., 2002; WOOD et al., 2003). Dentre os possíveis substratos encontram-se o H₂O₂, o tert-butil hidroperóxido, que é um peróxido orgânico simples, e os peróxidos orgânicos complexos, tais como o hidroperóxido de cumeno, hidroperóxido de ácido lipóico, hidroperóxido de timidina e peroxinitrito (revisto por DUBBS; MONGKOLSUK, 2007).

Todas as AhpCs são membros da família de peroxirredoxinas com duas cisteínas, por isso elas possuem dois resíduos conservados de cisteína que são essenciais para a sua função catalítica. A cisteína 46 corresponde à cisteína peroxidática (*peroxidatic cysteine*), e a cisteína 165 que é a cisteína de resolução (*resolving cysteine*) (WOOD et al., 2002). Nessas proteínas do tipo 2-Cys típicas (com formação de ponte dissulfeto intermolecular), a cisteína peroxidática reage com o peróxido (ROOH) originando o álcool correspondente (ROH) ou água quando for H₂O₂, e a cisteína com o ácido sulfênico (Cys-SOH). Esta Cys-SOH é então reduzida pelo resíduo tiol da cisteína de resolução, formando uma ponte dissulfeto entre os dois resíduos e liberando uma molécula de água (Figura 3) (POOLE et al., 2000).

Figura 3 – Ciclo catalítico de AhpC



No ciclo catalítico do sistema AhpR, a enzima AhpC é a alquil-hidroperóxido redutase e AhpF é a dissulfeto redutase. A enzima AhpC reduzida forma dímeros, mas após sua oxidação pela reação com H_2O_2 , ela pode formar oligômeros. AhpF é uma enzima que também forma dímeros e na presença de NAD(P)H é capaz de reduzir cada dímero do oligômero de AhpC, à sua forma ativa. O homodímero de AhpC possui dois sítios catalíticos, contudo, nesta figura apenas um sítio foi esquematizado indicando os grupos tióis envolvidos na reação.

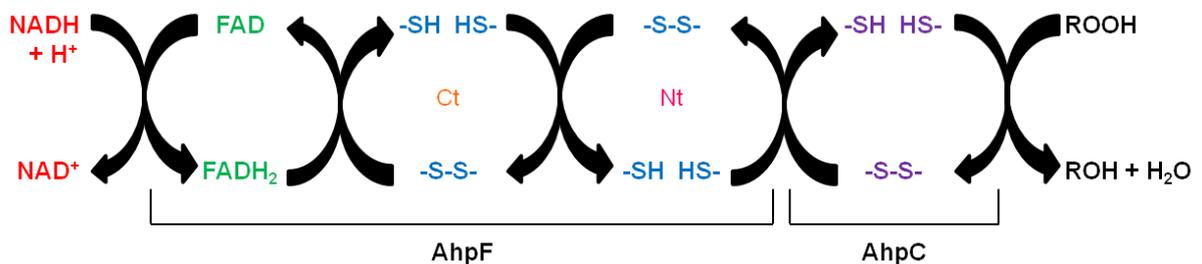
Fonte: adaptado de Mishra e Imlay, 2012.

Para completar esse ciclo catalítico é necessário um sistema dissulfeto redutase para reduzir a ponte dissulfeto intermolecular formada entre as duas cisteínas. As bactérias utilizam um sistema dissulfeto redutase acoplado ao NADH ou NADPH (Figura 3). Nesse sistema podem existir enzimas que são específicas para reduzir AhpC, ou enzimas que atuam de forma mais abrangente, como o sistema tiorredoxina/tiorredoxina redutase. Dentre as enzimas específicas que reduzem AhpC encontra-se a enzima AhpF (DUBBS; MONGKOLSUK, 2007).

A proteína AhpF é uma flavoproteína presente apenas em bactérias que age como uma redutase de AhpC dependente de NAD(P)H, por meio de dois resíduos de cisteína no domínio amino-terminal (MISHRA; IMLAY, 2012; POOLE, 2005)

(Figura 3). A porção C-terminal de AhpF é estruturalmente e funcionalmente homóloga às tioredoxinas redutases bacterianas. Ele contém um FAD (dinucleotídeo de flavina-adenina) e o nucleotídeo de piridina no sítio de ligação juntamente com um motivo ativo redox CXXC. A região N-terminal possui um motivo adicional CXXC. Para que AhpC volte ao seu estado ativo, os elétrons do NAD(P)H são transferidos, via FAD e o dissulfeto do C-terminal, para o N-terminal dissulfeto da AhpF que finalmente oxida AhpC (Figuras 3 e 4) (POOLE et al., 2000).

Figura 4 – Sequência da transferência de elétrons nos centros redox da peroxirredoxina redutase



Dois elétrons do NADH (acompanhados por dois H⁺) são transferidos entre três centros redox na proteína AhpF através da flavina (FAD), do centro dissulfeto C-terminal (Ct) e do centro dissulfeto N-terminal (Nt). Em seguida, os elétrons passam para a ligação dissulfeto intersubunitária da peroxirredoxina AhpC, depois para o substrato hidroperóxido.

Fonte: adaptado de Poole et al. (2000).

O gene *ahpC*, que codifica a proteína AhpC em *E. coli*, tem sua expressão regulada por OxyR por meio da ligação direta à sua região promotora. Em *Bacillus subtilis*, *Campylobacter jejuni* e *Staphylococcus aureus*, o repressor transcricional PerR tem sido identificado como regulador da expressão de *ahpC* na presença de peróxidos (revisto por DUBBS; MONGKOLSUK, 2007).

1.3 Reguladores de estresse oxidativo

A existência de uma resposta adaptativa a H₂O₂ foi primeiramente descoberta em *E. coli*. Foi demonstrado que esta bactéria possui um sistema de defesa específico induzido por peróxidos, mediado pelo ativador de transcrição OxyR, e outro mecanismo induzido por superóxidos, controlado pelos reguladores SoxR e SoxS (CABISCOL et al., 2000).

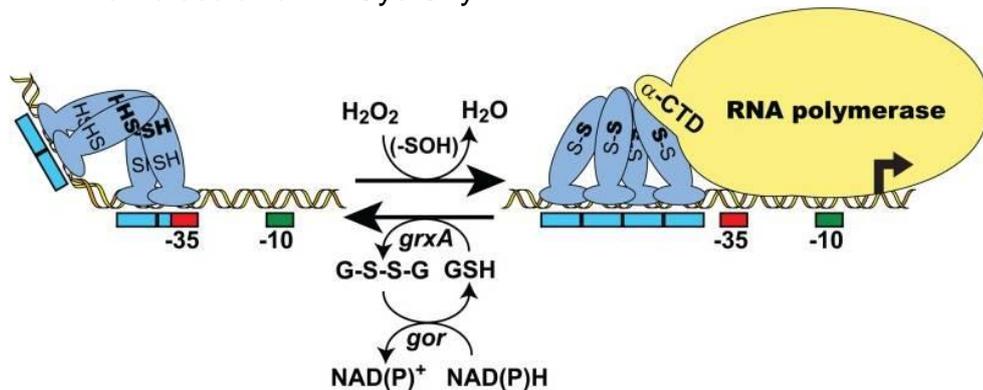
1.3.1 O ativador de transcrição OxyR

OxyR é um regulador transcricional sensível a H_2O_2 (KULLIK et al., 1995). Ele é uma proteína pertencente à família LysR, com 34 kDa, que forma homotetrâmeros (CHRISTMAN; STORZ; AMES, 1989). Os membros da família Lys-R possuem um domínio de ligação ao DNA na região N-terminal denominado hélice-alça-hélice, um domínio central de reconhecimento do indutor de resposta, que é sensível ao sinal regulatório, e um domínio C-terminal responsável pela multimerização e ativação. A proteína OxyR atua principalmente como um ativador transcricional sob condições oxidantes por meio da interação direta com a subunidade α da RNA polimerase (revisto por DUBBS; MONGKOLSUK, 2012). O gene *oxyR* codifica uma proteína com dupla função, que age como sensor de estresse causado por peróxidos e como ativador de transcrição do regulon OxyR. Estudos mostraram que OxyR é ativado, de maneira reversível, pela formação de uma ponte dissulfeto intramolecular, entre os resíduos de cisteína das posições 199 e 208, na presença de H_2O_2 (Figura 5) (STORZ; ZHENG, 2000).

A ativação de OxyR inicia-se com a oxidação do resíduo (SH) da cisteína sensora a ácido sulfênico (-SOH), em seguida ocorre uma rápida formação da ponte dissulfeto intramolecular com a cisteína de resolução (SH). Isso resulta numa mudança conformacional que permite a interação de OxyR com a RNA polimerase. A ativação da transcrição envolve a interação direta de OxyR com a subunidade alfa (α) da RNA polimerase no domínio C-terminal (α -CTD). O regulador OxyR oxidado volta à sua forma reduzida com o auxílio da doadora de elétrons glutationa redutase (GSH), por meio do sistema glutarredoxina (*grxA*)/glutationa redutase (*gor*), com NAD(P)H sendo o doador de elétrons para glutationa redutase (DUBBS; MONGKOLSUK, 2012).

Estudos recentes indicam que existem outros mecanismos para a ativação de OxyR. Esses mecanismos geralmente envolvem a oxidação de apenas um resíduo de cisteína, e foram realizados com OxyR de *Pseudomonas aeruginosa* e *Deinococcus radiodurans*. Além disso, num estudo com OxyR de *E. coli in vitro*, somente a oxidação do resíduo C199 foi suficiente para a ativação do regulador transcricional na ausência da formação da ponte dissulfeto (revisto por DUBBS; MONGKOLSUK, 2012).

Figura 5 – Mecanismo da ativação da transcrição via formação de ponte dissulfeto intramolecular em 2-Cys OxyR



Modelo dependente de H_2O_2 , para a ativação da transcrição dos genes alvos por OxyR em *E. coli*. As caixas vermelhas e verdes indicam as regiões -35 e -10 do promotor. As caixas azuis indicam as regiões de ligação do OxyR ao DNA. A ativação também pode ocorrer via modificação oxidativa apenas da cisteína sensora.

Fonte: retirado de Dubbs e Mongkolsuk (2012).

O regulon OxyR de *E. coli* inclui genes envolvidos no metabolismo e proteção contra peróxidos (*katG*, *ahpC*, *ahpF*, *dps*), no balanço redox (*gor*, *grxA*, *trxC*) e reguladores importantes como *fur* e *oxyS*. A catalase-peroxidase KatG e as duas subunidades da alquil-hidroperóxido redutase (codificadas pelo operon *ahpCF*) protegem contra os efeitos tóxicos dos peróxidos, por meio da eliminação direta dos oxidantes. A indução da glutathione redutase (*gorA*), da glutarredoxina (*grxA*), e da tiorredoxina 2 (*trxC*), ajuda na manutenção do balanço celular de tiol-dissulfeto (revisto por STORZ; ZHENG, 2000). A proteína Dps, que se liga ao DNA de maneira não específica, protege contra dano ao DNA e mutação (MARTINEZ; KOLTER, 1997).

Em outras bactérias OxyR também regula genes envolvidos na resposta a estresse oxidativo. Ele reprime a expressão de *katG* de *Burkholderia pseudomallei* e *katA* de *Sinorhizobium meliloti* durante o crescimento normal, e ativa estas catalases-peroxidases durante exposição ao estresse oxidativo (LOPRASERT et al., 2003; LUO et al., 2005). Em *Xanthomonas campestris*, OxyR promove a regulação compensatória entre os genes *katA* e *ahpC* (CHAROENLAP et al., 2005). Quando *katA* está inativo ocorre um aumento de expressão de AhpC, juntamente com o aumento da resistência a peróxido orgânico. Enquanto, a inativação do gene *ahpC* levou ao aumento da expressão de KatA, com concomitante aumento da resistência a peróxido de hidrogênio. Contudo, esse padrão de expressão compensatório foi perdido no mutante $\Delta oxyR$. Essa regulação compensatória entre *katA* e *ahpC*,

também foi descrita em *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis* (CHAROENLAP et al., 2005).

1.3.2 O regulador de estresse oxidativo SoxRS

A proteína SoxR é um ativador de transcrição da família MerR, que ao ser oxidada, ativa a transcrição do operon *soxRS*, aumentando a expressão de SoxS. SoxS é um ativador de transcrição da família AraC, e o nível elevado de SoxS, por sua vez, ativa a expressão do regulon, por meio da ligação direta à RNA polimerase, levando-a aos promotores (STORZ; IMLAY, 1999; ZAFAR; SANCHEZ-ALBEROLA; WOLF JR, 2011).

Um processo de dois estágios é responsável pela regulação de *soxRS*: inicialmente a proteína SoxR é convertida em sua forma ativa (oxidada) por oxidação de seus centros [2Fe-2S] (NUNOSHIBA et al., 1992). Acreditava-se que esta oxidação era resultado da presença de superóxidos, porém, foi demonstrado que essa oxidação ocorre em resposta a drogas redox-ativas (GU; IMLAY, 2011; IMLAY, 2013). A ativação de SoxR estimula a transcrição de um único gene, *soxS*. Com isso, SoxS é sintetizado em grande quantidade e ativa a transcrição dos genes do regulon *soxRS* (NUNOSHIBA et al., 1992). O regulon SoxRS de *E. coli* inclui genes envolvidos na resposta a estresse oxidativo, como o gene *sodA* (MnSOD); no reparo de DNA, por exemplo, *nfo* (endonuclease IV), e para proteção de proteínas com grupos Fe-S, como o gene *yggX*, que codifica uma proteína que protege grupos ferro-enxofre contra danos oxidativos (revisto por CHIANG; SCELLHORN, 2012).

1.3.3 Os fatores sigma (σ) da RNA polimerase

Vários outros fatores, além de SoxRS e OxyR, modulam a expressão de genes antioxidantes, e dentre estes se encontram os fatores sigma. A subunidade da RNA polimerase, denominada fator sigma, é responsável pelo reconhecimento da região promotora de genes específicos, por isso, a expressão gênica pode ser controlada por meio de diferentes fatores sigma, que estão associados ao cerne da RNA polimerase. O fator sigma mais abundante na célula bacteriana, responsável pela transcrição dos genes basais, é o sigma⁷⁰ (MARQUES, 2012). Existem duas famílias de fatores sigma, distintas pelas suas origens filogenéticas, que são denominadas

sigma 70 e sigma 54. Em *E. coli*, a família do sigma 70, inclui os genes: *rpoD* (sigma 70), *rpoH* (sigma 32), *rpoE* (sigma E), *rpoS* (sigma S), *fecI* (sigma Fecl) e *fliA* (sigma F). A família do sigma⁵⁴ é representada apenas pelo gene *rpoN*, que codifica o próprio sigma⁵⁴, responsável pela transcrição dos genes de resposta à carência de nitrogênio (MARQUES, 2012).

Dentre os fatores sigma de *E. coli*, o fator σ^S da RNA polimerase possui um papel importante na expressão de um grande grupo de genes que são induzidos quando as células são expostas a diferentes tipos de estresse, incluindo carência nutricional, estresse osmótico, choque ácido, assim como no início da fase estacionária nas células. Nessa bactéria, o regulon RpoS inclui os genes envolvidos na resposta ao estresse oxidativo (como *katE*, *xthA* e *sodC*), nas mudanças metabólicas, e nas alterações morfológicas (LACOUR; LANDINI, 2004).

O fator sigma E, em *E. coli*, é responsável pela transcrição dos genes de resposta periplasmática ao calor e estresses desnaturantes. Este fator sigma pertence à subfamília denominada sigma ECF (*extracytoplasmic factor*), sendo o único fator de *E. coli* da subfamília dos fatores sigma de função extracitoplasmática. Contudo, em outras bactérias existem outros fatores sigma ECF responsáveis pela resposta a várias mudanças ambientais, permitindo a adaptação a diversos ambientes (MARQUES, 2012).

Em *Caulobacter crescentus*, a análise do genoma identificou 16 fases de leitura abertas que possivelmente codificam fatores sigma, das quais 13 podem pertencer à subfamília ECF (NIERMAN; FELDBLYUM; LAUB, 2001). Nesta bactéria, os fatores sigma codificados pelos genes *rpoD* (sigma 70), *rpoH* (sigma 32) e *rpoN* (sigma 54) tiveram suas funções identificadas: o sigma 70 é a principal subunidade sigma, o sigma 32 é responsável pela transcrição dos genes de resposta a choque de calor, enquanto a proteína sigma 54 está envolvida na regulação dos genes para síntese do flagelo (ANDERSON et al., 1995; MALAKOOTI; ELY, 1995; REISENAUER; MOHR; SHAPIRO, 1996; WU; NEWTON, 1996;). Os fatores sigma de função extracitoplasmática também começaram a serem identificados em *C. crescentus*: os fatores sigma T e U, são parálogos e codificados pelos genes *sig^T* e *sig^U* respectivamente, eles estão envolvidos na resposta aos metais pesados cádmio e cromo; enquanto os fatores sigma E e sigma F, auxiliam na resposta a estresse oxidativo (ALVAREZ-MARTINEZ; BALDINI; GOMES, 2006; ALVAREZ-MARTINEZ et

al., 2007; KOHLER et al., 2012; LOURENÇO; GOMES, 2009; LOURENÇO; KOHLER; GOMES, 2011).

Os fatores sigma ECF, geralmente possuem quatro características. Inicialmente, os fatores sigma ECF contêm apenas os domínios σ_2 e $\sigma_{4.2}$, e estes são homólogos aos domínios do sigma 70, também denominados domínios σ_2 e $\sigma_{4.2}$. Esses domínios são responsáveis pela ligação à região promotora (-35 e -10) dos genes alvos. A segunda característica refere-se ao fato de que muitos fatores sigma ECF são autorregulados. Como terceira característica, os fatores sigma ECF, na maioria das vezes, são regulados por um fator antissigma, caracterizado principalmente como uma proteína de membrana, que é frequentemente transcrita no mesmo operon que o fator sigma ECF correspondente. Finalizando, a atividade do fator sigma ECF é ativada por meio da inativação da atividade do fator antissigma. Esta inativação do fator antissigma pode ocorrer por diversos mecanismos: degradação do fator antissigma, mudança conformacional ou fosforilação por um fator anti-antissigma (revisto por HO; ELLERMEIER, 2012).

A subfamília dos fatores sigma ECF é um grupo amplo e diverso, com variação do número de ECFs presente em grupos distintos de bactéria. As classes denominadas ECF01-ECF04, por exemplo, ocorrem em vários grupos de bactérias e incluem o fator sigma E de *E. coli* e o fator sigma W de *Bacillus subtilis*. Enquanto a classe ECF15 está presente apenas em α -proteobactérias, que inclui o gênero *Caulobacter* (STARONÍ et al., 2009).

1.3.4 O regulador Fur

O ferro intracelular livre é oxidado por H_2O_2 gerando o radical hidroxil por meio da reação de Fenton. Por isso, o controle homeostático dos níveis de ferro livre diminuem o estresse oxidativo (IMLAY, 2003).

Em procariotos, um fator de transcrição denominado Fur regula negativamente a transcrição de muitos genes envolvidos na captação do íon férrico do ambiente (ANDREWS; ROBINSON; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, 2003). O repressor Fur é o principal regulador da homeostase de ferro e é ativado pela ligação com Fe (II) e Fe (III). Após sua ativação Fur liga-se ao DNA, em sequências denominadas Fur-box, reprimindo os genes de aquisição de ferro. Na ausência de ferro, Fur é inativado e com isso os genes do seu regulon não estão mais reprimidos (CHEN et al., 2007).

Foi demonstrado, em *E. coli*, que Fur regula negativamente a expressão do pequeno RNA RyhB, que por sua vez, reprime a tradução do RNAm de *sodB*, explicando o controle positivo de *sodB* por Fur. Em *Vibrio cholerae* foi demonstrado que Fur regula positivamente os genes *sodA* (superóxido dismutase), *fumC* (fumarato desidratase), *bfr* (bacterioferritina) e outros (MEY et al., 2005).

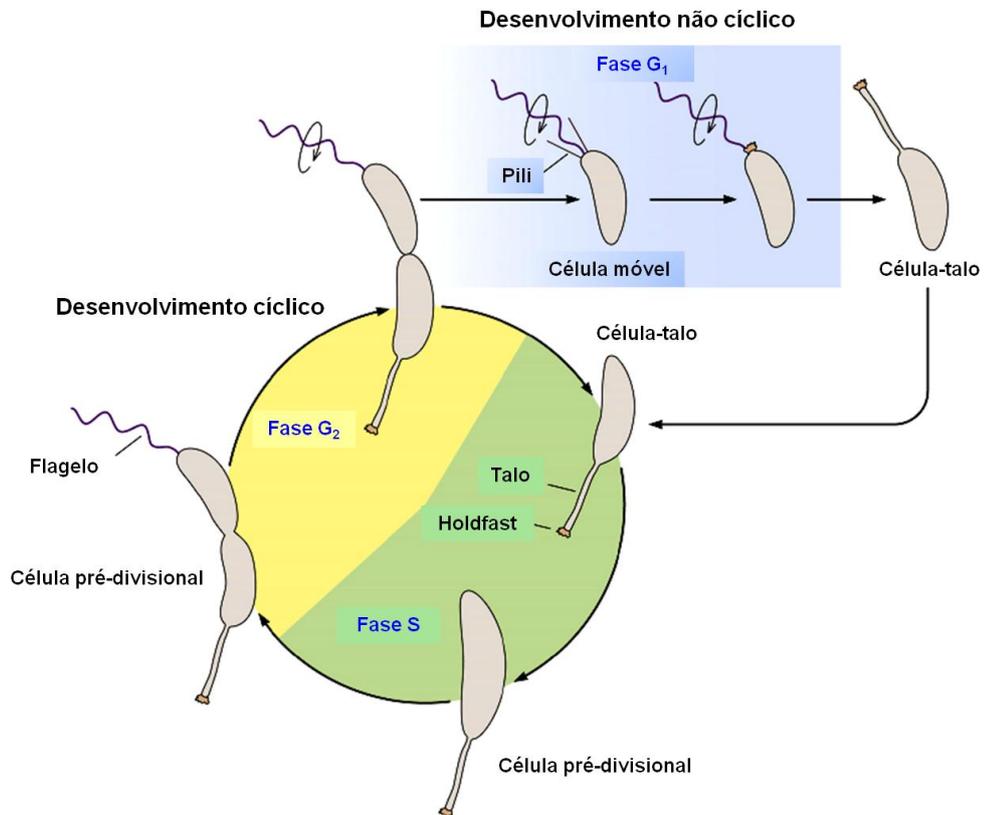
A homeostase de ferro e a resposta a estresse oxidativo são conectadas por meio de interações regulatórias. Em *E. coli*, o controle do metabolismo de ferro é parte integrante da resposta de defesa a antioxidantes, e Fur é regulado tanto por OxyR como por SoxRS (ZHENG et al., 1999). O mutante Δfur de *E. coli* é mais sensível ao H_2O_2 que as cepas proficientes em Fur (TOUATI et al., 1995). Em *Mycobacterium smegmatis*, a sensibilidade a H_2O_2 é aumentada na carência de ferro (LUNDRIGAN et al., 1997); em *Staphylococcus aureus*, Fur é necessário para a resistência ao estresse oxidativo (HORSBURG; INGHAM; FOSTER, 2001); em *Streptomyces* spp., as proteínas similares a Fur regulam os genes da catalase-peroxidase de maneira dependente de ferro (ZOU et al., 1999), e em *Borrelia burgdorferi*, Fur pode funcionar como um repressor e regular os genes de estresse oxidativo (KATONA et al., 2004).

1.4 O modelo de estudo: *Caulobacter crescentus*

O gênero *Caulobacter* de bactérias Gram-negativas compreende espécies não patogênicas, cujo hábitat inclui todos os ambientes aquáticos e muitos tipos de solo (POINDEXTER, 1981). A espécie *C. crescentus*, pertence ao grupo das α -proteobactérias, e tem sido extensivamente investigada em função da assimetria da divisão celular e do ciclo de vida dimórfico (HOLTZENDORFF; REINHARDT; VIOLLIER, 2006; LAWLER; BRUN, 2006). Esse tipo de desenvolvimento resulta num estilo de vida que a ajuda a sobreviver em ambientes com limitação de nutrientes, sendo *Caulobacter crescentus* a espécie oligotrófica de ambiente aquático mais estudada (CURTIS; BRUN, 2010). As células de *C. crescentus* são encontradas predominantemente em dois morfotipos. O primeiro é planctônico, denominada “célula móvel” (*swarmer cell*), possui um único flagelo e múltiplos pili em um único pólo celular. O segundo é sésil, denominada “célula talo” (*stalked cell*), onde o flagelo polar é substituído por uma extensão do envelope celular denominado prosteca ou talo. O talo possui em sua ponta um polissacarídeo adesivo,

denominado *holdfast*, que mantém a célula fixa ao substrato (Figura 6) (CURTIS; BRUN, 2010; DEGNEN; NEWTON, 1972).

Figura 6 – Ciclo de vida de *Caulobacter crescentus*



O programa de desenvolvimento cíclico tem início com uma célula talo (sésil). A célula talo entra em fase S e, à medida que a célula cresce e replica o DNA, ela torna-se uma célula pré-divisional. Na fase pré-divisional tardia, um flagelo é formado no pólo da célula móvel. Após a compartimentalização, a rotação flagelar é ativada (seta circular). A separação celular leva a dois diferentes tipos de células: uma célula talo que entra novamente no programa cíclico de desenvolvimento na fase S, completando o ciclo; e uma célula móvel que não replica seu cromossomo e, se encontra na fase G₁. O talo é formado predominantemente durante o estágio de célula móvel. Posteriormente, a célula móvel se diferencia em uma célula talo. Esta diferenciação compreende o programa de desenvolvimento não cíclico.

Fonte: adaptado de Curtis e Brun (2010).

O ciclo de vida começa com uma célula móvel que não pode iniciar a replicação do DNA e permanece na fase G₁ com um único cromossomo. Em resposta a sinais ainda desconhecidos, a célula móvel se diferencia na célula sésil quando o flagelo é liberado. Um talo é construído no mesmo local do flagelo descartado e simultaneamente a célula entra na fase S e inicia a replicação do DNA. A replicação de DNA e a segregação dos cromossomos-filhos para as extremidades opostas da célula pré-divisional ocorrem respectivamente, durante a fase S e em

uma breve fase G2. Antes de se dividir, a célula pré-divisional também constrói um novo flagelo e começa a construir novos pili no pólo oposto ao talo. Uma vez que o flagelo esteja completo, a divisão celular prossegue, produzindo uma célula-talo que imediatamente reinicia a replicação do DNA, e uma célula móvel que não pode começar a replicação do DNA até que ocorra a diferenciação de móvel para sésil (Figura 6) (CURTIS; BRUN, 2010; LAUB; SHAPIRO; MCADAMS, 2007).

1.4.1 Estresse oxidativo em *Caulobacter crescentus*

A resposta ao estresse oxidativo em *C. crescentus* foi investigada bioquimicamente há algum tempo e mais recentemente os sistemas regulatórios envolvidos têm sido objeto de interesse de nosso laboratório e de outros. Os estudos de Schnell e Steinman (1995) mostraram que *C. crescentus* possui duas atividades de superóxido dismutases: uma ferro superóxido dismutase (FeSOD) presente no citosol, e uma cobre-zinco superóxido dismutase (CuZnSOD), encontrada no periplasma. Entretanto, existe mais um gene (*sodA*) no cromossomo que pode codificar a superóxido-dismutase de manganês (NIERMAN; FELDBLYUM; LAUB, 2001), que ainda não foi caracterizado.

No trabalho de Alvarez-Martinez, Baldini e Gomes (2006), foi demonstrado que o fator de função extracitoplásmica σ^F é essencial para a resposta ao estresse oxidativo na fase estacionária de *C. crescentus*, pois a resistência do mutante *sigF* foi severamente diminuída na presença de peróxido de hidrogênio, exclusivamente nesta fase do crescimento. A análise do transcriptoma do mutante *sigF* também permitiu a identificação de oito genes regulados por σ^F na fase estacionária, incluindo *sodA* e *msrA*, que fazem parte da resposta ao estresse oxidativo, uma vez que gene *sodA* codifica a proteína MnSOD, e o gene *msrA* codifica o peptídeo metionina sulfóxido redutase (MsrA), responsável pelo processo de redução do resíduo oxidado da metionina, denominado sulfóxido de metionina, permitindo que a metionina retorne ao seu estado ativo após interações com espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (ALVAREZ-MARTINEZ; BALDINI; GOMES, 2006; WEISSBACH et al., 2002). Outro fator sigma da família ECF, RpoE, regula a expressão de genes de resposta a cádmio, hidroperóxido orgânico, oxigênio singlete e irradiação por UV-A (LOURENÇO; GOMES, 2009). Dentre os genes regulados por RpoE, encontram-se os genes *rpoE*, *cfaS* e *hsp20* que foram necessários para a

sobrevivência de *C. crescentus* quando as células foram expostas ao oxigênio singlete (LOURENÇO; GOMES, 2009).

C. crescentus possui uma única catalase-peroxidase, codificada pelo gene *katG*, cuja atividade é constante durante a fase exponencial e é induzida em cerca de 50 vezes na fase estacionária (STEINMAN; FAREED; WEINSTEIN, 1997). Além disso, a sobrevivência do mutante *katG* nulo de *C. crescentus* é reduzida em mais de três vezes após 24 horas na fase estacionária, e em mais de seis vezes após 48 horas (STEINMAN; FAREED; WEINSTEIN, 1997), um fenótipo não visto para os mutantes *katE* e *katG* nulos de *E. coli* (MULVEY et al., 1990). Estes resultados apontam para um papel principal da catalase-peroxidase na sobrevivência de *C. crescentus* na fase estacionária (STEINMAN; FAREED; WEINSTEIN, 1997). O trabalho do nosso grupo observou que a expressão do gene *katG* é regulado em nível de transcrição e possivelmente pós-transcricionalmente (ITALIANI; MARQUES, 2010; ITALIANI et al., 2011). A regulação transcricional de *katG* é feita pela proteína OxyR, sendo este fator responsável pelo aumento da expressão na fase estacionária e em resposta a H₂O₂ (ITALIANI et al., 2011). O sítio de ligação deste fator foi identificado em *Caulobacter*, e foi mostrado que a proteína precisa estar oxidada para ligar-se ao promotor (ITALIANI et al., 2011).

Muitas proteínas envolvidas no estresse oxidativo estão sob controle do ciclo celular em *Caulobacter crescentus*. Estas proteínas são a GTP ciclodrolase II, tiorredoxina, tiorredoxina redutase, glutathione S-transferase e o regulador de captura de ferro Fur. A proteína Fur é induzida no começo da fase S, enquanto duas proteínas de captura de ferro dependentes de TonB (CC_3500 e CC_3146) são reprimidas na fase S e induzidas nas fases G1 ou G2 (GRUNENFELDER et al., 2001). Desta maneira, as células mantêm a concentração de ferro baixa na fase S para prevenir o dano ao DNA durante a replicação. Outro trabalho do nosso grupo determinou o regulon do fator regulador Fur, que regula vários genes em resposta a carência de ferro (SILVA NETO et al., 2009). Nesta análise, nenhum dos genes estudados neste trabalho foram identificados como possuindo sítios de ligação de Fur em seu promotor. Este fato também foi confirmado para o gene *katG*, que não é regulado por Fur em *Caulobacter* (ITALIANI et al., 2011). Entretanto, foi observado que a atividade da enzima SodB é diminuída no mutante *fur* (José F. S. Neto, resultados não publicados), sugerindo que existe outro mediador desta resposta. Este mediador poderia ser um pequeno RNA regulatório como o RNA RyhB descrito

em *E. coli*. Vários pequenos RNAs regulatórios foram identificados em *Caulobacter*, mas poucos têm função atribuída, e ainda são desconhecidos os especificamente envolvidos no metabolismo de ferro (LANDT et al., 2008). Recentemente, foi demonstrado o envolvimento de um destes fatores na regulação de genes envolvidos na resposta a carência de carbono (LANDT et al., 2010).

Considerando que os resultados recentes de nosso grupo e de outros têm demonstrado que vários sistemas regulatórios de *Caulobacter* são distintos dos descritos para *E. coli* e outras bactérias entéricas, decidiu-se identificar as redes regulatórias que controlam as principais enzimas de eliminação de espécies reativas de oxigênio. Neste trabalho nosso objetivo foi definir os mecanismos regulatórios da expressão dos genes *ahpC*, *sodA*, *sodB* e *sodC* de *C. crescentus* NA1000, analisando a expressão desses genes nas linhagens selvagem e mutantes para o genes regulatórios *oxyR*, *fur*, *sigF* e *sigJ*, em diferentes condições de crescimento.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para auxiliar a leitura deste trabalho a tabela 1 cita o nome e o número das ORFs (fase de leitura aberta) utilizadas.

2.1 Linhagens bacterianas e condições de cultivo

Utilizamos como modelo selvagem a linhagem sincronizável NA1000 de *Caulobacter crescentus* (EVINGER; AGABIAN, 1977). Para os procedimentos de clonagem utilizamos as linhagens de *E. coli* DH5 α (HANAHAN, 1983) e S17-1 (SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983), porque DH5 α é adequada para os processos de clonagem, enquanto que a S17-1 permite a conjugação com *C. crescentus*.

C. crescentus NA1000 foi cultivada a 30 °C em meio complexo PYE (ELY, 1991) (peptona 2 g/L; extrato de levedura 1 g/L; MgSO₄ 0,2 g/L; CaCl₂ 0,5 mM), meio mínimo M2 (ELY, 1991) (NH₄Cl 9,3 mM; Na₂HPO₄ 12,26 mM; KH₂PO₄ 7,8 mM; pH 6,9; FeSO₄ 10 μ M; Glicose 0,2%; MgSO₄ 1 mM; CaCl₂ 0,5 mM) ou meio mínimo M2 para uso com metais (HU, 2005) (NH₄Cl 9,3 mM; Na₂HPO₄ 6,1 mM; KH₂PO₄ 3,9 mM; pH 6,9; FeSO₄ 10 μ M; Glicose 0,2%; MgSO₄ 0,5 mM; CaCl₂ 0,5 mM). Quando necessário foram suplementados com antibióticos (ácido nalidíxico 20 μ g/ml ou tetraciclina 1 μ g/ml). *E. coli* foi cultivada a 37 °C em meio Luria-Bertani (AUSUBEL et al., 1995) com adição dos antibióticos adequados (ampicilina 100 μ g/ml, tetraciclina 12,5 μ g/ml ou canamicina 50 μ g/ml) se necessário.

As cepas bacterianas, os plasmídeos e oligonucleotídeos utilizados estão listados nas Tabelas 2, 3 e 4 respectivamente.

2.2 Preparo de células competentes para eletroporação

Para as células de *E. coli* DH5 α ou *E. coli* S17-1 tornarem-se competentes para a eletroporação, utilizamos o protocolo a seguir. As células de *E. coli* foram inoculadas em 10 ml de meio LB e ficaram a 37 °C, durante 16 h, sob agitação constante. Em seguida, esta cultura foi diluída para uma DO₆₀₀ de 0,1 em 500 ml de meio LB e permaneceu a 37 °C, sob agitação constante. Quando a cultura atingiu a densidade óptica (600 nm) de 0,5 - 0,7, a cultura foi resfriada em gelo por 15 minutos. Em seguida, a cultura foi transferida para frascos, previamente esterilizados

e resfriados, e foi centrifugada durante 10 minutos, a 9000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi ressuscitado em 40 ml de água destilada (esterilizada e gelada), e novamente centrifugamos por 10 minutos, a 9000 rpm e 4 °C. O sobrenadante foi desprezado, igualmente ressuscitado e centrifugado como descrito anteriormente. Depois, as células foram ressuscitadas em 5 ml de glicerol 10% (esterilizado e gelado) e centrifugadas por 10 minutos, a 9000 rpm e 4 °C. Novamente, o sobrenadante foi desprezado, as células foram ressuscitadas em 500 µl de glicerol 10% e distribuídas em alíquotas de 60 µl por microtubo. Em seguida, as células foram congeladas e mantidas a - 80 °C. Todos os procedimentos foram feitos em condição estéril e mantendo as células sempre geladas.

2.3 Transformação de células competentes por eletroporação

As transformações de *E. coli* ocorreram por eletroporação (a 1,8 kV, 200 Ω e 25 µF) de 60 µl de cultura, tornada previamente competente (seção 2.2), com 1 µl de minipreparação plasmidial (seção 2.4) ou com 1 µl de cada ligação (seção 2.6). Logo após a eletroporação as células foram inoculadas em 1 ml de meio LB num tubo de vidro estéril, e ficaram a 37 °C por 1 hora. Tanto a linhagem de *E. coli* DH5α, quanto a linhagem *E. coli* S17-1, foram utilizadas em experimentos de transformação. A linhagem de *E. coli* DH5α foi utilizada para os ensaios de clonagem, enquanto a linhagem conjugativa *E. coli* S17-1 foi utilizada quando as construções foram inseridas por conjugação em *Caulobacter crescentus*. Após a recuperação das células, a cultura foi distribuída em placas de meio LB contendo o antibiótico apropriado, e permaneceram incubadas a 37 °C por 16 horas. Para pré-seleção das colônias positivas, que são as colônias onde o fragmento está ligado ao vetor pGEM-T Easy, 20 µl X-gal (50 mg/ml) foi adicionado às placas, permitindo a distinção entre colônias brancas (gene da β-galactosidase interrompido pelo fragmento) e colônias azuis (sem o inserto e por isso com o gene da β-galactosidase funcionando). Quando o vetor utilizado foi o pRK/lacZ290, não foi possível fazer essa pré-seleção, visto que o gene da β-galactosidase não é interrompido pelo fragmento inserido nesse plasmídeo. As colônias brancas, resultadas do processo de transformação, foram utilizadas para minipreparação de DNA plasmidial utilizando o kit “Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System” (Promega) quando os fragmentos

seriam sequenciados, ou minipreparação de DNA plasmidial por lise alcalina (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), para a rotina de laboratório.

2.4 Minipreparação de DNA plasmidial (lise alcalina)

O DNA plasmidial foi preparado pelo método de lise alcalina (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

2.5 Reação para sequenciamento de DNA e precipitação

Para realizar o sequenciamento dos plasmídeos pGEM-T Easy contendo os fragmentos clonados, a extração do DNA plasmidial foi feita por meio do sistema “Wizard® Plus SV Minipreps Kit” (Promega). Além disso, foram utilizados oligonucleotídeos que flanqueiam a região de clonagem do plasmídeo. Para cada reação utilizamos: 1 µl (aproximadamente 1 µg) de cada minipreparação de DNA plasmidial; 1 µl dos iniciadores universais ‘Forward’ ou ‘Reverse’ 3,2 pmol/µl pertencentes ao kit; 2 µl do tampão 5x; 1 µl do mix ‘Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit’ (Applied Biosystem); e o volume foi completado com H₂O MilliQ estéril para 10 µl. As condições da PCR foram 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. Após os 35 ciclos a temperatura permaneceu a 4 °C.

Para precipitar as reações, 50 µl de isopropanol 75% foram adicionados aos 10 µl de cada reação de sequenciamento. Em seguida, a mistura foi homogeneizada e mantida a temperatura ambiente por 10 minutos. Os tubos foram centrifugados por 50 minutos a 4000 rpm e 20 °C. Depois, os pellets de DNA precipitado, foram lavados com etanol 70% por duas vezes e secos a 37 °C por 30 minutos. As amostras secas e precipitadas foram encaminhadas ao Serviço de Sequenciamento de DNA, no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (SSDNA IQUSP). As sequencias resultantes foram analisadas como auxílio do programa BLAST (ZHANG; MADDEN, 1997), utilizando para comparação, as sequencias disponíveis no GenBank.

2.6 Construção da fusão de transcrição ao gene *lacZ*

Para fazer a construção da fusão de transcrição, da região promotora dos genes *sodA*, *sodB*, *sodC* e *ahpC* ao gene *lacZ*, foram utilizados, para cada gene, o fragmento presente no vetor pGEM-T-Easy que foi sequenciado. Inicialmente, os plasmídeos pGEM-T-Easy e pRK*lacZ*290 (GOBER; SHAPIRO, 1992) foram digeridos com as enzimas BamHI e HindIII, que reconhecem e cortam sequências de DNA, gerando extremidades coesivas. Em seguida, 100 µl de cada digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, em tampão de corrida TBE, com o marcador de massa molecular 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen), para verificar se a digestão dos plasmídeos ocorreu. O gel foi corado com brometo de etídeo e as bandas de cada fragmento dos promotores, resultantes da digestão do plasmídeo pGEM-T-Easy, foram eluídas do gel com o kit de extração de gel NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel), seguindo as especificações do fabricante. Após serem purificados por eluição, os fragmentos foram submetidos à reação de ligação com o plasmídeo, também digerido, pRK*lacZ*290 (GOBER; SHAPIRO, 1992), que contém o gene repórter *lacZ* sem promotor.

Na reação de ligação utilizamos 8 µl de fragmento eluído com 2 µl do vetor pRK*lacZ*290 digerido com o mesmo par de enzimas, com 0,5 µl de T4 DNA Ligase 1 U/ µl (Fermentas) em 2 µl de tampão 10X T4 DNA Ligase, fornecido pelo fabricante. A reação de ligação foi feita por 16 horas a 16 °C. Em seguida, a ligação de cada fragmento foi inserida por transformação em *E. coli* DH5α, como descrito na seção 2.3. As colônias resultantes foram inicialmente analisadas por uma PCR (seção 2.7) com os oligonucleotídeos *lacZ*290up e M13 Forward, que amplificam o sítio múltiplo de clonagem do vetor pRK*lacZ*290. Os sítios múltiplos de clonagem (SMC) são várias sequências específicas de clivagem para endonucleases de restrição, as quais constituem o sítio de inserção do fragmento no plasmídeo. Quando não há fragmento clonado, o resultado da reação desse PCR é um fragmento de 150 pb, devido à amplificação do sítio múltiplo de clonagem do plasmídeo. Quando ocorreu a clonagem, o resultado da reação é um fragmento de 150 pb mais o tamanho do inserto. Após a confirmação da clonagem, foi realizada uma minipreparação de DNA plasmidial por lise alcalina (seção 2.4) para posterior inserção do plasmídeo pRK*lacZ*290, com a região promotora do gene específico, na linhagem *E. coli* S17-1.

As construções foram introduzidas por eletroporação na linhagem *E. coli* S17-1 doadora (SIMON et. al, 1983) e, em seguida, passadas por conjugação (seção 2.8) para as linhagens de *Caulobacter crescentus* NA1000 (parental) e mutantes ($\Delta oxyR$, Δfur , $\Delta sigF$, $\Delta sigT$, $\Delta sigU$ e $\Delta sigJ$).

2.7 Reações em cadeia da polimerase (PCR) com a Taq DNA polimerase

As PCRs foram realizadas com uma alíquota de DNA plasmidial, resultante uma minipreparação por meio de lise alcalina (seção 2.4). Na PCR foram utilizados: 1 μ l de DNA plasmidial; 1X do tampão (10X), fornecido pelo fabricante para utilização com a enzima Taq DNA polimerase (Fermentas); 0,2 mM de dNTPs (Invitrogen); 1 μ l de cada oligonucleotídeo 50 pmol/ μ l (Tabela 4); 5% de DMSO e 0,5 U de Taq DNA Polymerase (Fermentas). As condições da PCR foram: 95 °C por 5 minutos, com imediatos 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 50 segundos. Após o término dos ciclos, a reação permaneceu a 72 °C por 7 minutos e foi mantida a 4 °C.

Posteriormente, 25 μ l de cada PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%. Utilizamos tampão de corrida TBE, o marcador de massa molecular 1kb Plus DNA ladder (Invitrogen) e coramos o gel com brometo de etídeo.

2.8 Conjugação

As conjugações ocorreram entre as linhagens *E. coli* S17-1 com o plasmídeo pRK/lacZ290 (seções 2.6 e 2.3) e as linhagens selvagem e mutantes de *C. crescentus*, ambas as linhagens foram previamente inoculadas em meio sólido. Inicialmente, em meio PYE-ágar sem antibióticos, a linhagem doadora *E. coli* S17-1 foi misturada à linhagem receptora *C. crescentus*, com o auxílio da alça de platina. A placa com esta mistura foi incubada a 30 °C por 16 horas.

Após as conjugações, as células foram semeadas em meio PYE-ágar acrescido de tetraciclina e ácido nalidíxico, e foram novamente incubadas a 30 °C por aproximadamente 72 horas. A tetraciclina foi utilizada porque o plasmídeo pRK/lacZ290 possui a marca de resistência a este antibiótico, pois contém o gene *tetA*. O ácido nalidíxico foi utilizado porque a *E. coli* S17-1 é sensível a este antibiótico, enquanto *C. crescentus* NA1000 é resistente. A utilização desses dois

antibióticos permite que apenas a linhagem de *C. crescentus* com o plasmídeo seja selecionada após o inóculo em placa. Posteriormente, quando foi possível isolar colônias de *C. crescentus* com o plasmídeo pRK/lacZ290, em placa com meio sólido PYE com tetraciclina, as células foram inoculadas em meio líquido com antibiótico e armazenadas a -80 °C, em tubos específicos para congelamento com o crioprotetor DMSO (dimetilsulfóxido).

2.9 Ensaio de atividade da β -galactosidase

Os promotores clonados à frente do gene *lacZ* tiveram os níveis de expressão determinados por ensaio de atividade da β -galactosidase, no qual se pode medir a atividade do promotor segundo o método de Miller (1972). Os ensaios de cada cultura foram realizados em triplicata (n=3). Como controle negativo foi utilizado uma cultura da linhagem *C. crescentus* NA1000 contendo somente o pRK/lacZ290 sem promotor. Culturas de *C. crescentus* contendo este plasmídeo cresceram em meio PYE, M2 ou M2 para metais contendo tetraciclina, sob agitação constante a 30 °C. Após a diluição para uma DO₆₀₀ de 0,1 as culturas foram novamente incubadas, e em seguida, durante a fase exponencial (DO₆₀₀ = 0,3 - 0,5) ou estacionária (24 h e 48 h), as culturas foram expostas a diversos agentes oxidantes, em intervalos de tempo apropriados para cada agente.

2.10 Padronização dos agentes oxidantes nos mutantes

Todos os mutantes e a linhagem selvagem de *C. crescentus* NA1000 foram submetidos aos ensaios de crescimento e viabilidade em meio mínimo M2, na presença e ausência de agentes oxidativos, com o objetivo de padronizar a concentração dos agentes oxidativos para serem usados nos ensaios de qRT-PCR (Reação em cadeia da polimerase em tempo real).

A curva de crescimento foi realizada no *SpectraMax® Paradigm® Multi-Mode Detection Platform (Molecular Devices)*. As culturas cresceram em Erlenmeyers por 16 h e foram diluídas a uma DO₆₀₀=0,15 para crescerem em placas com seis poços. A placa fica sob agitação dentro do Paradigm e quando a DO₆₀₀ estava próxima a 0,2 os agentes oxidantes foram adicionados e as culturas voltaram a crescer por 18 horas. A DO₆₀₀ do espectrofotômetro convencional e do espectrofotômetro

SpectraMax Paradigm é diferente para a mesma cultura, por isso a diferença entre a o início da curva e o ponto de adição dos oxidantes parecem pequenas. No entanto, as culturas dobraram uma vez e meia antes da adição dos agentes oxidantes.

A viabilidade em placa foi feita concomitante à curva de crescimento. Foram plaqueados dois pontos por cultura, o primeiro antes da adição do oxidante e o segundo após o término da curva. Os experimentos foram feitos em duplicata com diluições seriadas de 10^{-2} à 10^{-8} , essas diluições foram feitas em placas de 96 poços com o auxílio de pipetas multicanal. As placas foram incubadas a 30 °C durante dois dias para o crescimento das UFC (Unidades Formadoras de Colônia) que foram contadas. Calculou-se a porcentagem de sobrevivência como sendo a razão entre o número de UFCs no final da curva e o número de UFCs no início da curva: porcentagem de sobrevivência = [(UFC est./UFC log.)*100].

2.11 Reação em cadeia da polimerase em tempo real (quantitativo) - qRT-PCR

As células de *C. crescentus* foram incubadas a 30 °C sob agitação constante, ao atingirem o meio da fase exponencial, o agente oxidante foi adicionado às culturas e após 1 h da adição, o RNA total foi extraído usando o reagente Trizol (Invitrogen). Após a extração, o RNA foi tratado com 0,5 U de DNaseI (Fermentas) por micrograma de RNA, de acordo com as orientações do fabricante. Em seguida, o RNA tratado foi convertido em cDNA. A síntese do cDNA foi feita com o kit da Invitrogen (Super Script III First - Strand) utilizando 3 microgramas de RNA, seguindo as instruções do fabricante. Os oligonucleotídeos para o RT-PCR quantitativo foram diluídos para 10 μ M e estão listados na tabela 5. A reação do qRT-PCR foi feita com 250 ng de cDNA, utilizando o kit Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (2X) (Fermentas) de acordo com o protocolo do fabricante. Em seguida, as amostras foram levadas ao *Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR Systems (7500 System SDS Software V 1.2.2.)*, onde a reação de PCR com sua respectiva fluorescência foram detectados. As curvas de dissociação das reações foram feitas para confirmar a ausência de dímeros e produtos inespecíficos em todos os ensaios. Ao final de cada reação os dados foram exportados para o programa Microsoft Office Excel e analisados como demonstrado por LIVAK e SCHMITTGEN (2001) por meio dos níveis de expressão relativa que foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$.

2.12 Determinação do pH durante o crescimento de *C. crescentus*

As células de *C. crescentus* NA1000 foram previamente plaqueadas em M2G ou PYE. No dia anterior ao início do ensaio, foram feitos pré-inóculos em ambos os meios, de acordo com o meio em que a linhagem crescia em meio sólido. Estes inóculos cresceram sob agitação constante durante 16 horas, a 30 °C. No primeiro dia de ensaio, as culturas foram diluídas para uma $DO_{600}=0,1$, e a partir de então o pH e a DO_{600} foram quantificados a cada 2 horas durante 12 horas. No segundo e terceiro dias de experimento, foram quantificados o pH e a DO_{600} após 24 h e 48 h da diluição de cada cultura, respectivamente. Durante o experimento as culturas foram mantidas a 30 °C e agitação constante. Ao longo do experimento, ambos os meios sem inóculo também ficaram sob agitação e a 30 °C, para garantir que a oxigenação e a temperatura não influenciaram o pH. Na quantificação do pH utilizamos 3 ml de cultura em cada ponto, que em seguida foram descartados. Esse experimento foi realizado com duas réplicas biológicas para cada meio estudado. O pH foi quantificado por meio do pHmetro Horiba (H-5). Ao final do experimento alíquotas das culturas foram observadas no microscópio para confirmar a ausência organismos contaminantes.

Tabela 1 - Genes com seu respectivo nome nas linhagens de *Caulobacter crescentus* CB15 e NA1000 e na linhagem de *E. coli* K-12

Promotor	CB15	NA1000	Proteína em <i>C. crescentus</i> NA1000	K-12	Proteína em <i>E. coli</i>
<i>PsodA</i>	CC_1777	CCNA_01855	Fe/Mn superóxido dismutase	ECK3901	Mn superóxido dismutase
<i>PsodB</i>	CC_3557	CCNA_03672	superóxido dismutase	ECK1652	Fe superóxido dismutase
<i>PsodC</i>	CC_1579	CCNA_01650	Cu/Zn superóxido dismutase	ECK1642	Cu/Zn superóxido dismutase
<i>PahpC</i>	CC_2918	CCNA_03012	Peroxirredoxina (alquil-hidroperóxido redutase subunidade C)	ECK0599	Peroxirredoxina (alquil-hidroperóxido redutase subunidade C)

Fonte: dados retirados da página do KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/>).

Tabela 2 - Linhagens bacterianas

Espécie	Nome *	Linhagem	Descrição	Referência
<i>Caulobacter crescentus</i>	NA1000	NA1000	Linhagem sincronizável utilizada como padrão	EVINGER; AGABIAN, 1977
	$\Delta oxyR$	SP3811	NA1000 $\Delta oxyR::\Omega spec$	ITALIANI et al., 2011
	Δfur	SP0057	NA1000 Δfur	SILVA NETO et al., 2009
	$\Delta sigE$	SG200	NA1000 $\Delta rpoE$	LOURENÇO; GOMES, 2009
	$\Delta sigF$	SG16	NA1000 $\Delta sigF$	ALVAREZ-MARTINEZ; BALDINI; GOMES, 2006
	$\Delta sigJ$		NA1000 $\Delta sigJ$	Suely Gomes (não publicado)
<i>Escherichia coli</i>	S17-1	S17-1	294::RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)	SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983
	DH5 α	DH5 α	<i>supE44</i> $\Delta lacU169$ ($\Phi 80 lacZ \Delta M15$) <i>hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	HANAHAN, 1983

* Nome utilizado neste trabalho para simplificar a denominação de cada linhagem.

Tabela 3 - Plasmídeos utilizados nos procedimentos de clonagem e ensaios para caracterização fenotípica

Plasmídeo	Descrição	Empresa ou referência
pGEM-T-Easy	Vetor de clonagem, Ap ^r	Promega
pRK <i>lacZ</i> 290	Vetor de fusão de transcrição <i>lacZ</i> , Tcr, replicon IncP1, <i>oriT</i>	GOBER; SHAPIRO, 1992
pRK <i>lacZ</i> 290(P <i>sodA</i>)	Vetor de fusão de transcrição pRK <i>lacZ</i> 290 contendo a região promotora do gene CCNA_01855	Este trabalho
pRK <i>lacZ</i> 290(P <i>sodB</i>)	Vetor de fusão de transcrição pRK <i>lacZ</i> 290 contendo a região promotora do gene CCNA_03672	Este trabalho
pRK <i>lacZ</i> 290(P <i>sodC</i>)	Vetor de fusão de transcrição pRK <i>lacZ</i> 290 contendo a região promotora do gene CCNA_01650	Este trabalho
pRK <i>lacZ</i> 290(P <i>ahpC</i>)	Vetor de fusão de transcrição pRK <i>lacZ</i> 290 contendo a região promotora do gene CCNA_03012	Este trabalho

Tabela 4 - Oligonucleotídeos utilizados nas fusões de transcrição

Fusão	Nome	Sequencia 5' → 3'
Transcrição	pSodAF	CGGATCCCCAAAACATCCAAGCCATGC
	pSodAR	CAAGCTTTGATCCCCAAAAGCCGAGAT
	pSodBF	ACCGCGACCGTGGCCAAGGC
	pSodBR	CAAGCTTTTGTCTGGTGGGAAGCGCAGG
	pSodCF	CGGATCCGCGAACCGTCAGCGGGGATG
	pSodCR	CAAGCTTTGCCCCGCTTGACGACG
	pAhpF	CGGATCGGGCCAGGGCGAAAAGAGCA
	pAhpR	CAAGCTTGTCCGCTTCGCTGACCGTGA

Tabela 5 - Oligonucleotídeos utilizados nos ensaios de qRT-PCR

Proteína	Gene	Identificação	Sequencia 5' → 3'	Tamanho do fragmento em pb*	Referência
16S	CC_r03	16SA-fw	CCGCGTGAATGATGAAGGTC	101	Valéria Italiani
		16SA-rv	GCTGCTGGCACGAAGTTAGC		
hipotética	CC_0088	RT CC_0088 foward	AGCGCGACTTTTTGGCTCAGGT	114	Carolina Antunes (não publicado)
		RT CC_0088 reverse	AGGTGCGCGCAAAGTCGAAGAA		
Rho	CC_3760	RhoRew	CGAGGGTCTTCAGGATCGC	61	Ricardo Ruiz Mazzon (não publicado)
		RhoFow	GTCGAGAACGCCAACTCCAT		
DnaQ	CC_0005	RT CC_0005 foward	CGAGCTGGAGAAATGCGGCAA	95	Carolina A. P. T. da Silva (não publicado)
		RT CC_0005 reverse	AGTTGTACATGCCCCGGAAGC		
AhpC	CCNA_03012	AhpC_1	TACAAGGACGGCAAGTTCGT	119	Maristela Previato
		AhpC_2	GCGAGATCTTCCAGTTCGGT		
MnSOD	CCNA_01855	SodA 1	CCACGGTCGCCACCATCAG	113	Vânia Santos Braz (não publicado)
		SodA 2	GATGCCGCGAGACCTCCGA		
FeSOD	CCNA_03672	SodB 1	ATGGACGCGCTGAAAGAAAAGT	117	Vânia Santos Braz (não publicado)
		SodB 2	GGCGTCGTGGGTCGAGATG		
Cu/ZnSOD	CCNA_01650	SodC_1	GCGACGGCTGAAATCTACTC	119	Maristela Previato
		SodC_2	GTTTTGTGATCGTCGGGGTTG		

* pb: pares de base

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para estudar a regulação dos genes de resposta a estresse oxidativo em *Caulobacter crescentus*, inicialmente foi caracterizada a expressão dos genes *ahpC*, *sodA*, *sodB* e *sodC* que codificam as proteínas alquil-hidroperóxido redutase (AhpC), Mn superóxido redutase (MnSOD), Fe superóxido redutase (FeSOD) e Cu/Zn superóxido redutase (Cu/ZnSOD), respectivamente. Estas enzimas foram selecionadas para o estudo porque estão diretamente envolvidas com a retirada de peróxidos e superóxidos da célula. Com o intuito de iniciar a caracterização destes genes construímos as fusões de transcrição com a região promotora de cada gene a montante do gene repórter *lacZ*, que posteriormente foi utilizada em ensaios de atividade da β -galactosidase para determinar o padrão de expressão de cada gene. Fizemos também ensaios de PCR em tempo real quantitativo (qRT-PCR) para analisar o padrão de expressão dos genes *ahpC*, *sodA*, *sodB* e *sodC*. Nos ensaios de qRT-PCR consideramos como diferencialmente expressos quando a diferença de expressão, na presença e ausência do agente oxidante, foi de pelo menos duas vezes. Ambos os ensaios permitiram a análise do padrão de transcrição de cada gene. Os padrões de expressão de todos os genes foram avaliados na presença de peróxidos e superóxidos, que foram gerados por agentes oxidativos, tais como o peróxido de hidrogênio, peróxido orgânico (tBOOH), o paraquat, a menadiona e o pirogalol.

Posteriormente, para definir a regulação do gene *ahpC*, o ensaio de atividade da β -galactosidase com a fusão de transcrição com este gene também foi realizado na linhagem mutante $\Delta oxyR$. Por meio dos ensaios de qRT-PCR iniciamos o estudo da regulação dos genes *ahpC*, *sodA*, *sodB* e *sodC* nas linhagens mutantes Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$ analisando o padrão de expressão dos genes nestas linhagens em comparação com os resultados obtidos na linhagem selvagem de *C. crescentus* NA1000.

As linhagens mutantes empregadas neste trabalho foram selecionadas porque em trabalhos anteriores demonstraram envolvimento com a resposta de estresse oxidativo em *C. crescentus* ou em outras bactérias como *E. coli*. A linhagem $\Delta sigJ$ ainda não foi caracterizada em *C. crescentus*, mas por estar disponível foi incluída neste trabalho.

Contudo, para definirmos os mecanismos regulatórios da expressão dos genes de resposta a estresse oxidativo, foi necessária a padronização da concentração e tempo de ação de cada agente oxidante em cada ensaio e linhagem utilizada.

3.1 Padronização do cultivo das linhagens em condição de estresse oxidativo

Todas as linhagens de *Caulobacter crescentus* utilizadas nesse trabalho foram submetidas a ensaios fenotípicos para determinarmos as concentrações de cada agente oxidante que seriam utilizadas nos ensaios de qRT-PCR. Foram realizados os ensaios de crescimento e viabilidade com as linhagens selvagem e mutantes de *C. crescentus*: NA1000, Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$, $\Delta sigJ$, $\Delta sigE$, $\Delta sigT$ e $\Delta sigU$. Nesses ensaios utilizamos as drogas paraquat, menadiona, pirogalol e tBOOH como agentes oxidantes.

A droga ciclo-redox denominada paraquat foi utilizada porque é uma geradora de superóxido no citoplasma, pois retira um único elétron de flavinas reduzidas ou de centros de metal de enzimas redox e transfere o elétron para o oxigênio (HASSAN; FRIDOVICH, 1979) (Figura 7). Ele é denominado 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridina-dicloreto, e é comumente chamado de metil-viologeno porque na forma reduzida forma um composto de cor azul ou violeta (SOUZA; MACHADO, 2003). O paraquat é um composto quartenário do amônio que é utilizado como herbicida (CARR; BILTON; ATKINSON, 1986).

No ensaio de crescimento para determinação da concentração adequada do agente oxidante paraquat observamos que a adição de 100 μM ocasionou o crescimento mais lento da linhagem selvagem NA1000 e da linhagem mutante $\Delta oxyR$; além disso a linhagem mutante Δfur não cresceu após a adição dessa concentração de paraquat (Figura 8). Em adição, o ensaio de viabilidade demonstrou que a taxa de sobrevivência da linhagem selvagem NA1000 na presença de 100 μM de paraquat foi de 3,24%, e nas linhagens mutantes $\Delta oxyR$ e Δfur a taxa de sobrevivência foi nula (Figura 9A). Por isso, as demais linhagens mutantes não foram submetidas a ensaios na presença de 100 μM de paraquat.

As linhagens mutantes $\Delta sigF$, $\Delta sigE$, $\Delta sigT$ e $\Delta sigU$ tiveram um crescimento mais lento na presença de 50 μM de paraquat com relação à cultura sem adição do agente oxidante. Nessas linhagens mutantes a taxa de sobrevivência na presença de 50 μM de paraquat permite que essa concentração seja usada nos próximos

ensaios, visto que esta taxa foi próxima à taxa de sobrevivência na fase estacionária na ausência de paraquat. Quanto à linhagem mutante $\Delta sigJ$, foi possível observar que no ensaio de crescimento ambas as culturas, com e sem adição de paraquat, tiveram uma fase lag muito extensa e por isso não foi possível observar as fases logarítmica e estacionária claramente para determinar se houve interferência na taxa de crescimento na presença de paraquat. Contudo, no ensaio de viabilidade foi possível observar que as células das culturas, com e sem agente oxidante, estavam viáveis. Com isso, definimos que a concentração de paraquat utilizada nos demais ensaios seria de 50 μM . Interessantemente, as linhagens de *C. crescentus* testadas foram mais resistentes a paraquat que a linhagem de *E. coli* K-12, pois na presença de 30 μM de paraquat essa linhagem de *E. coli* não foi capaz de crescer em meio mínimo com glicose (M63), e em meio rico (LB) o crescimento foi mais lento, sem atingir a mesma densidade óptica na fase estacionária em comparação com a cultura sem agente oxidante (CARLIOZ; TOUATI, 1986).

A menadiona também é uma droga ciclo-redox geradora de superóxido no citoplasma (Figura 10). Ela é conhecida como vitamina K₃ e segundo a IUPAC é denominada 2-metil naftaleno-1,4-diona. No ensaio de crescimento na presença de menadiona, a linhagem selvagem NA1000 na presença de 100 μM menadiona demonstrou um crescimento mais lento, mas atingiu a fase estacionária com a densidade semelhante, quando comparada ao crescimento sem adição do agente oxidante. Contudo, na presença de 50 μM menadiona, embora o crescimento tenha sido mais lento, na fase estacionária essa linhagem apresentou uma densidade celular maior que a apresentada no crescimento sem adição do agente oxidante (Figura 11). No entanto, no ensaio de viabilidade as diferenças observadas no ensaio de crescimento não ocorreram (Figura 9B).

No ensaio de crescimento das linhagens $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$, $\Delta sigE$, $\Delta sigT$ e $\Delta sigU$, na presença de menadiona, todas estas linhagens atingiram a fase estacionária com a densidade celular similar, mas o crescimento foi mais lento na presença do agente oxidante (Figura 11). Na presença de 100 μM menadiona, a linhagem Δfur apresentou um crescimento mais lento e atingiu a fase estacionária com a densidade celular menor, quando comparada ao crescimento sem adição do agente oxidante e na presença de 50 μM menadiona. As linhagens mutantes $\Delta sigF$, $\Delta sigJ$, $\Delta sigE$, $\Delta sigT$ e $\Delta sigU$ não foram avaliadas na presença de 100 μM menadiona, visto que os resultados com 50 μM demonstraram que as culturas de NA1000, $\Delta oxyR$ e Δfur

creciam melhor na presença de menos agente oxidante. A linhagem $\Delta sigJ$, na presença de menadiona, demonstrou um crescimento mais lento e não foi possível observar a fase estacionária durante o ensaio. Com relação às taxas de sobrevivência, todas as linhagens testadas tiveram a taxa de sobrevivência na presença ou ausência de 50 μM de menadiona semelhantes (Figura 9B).

O pirogalol (ácido pirogálico ou 1,2,3-benzenotriol) foi utilizado porque é capaz de gerar o radical superóxido espontaneamente, mimetizando assim, as toxinas geradoras de superóxido que são encontradas por *C. crescentus* no ambiente (Figura 12). *C. crescentus* pode aderir-se a cianobactérias que são fotossintetizantes e geram um ambiente com altas concentrações de oxigênio ao seu redor. Além disso, fenóis e polifenóis derivados de plantas podem gerar o radical superóxido por auto-oxidação e são comumente encontrados em lagoas. Unindo essas características do ambiente no qual *C. crescentus* vive, sabe-se que ela pode ficar exposta a superóxido gerado no ambiente que pode alcançar o espaço periplasmático (SCHNELL; STEINMAN, 1995), mas não o citoplasma, porque o radical superóxido não atravessa a membrana plasmática (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

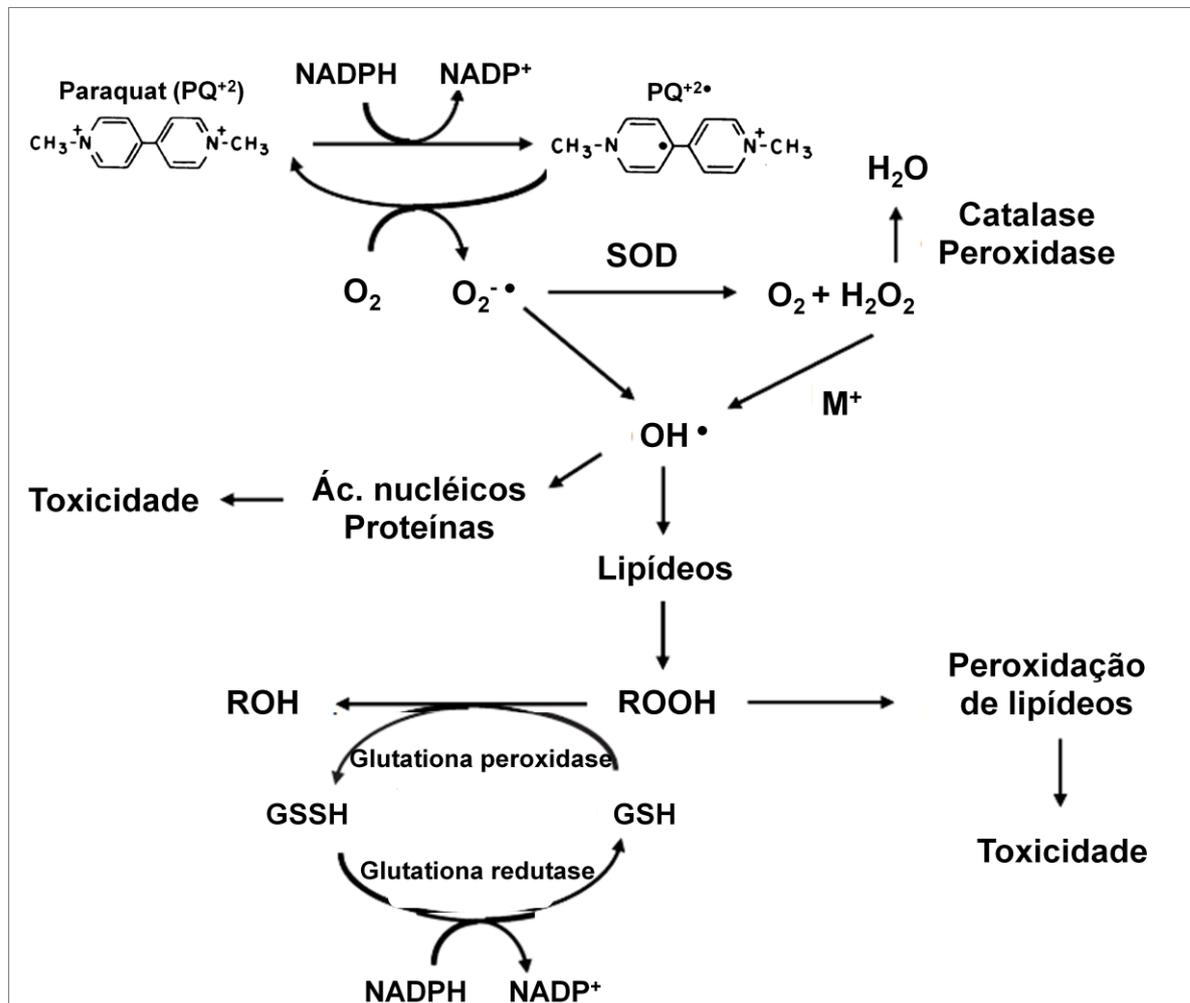
O crescimento da linhagem NA1000 na presença do agente oxidante pirogalol nas concentrações 13 μM , 25 μM e 50 μM atingiram a fase estacionária com a densidade celular similar entre elas (Figura 13), porém na presença de 100 μM de pirogalol o crescimento foi mais lento, além disso, a cultura não atingiu a fase estacionária durante o período estudado, e a taxa de sobrevivência foi de 7,5% na presença de 100 μM de pirogalol (Figura 9C), inviabilizando a utilização dessa concentração nos demais ensaios. As linhagens mutantes $\Delta oxyR$ e Δfur também foram submetidas aos ensaios de crescimento e viabilidade na presença de 100 μM de pirogalol, mas não houve crescimento após a adição do agente oxidante. As linhagens $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$, $\Delta sigJ$, $\Delta sigE$, $\Delta sigT$ e $\Delta sigU$ apresentaram o crescimento na presença de 50 μM de pirogalol similar ao crescimento sem o agente oxidante, além disso as taxas de sobrevivência demonstraram que as células continuavam viáveis após a adição do agente oxidante. Por isso os demais ensaios com as linhagens $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$, $\Delta sigJ$, $\Delta sigE$, $\Delta sigT$ e $\Delta sigU$ foram realizados com 50 μM de pirogalol.

Contudo, a linhagem Δfur não foi capaz de manter o crescimento após a adição de 50 μM de pirogalol, corroborado pela taxa de sobrevivência que foi nula. Por isso,

essa linhagem também foi analisada na presença de 13 μM e 25 μM de pirogalol, e nessas concentrações os crescimentos foram similares ao crescimento na ausência do agente oxidante. Ademais, as taxas de sobrevivência na presença de 13 μM e 25 μM de pirogalol demonstraram que as células continuaram viáveis após a adição do agente oxidante. Portanto, os ensaios posteriores com a linhagem mutante Δfur foram realizados com 25 μM de pirogalol.

Os ensaios de crescimento e viabilidade na presença de tert-butil hidroperóxido (tBOOH) foram realizados com as linhagens NA1000, Δfur , $\Delta oxyR$ e $\Delta sigE$ (Figura 14). Nas linhagens NA1000 e $\Delta oxyR$ o crescimento na presença e ausência de tBOOH foram similares, mas nas linhagens Δfur e $\Delta sigE$ o crescimento na presença de 200 μM de tBOOH foi mais lento quando comparado ao crescimento sem adição do agente oxidante; contudo, todas as linhagens atingiram a fase estacionária durante o nosso estudo. Adicionalmente, no ensaio de viabilidade as quatro linhagens apresentaram taxas de sobrevivência semelhantes (Figura 9D). Diante disso, os demais ensaios com essas linhagens foram realizados com 100 μM e 200 μM de tBOOH.

Figura 7 - Mecanismo da toxicidade da droga ciclo-redox paraquat

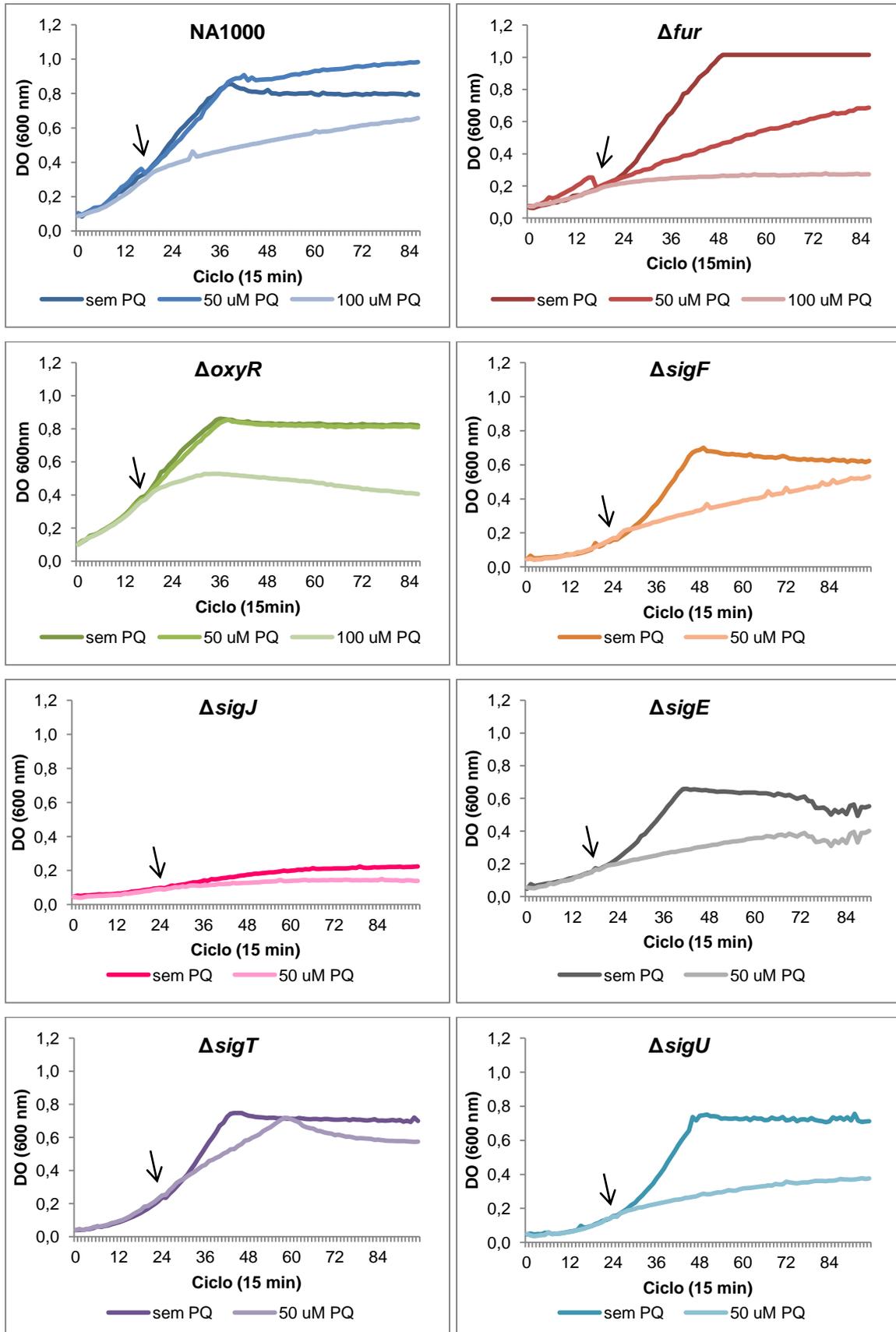


O cátion paraquat (PQ²⁺) pode ser reduzido pela enzima NADPH (fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo redutase), com a transferência de um elétron, formando o radical paraquat (PQ^{2•+}) cuja cor pode ser azul ou violeta. Este, por sua vez, na presença de oxigênio oxida-se rapidamente produzindo um ânion radical superóxido (O₂^{•-}) e regenerando o paraquat. Desta maneira, ciclos repetidos de redução e re-oxidação do herbicida podem ocorrer gerando uma grande quantidade de espécies de oxigênio reduzido que levam o organismo ao estresse oxidativo ou à peroxidação de lipídeos. Além disso, o radical anion superóxido (O₂^{•-}), pode ser reduzido a um radical hidroxil (OH[•]), que é uma espécie altamente reativa de oxigênio (SOUZA; MACHADO, 2003). (M⁺ representa um metal).

Fonte: adaptada de Bus e Gibson (1984) e Castell, Teresa Donato e Gómez-Lechón (2005).

As linhagens selvagem (NA1000) e mutantes (Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$, $\Delta sigJ$, $\Delta sigE$, $\Delta sigT$ e $\Delta sigU$) cresceram em placas no espectrofotômetro *SpectraMax Paradigm*, onde a DO_{600} foi quantificada a cada 15 minutos. O crescimento ocorreu em meio mínimo (M2G) na ausência e presença de paraquat nas concentrações de 50 μM e 100 μM . O eixo abscissa está com a escala em intervalos de doze ciclos de 15 minutos resultando em intervalos de 3 horas, pois é o tempo médio para *C. crescentus* duplicar o número de células em meio mínimo. A seta (\rightarrow) indica o momento no qual ocorreu a adição do agente oxidante paraquat (PQ).

Figura 8 - Crescimento na presença de paraquat



As linhagens selvagem (NA1000) e mutantes (Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$, $\Delta sigJ$, $\Delta sigE$, $\Delta sigT$ e $\Delta sigU$) que cresceram em placas com meio líquido no espectrofotômetro *SpectraMax Paradigm* tiveram sua viabilidade avaliada em placas com meio sólido, sem adição de agentes oxidantes. A porcentagem de sobrevivência foi aferida em dois pontos, anteriormente à adição do agente oxidante (fase logarítmica) e ao final do experimento (fase estacionária). O crescimento ocorreu em meio mínimo (M2G) na ausência e presença dos agentes oxidantes em diversas concentrações: **A.** paraquat (PQ); **B.** menadiona (MD); **C.** pirogalol (Pi) e **D.** tert-butil hidroperóxido (tBOOH). Apenas as linhagens selvagem, Δfur e $\Delta oxyR$ foram submetidas à concentração de 100 μM de paraquat, menadiona e pirogalol. As linhagens selvagem e Δfur foram submetidas às concentrações de 13 μM e 25 μM de pirogalol, diferentemente das outras linhagens que não foram expostas a essas concentrações. A taxa de sobrevivência foi determinada com relação ao número de colônias existentes na fase logarítmica antes da adição do agente oxidante. Os resultados demonstrados são a média de dois experimentos.

Figura 9 - Viabilidade em placa após a exposição a agentes oxidantes

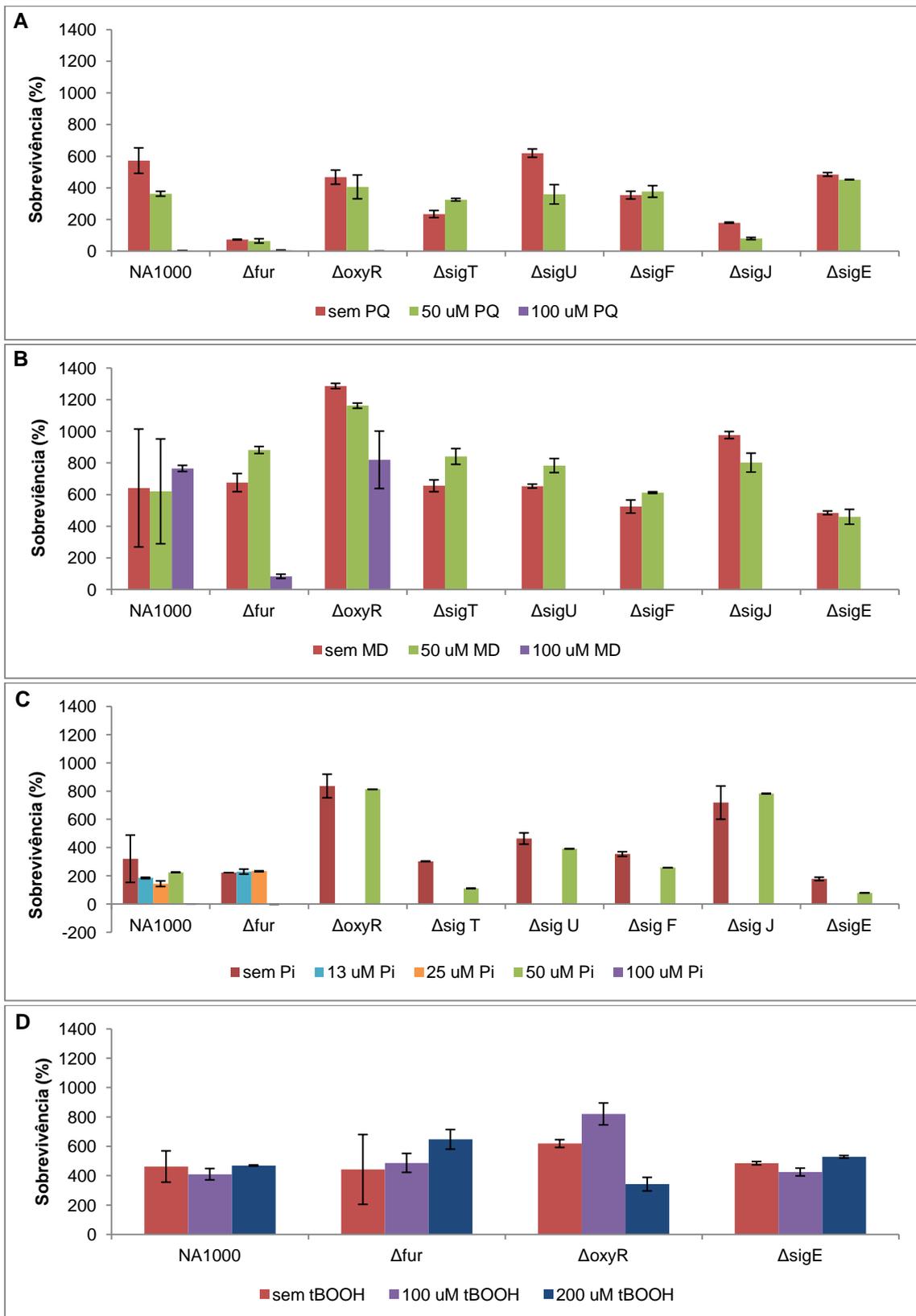
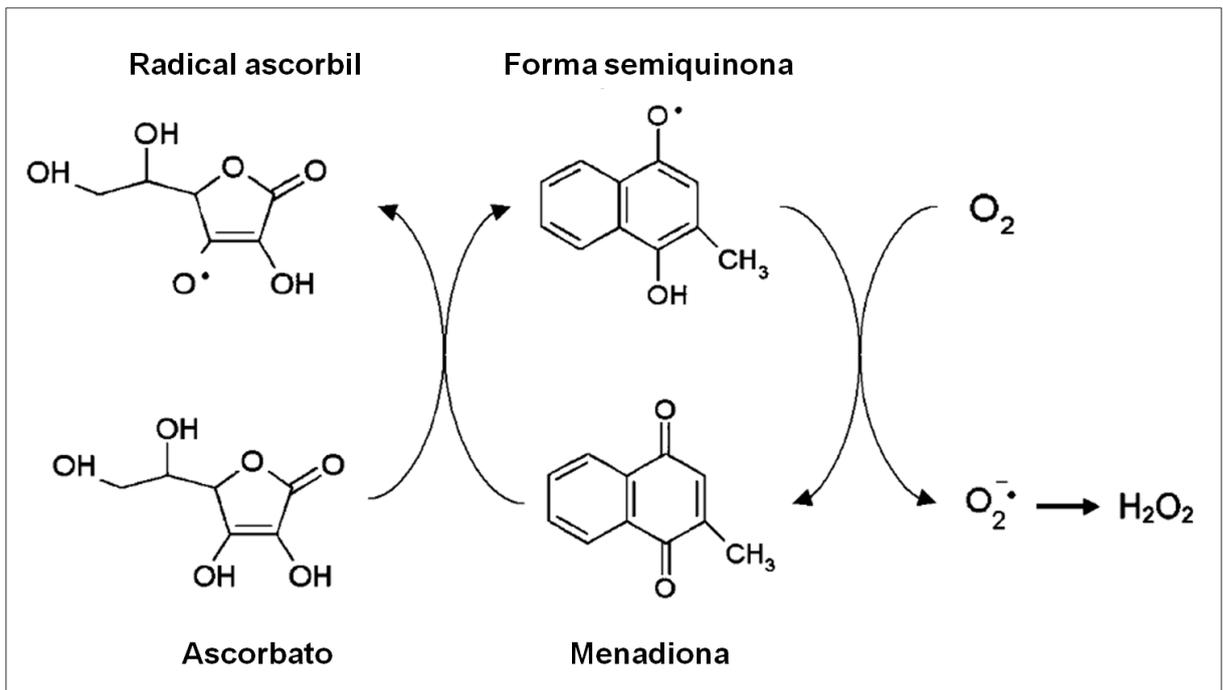


Figura 10 - Mecanismo da toxicidade da droga ciclo-redox menadiona



O ascorbato pode dirigir o ciclo-redox da menadiona com formação de superóxido. Após o superóxido ser dismutado pelas superóxido dismutases gerando peróxido de hidrogênio e oxigênio, o peróxido de hidrogênio é retirado pelas catalases e alquil-hidroperóxido redutases.

Fonte: adaptado de Beck et al. (2011).

As linhagens selvagem (NA1000) e mutantes (Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$, $\Delta sigJ$, $\Delta sigE$, $\Delta sigT$ e $\Delta sigU$) cresceram em placas no espectrofotômetro *SpectraMax Paradigm*, onde a DO_{600} foi quantificada a cada 15 minutos. O crescimento ocorreu em meio mínimo (M2G) na ausência e presença de menadiona nas concentrações de 50 μM e 100 μM . O eixo abscissa está com a escala em intervalos de doze ciclos de 15 minutos resultando em intervalos de 3 horas, pois é o tempo médio para *C. crescentus* duplicar o número de células em meio mínimo. A seta (\rightarrow) indica o momento no qual ocorreu a adição do agente oxidante menadiona (MD).

Figura 11 - Crescimento na presença de menadiona

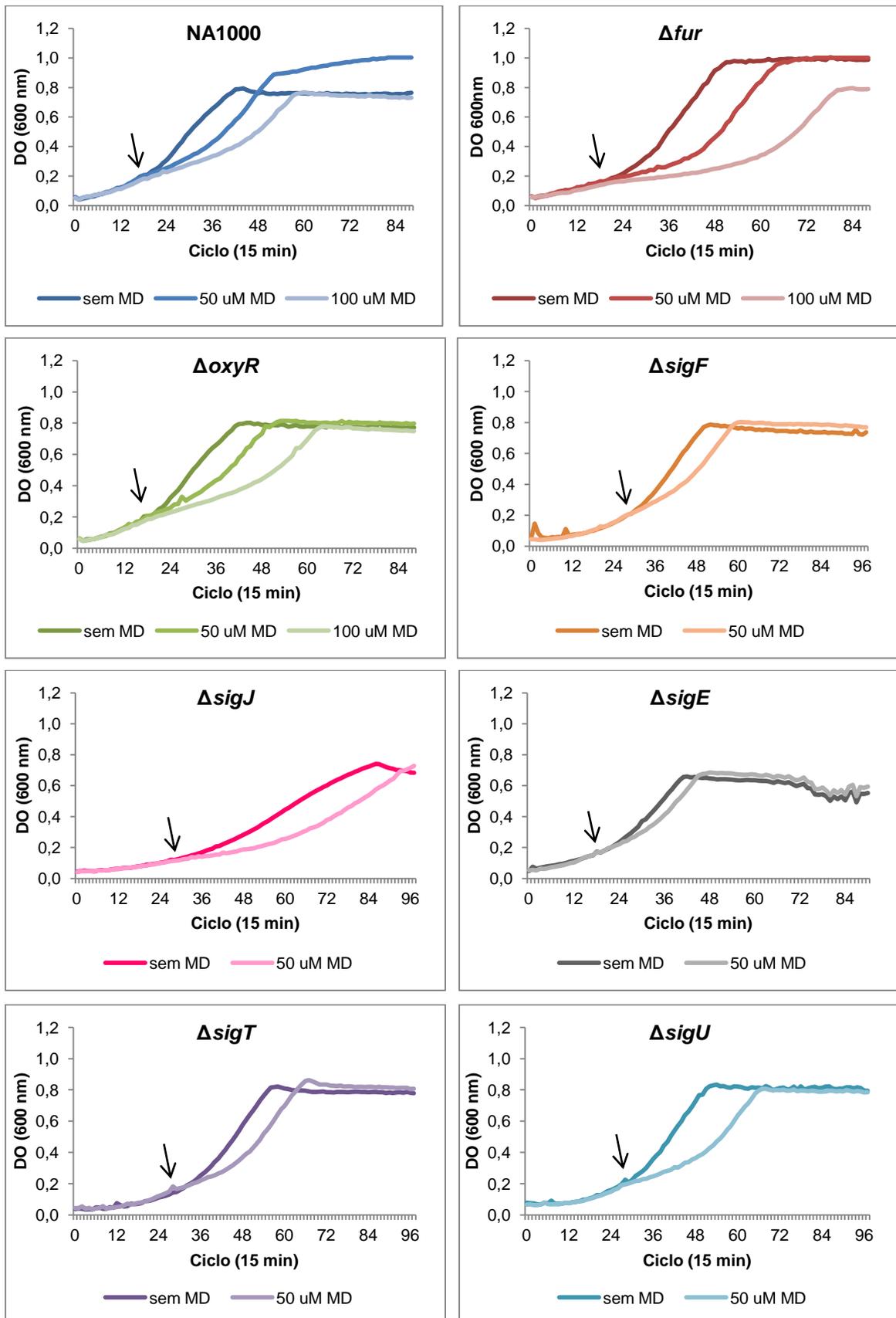
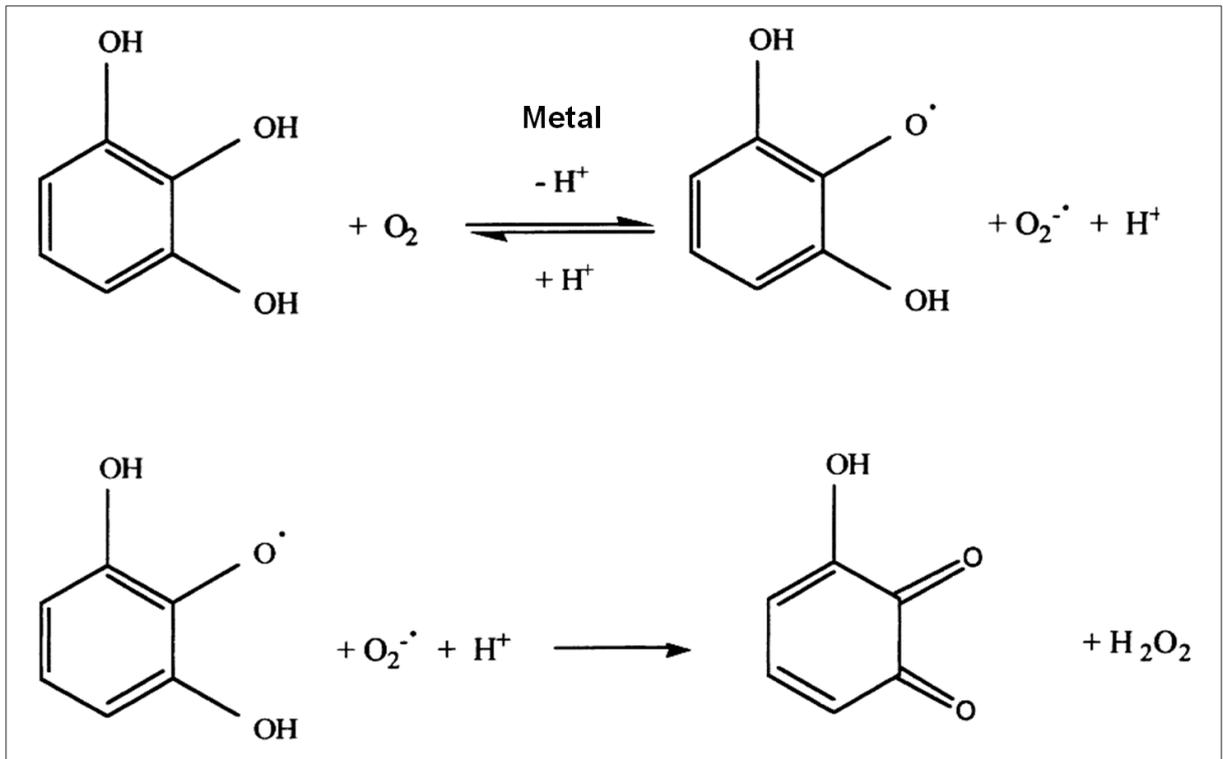


Figura 12 - Etapas da auto-oxidação do pirogáolol



Inicialmente o pirogáolol é oxidado gerando um radical semiquinona e um radical superóxido, em seguida, esses dois produtos podem reagir gerando uma quinona e o peróxido de hidrogênio.
 Fonte: retirado de Magnani, Gaydou e Hubaud (2000).

As linhagens selvagem (NA1000) e mutantes (Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$, $\Delta sigJ$, $\Delta sigE$, $\Delta sigT$ e $\Delta sigU$) cresceram em placas no espectrofotômetro *SpectraMax Paradigm*, onde a DO_{600} foi quantificada a cada 15 minutos. O crescimento ocorreu em meio mínimo (M2G) na ausência e presença de pirogalol nas concentrações de 50 μM e 100 μM . Apenas as linhagens selvagem e Δfur foram submetidas às concentrações de 13 μM e 25 μM de pirogalol, diferentemente das outras linhagens que não foram expostas a essas concentrações. O eixo abscissa está com a escala em intervalos de doze ciclos de 15 minutos resultando em intervalos de 3 horas, pois é o tempo médio para *C. crescentus* duplicar o número de células em meio mínimo. A seta (\rightarrow) indica o momento no qual ocorreu a adição do agente oxidante pirogalol (Pi).

Figura 13 - Curva de crescimento na presença de pirogalol

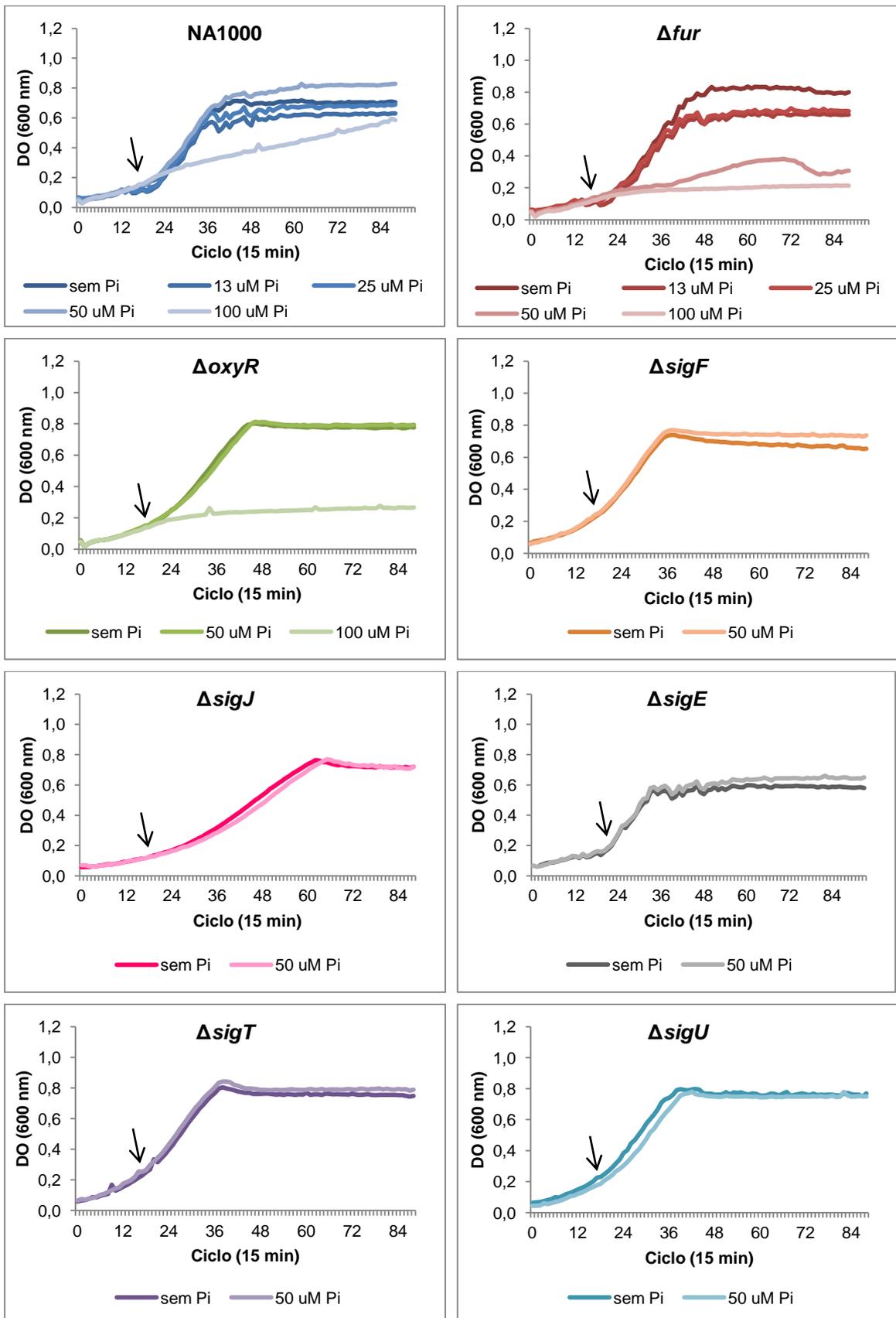
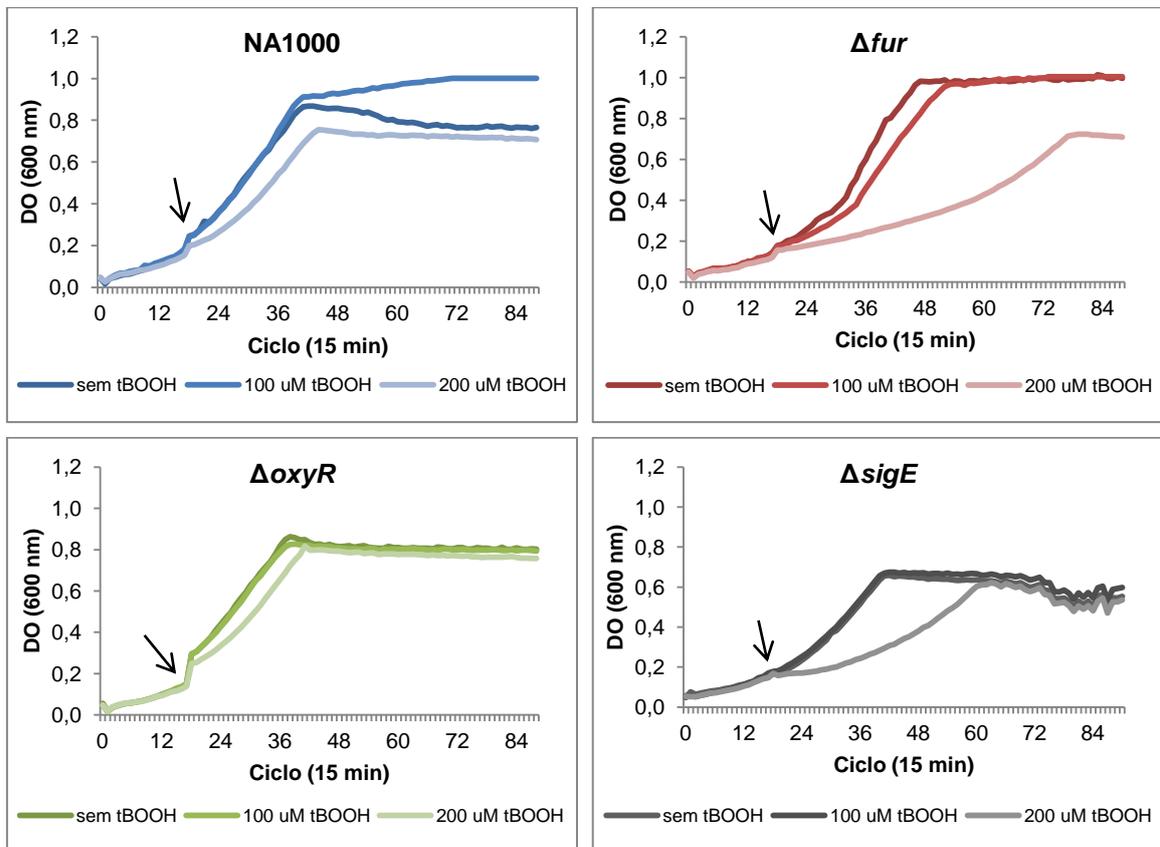


Figura 14 – Curva de crescimento na presença de tert-butil hidroperóxido



As linhagens selvagem (NA1000) e mutantes (Δfur , $\Delta oxyR$ e $\Delta sigE$) cresceram em placas no espectrofotômetro *SpectraMax Paradigm*, onde a DO_{600} foi quantificada a cada 15 minutos. O crescimento ocorreu em meio mínimo (M2G) na ausência e presença de tert-butil hidroperóxido nas concentrações de 100 μM e 200 μM . O eixo abscissa está com a escala em intervalos de doze ciclos de 15 minutos resultando em intervalos de 3 horas, pois é o tempo médio para *C. crescentus* duplicar o número de células em meio mínimo. A seta (\rightarrow) indica o momento no qual ocorreu a adição do agente oxidante tert-butil hidroperóxido (tBOOH).

3.2 Construção das fusões de transcrição

Com o intuito de analisar a expressão dos genes CCNA_01855 (*sodA*), CCNA_03672 (*sodB*), CCNA_01650 (*sodC*) e CCNA_03012 (*ahpC*) fizemos as construções das fusões de transcrição com a região promotora de cada gene à montante do gene repórter *lacZ*. Com essas construções, por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase, seria possível determinar os agentes indutores e reguladores para cada gene.

O presente trabalho foi a continuação do trabalho de iniciação científica do aluno Carlos Eduardo de Oliveira Vido. Demos seguimento à construção das fusões de transcrição inserindo os plasmídeos pGEM-T Easy contendo os fragmentos de cada promotor em *E. coli* DH5 α , a fim de confirmar por sequenciamento o fragmento de cada promotor, já que no trabalho anterior isso não foi possível.

No trabalho do aluno Carlos Vido, primeiramente, foram delineadas as regiões dos promotores a serem analisadas, tomando-se como base o início de transcrição já determinado para estes genes no genoma de *Caulobacter* (MCGRATH et al., 2007). Esquemas das sequências de cada região promotora encontram-se nas Figuras 15, 16, 17 e 18. Para construção das fusões de transcrição, aproximadamente 300 pares de bases a montante dos inícios de tradução dos genes CCNA_01855 (*sodA*), CCNA_03672 (*sodB*), CCNA_01650 (*sodC*) e CCNA_03012 (*ahpC*), anotados no banco de dados GeneBank, foram amplificados por PCR e clonados no vetor pGEM-T Easy. Em seguida, o plasmídeo contendo o fragmento foi inserido, por eletroporação na linhagem *E. coli* DH5 α . As colônias resultantes deste processo foram selecionadas em meio sólido com X-gal, assim, as colônias contendo plasmídeo com inserto (colônias brancas) foram submetidas ao processo de minipreparação plasmidial, como descrito na seção 2.4.

O presente trabalho, iniciou-se com a inserção dos plasmídeos pGEM-T Easy, contendo os fragmentos de cada promotor, em *E. coli* DH5 α . Esses plasmídeos foram preparados pelo aluno de iniciação científica por meio de uma minipreparação plasmidial. Após o processo de transformação de *E. coli* DH5 α com os vetores contendo os fragmentos fizemos uma minipreparação plasmidial e confirmamos as clonagens por digestão do plasmídeo e eletroforese (Figura 19). Em seguida, os fragmentos das regiões promotoras foram sequenciados como descrito na seção 2.5.

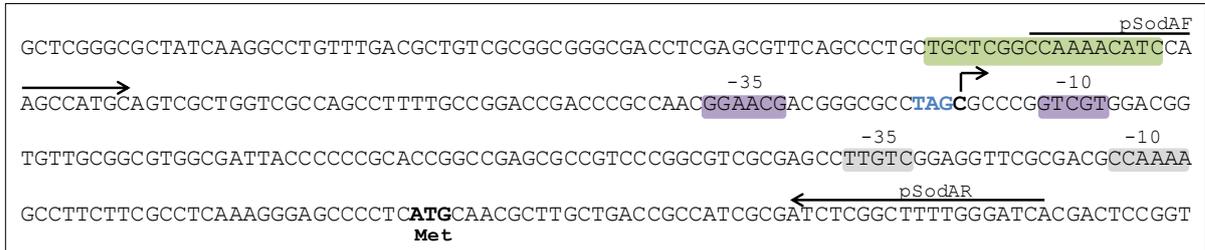
Após a determinação da sequência correta da região promotora de cada gene, construímos fusões de transcrição ao gene repórter *lacZ* a fim de analisar sua expressão. Para obter estas construções, a região a montante de cada gene foi clonada à frente do gene *lacZ* no vetor pRK/*lacZ*290 (GOBER; SHAPIRO, 1992). O plasmídeo pRK/*lacZ*290 foi empregado porque contém um sítio de reconhecimento pelo ribossomo (RBS) na frente do gene repórter *lacZ*, com isso o fragmento clonado funciona somente como promotor para este gene. O vetor pRK/*lacZ*290 foi introduzido nas linhagens selvagem NA1000 e mutantes por conjugação a partir de uma *E. coli* S17-1 doadora.

Posteriormente à confirmação das sequências corretas por sequenciamento, os fragmentos foram retirados do vetor pGEM-T Easy e ligados ao pRK/*lacZ*290, e esse procedimento foi confirmado por PCR (Figura 20). Em seguida, as construções corretas foram inseridas em *E. coli* S17-1, por meio de eletroporação, para conjugação com as linhagens de *C. crescentus* NA1000 e mutantes. Todas as fusões de transcrição foram introduzidas por conjugação nas linhagens mutantes Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$, $\Delta sigT$, $\Delta sigU$ e $\Delta sigJ$ e congeladas no freezer -80°C.

Após a introdução do vetor nas linhagens, a expressão dos genes foi inicialmente avaliada na linhagem NA1000 sob condições normais e de estresse oxidativo, durante as fases de crescimento exponencial e estacionária, por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase (Miller, 1972). O estresse oxidativo foi gerado pela adição de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), tert-butil hidroperóxido (tBOOH), paraquat (PQ), menadiona (MD), pirogalol (Pi) ou cádmio (Cd) nas culturas crescendo exponencialmente. Além disso, as construções também foram submetidas a excesso ou carência de ferro pela adição de sulfato ferroso ($FeSO_4$) ou 2,2'-dipiridil (DDPi) que é um quelante de ferro.

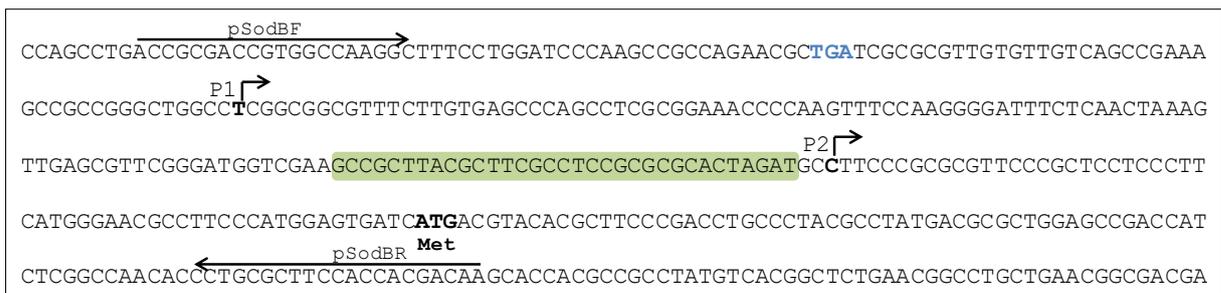
Nos ensaios de atividade da β -galactosidase, observamos que a menadiona interage com as soluções deixando-as amarelas. Como a cor amarela é a cor gerada pela clivagem do ONPG pela β -galactosidase, as intervenções nessa cor invalidam o uso deste ensaio para medir a expressão. Tampouco foi possível realizar os ensaios de atividade da β -galactosidase com o pirogalol, pois ele gerou alterações de cor nos meios utilizados deixando-os marrom e assim, impedindo o uso desse ensaio. Portanto, utilizamos o método alternativo de RT-PCR quantitativo para avaliar a expressão dos genes nestas condições.

Figura 15 - Regiões promotora e codificadora de *sodA* (CCNA_01855)



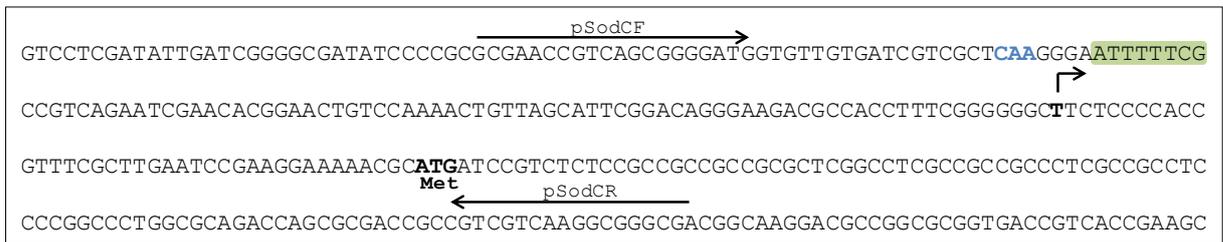
Nas regiões promotora e codificadora de *sodA* (CCNA_01855) as setas indicam os primers listados na tabela 4; o códon em negrito é o início de tradução; a região sublinhada em lilás refere-se ao possível sítio de ligação do sigma F em *sodA* (GGAACG - 18 - GTCGT), já que o consensus para *C. crescentus* é GTAACC - 14-18 - GNNCT (ALVAREZ-MARTINEZ; BALDINI; GOMES, 2006); a região sublinhada em cinza refere-se ao possível sítio de ligação do sigma 70 para *C. crescentus* (TTGAC - N₁₆ - CCTANA) (MCGRATH et al., 2007); a seta curvada refere-se ao início de transcrição quando *C. crescentus* é submetida a stress por metal pesado (MCGRATH et al., 2007); a região sublinhada em verde representa o motivo m_8 do cluster m_g (TGCTCGGCCAAAACATC) encontrado *upstream* dos genes cuja expressão é induzida na presença dos metais pesado cádmio, cromo e dicromato (MCGRATH et al., 2007); e o códon em azul é o último códon da região codificadora a montante.

Figura 16 - Regiões promotora e codificadora de *sodB* (CCNA_03672)



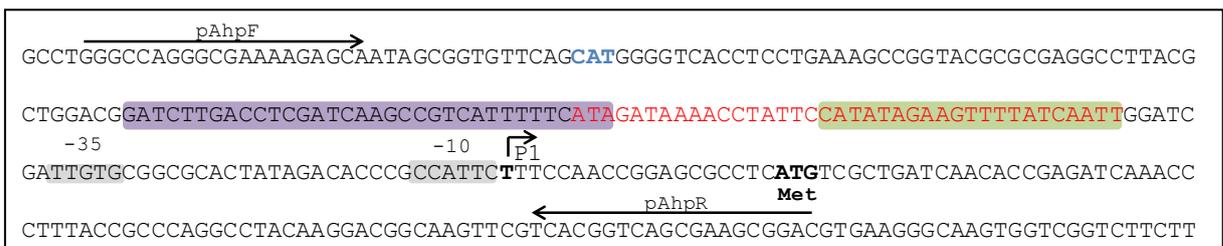
Nas regiões promotora e codificadora de *sodB* (CCNA_03672) as setas indicam os primers listados na tabela 4; o códon em negrito é o início de tradução; a seta curvada refere-se ao início de transcrição, em P1 está o início de transcrição quando *C. crescentus* está em seu ciclo normal, e em P2 quando *C. crescentus* é submetida a stress por metal pesado (MCGRATH et al., 2007); a região sublinhada em verde representa o motivo m_6 do cluster m_f (GCCGCTTACGCTTCGCCTCCGCGCGCACTAGAT) encontrado *upstream* dos genes cuja expressão é induzida na presença de cádmio (MCGRATH et al., 2007); o códon em azul é o último códon da região codificadora a montante.

Figura 17 - Regiões promotora e codificadora de *sodC* (CCNA_01650)



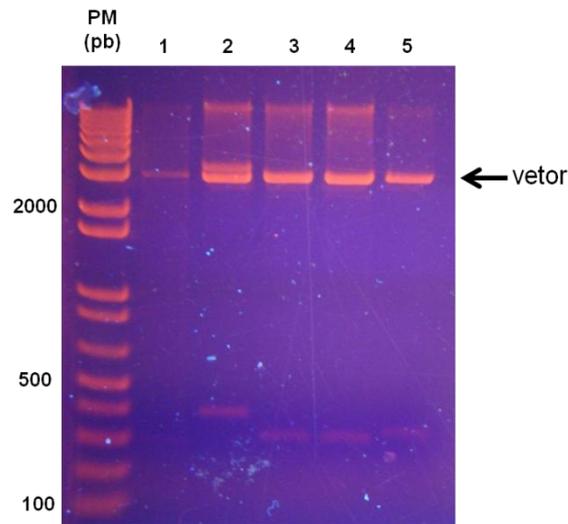
Nas regiões promotora e codificadora de *sodC* (CCNA_01650), as setas indicam os primers listados na tabela 4; o códon em negrito é o início de tradução; a seta curva refere-se ao início de transcrição quando *C. crescentus* é submetida a stress por metal pesado (MCGRATH et al., 2007); a região sublinhada em verde representa o motivo m_12 do cluster m_i (ATTTTTCG) encontrado *upstream* dos genes cuja expressão é induzida na presença dos metais pesado cromo e dicromato (MCGRATH et al., 2007); e o códon em azul é o códon inicial da região codificadora a montante.

Figura 18 - Regiões promotora e codificadora de *ahpC* (CCNA_03012)



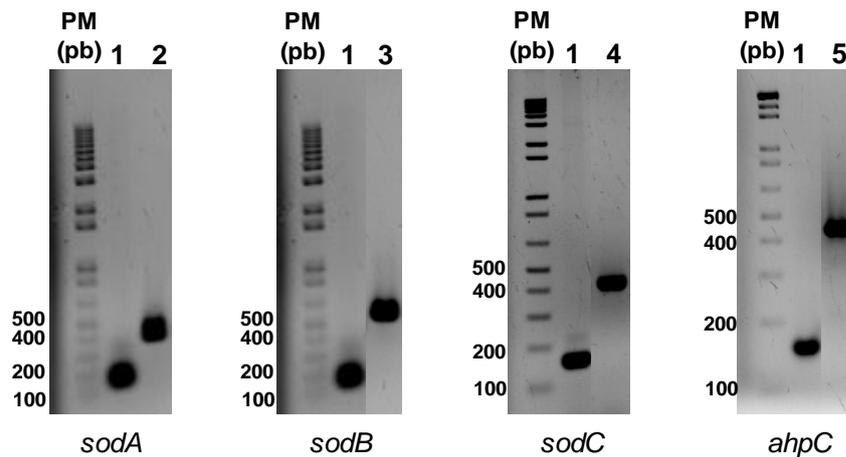
Nas regiões promotora e codificadora de *ahpC* (CCNA_03012) as setas indicam os primers listados na tabela 4; o códon em negrito é o início de tradução; a região sublinhada em cinza refere-se ao sítio de ligação do sigma 70 para *C. crescentus* (TTGAC - N₁₆ - CCTANA) (MCGRATH et al., 2007); a região em vermelho é o possível sítio de ligação para OxyR (ITALIANI et al., 2011); a seta curva refere-se ao início de transcrição quando *C. crescentus* é submetida a stress por metal pesado (MCGRATH et al., 2007); a região sublinhada em verde representa o motivo m_3 do cluster m_c (CATATAGAAGTTTATCAATT) e a região sublinhada em roxo representa o motivo m_4 do cluster m_c (GATCTTGACCTCGATCAAGCCGTCATTTTTCATA) ambos encontrados *upstream* dos genes cuja expressão é reprimida na presença dos metais pesado cromo e dicromato (MCGRATH et al., 2007); e o códon em azul é o códon inicial da região codificadora a montante.

Figura 19 - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos fragmentos clonados no pGEM-T Easy após digestão com EcoRI



A clonagem da região promotora de cada gene no plasmídeo pGEM-T foi confirmada por meio da digestão do plasmídeo com a enzima EcoRI. **PM**: marcador de massa molecular 1Kb plus DNA Ladder; **1**: região promotora de *sodA* (254pb); **2**: região promotora de *sodB* (361pb); **3 e 4**: região promotora de *sodC* (268pb) e **5**: região promotora de *ahpC* (294pb).

Figura 20 - Eletroforese em gel de agarose (1%) dos fragmentos clonados no pRKlacZ290 amplificados por PCR



A clonagem da região promotora de cada gene no plasmídeo pRKlacZ290 foi confirmada por ensaio de PCR. **PM**: marcador de massa molecular 1 Kb plus DNA Ladder; **1**: plasmídeo vazio (negativo com 150 pb); **2**: fragmento da região promotora de *sodA* (150 + 254 = 404 pb); **3**: fragmento da região promotora de *sodB* (150 + 361 = 511 pb); **4**: fragmento da região promotora de *sodC* (150 + 254 = 418 pb) e **5**: fragmento da região promotora de *ahpC* (150 + 294 = 444pb).

3.3 Análise da expressão de *ahpC*

Após a introdução dos vetores nas linhagens, a expressão do gene *ahpC* foi avaliada sob condições normais e de estresse oxidativo, por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase (MILLER, 1972). Nestes ensaios de atividade da β -galactosidase o estresse oxidativo foi gerado pela adição de H_2O_2 ou tBOOH, nas culturas crescendo exponencialmente em meio PYE ou M2G. Os ensaios de qRT-PCR, com o RNAm de *ahpC*, foram feitos em meio mínimo (M2G) acrescido dos seguintes agentes: H_2O_2 , tBOOH, paraquat, menadiona ou pirogalol nas culturas crescendo exponencialmente. Posteriormente, os níveis de expressão encontrados em cada linhagem sem agentes oxidantes foram comparados, com os níveis de expressão encontrados na presença do agente oxidante. Os ensaios de RT-PCR quantitativo foram realizados com as linhagens selvagem e mutantes de *C. crescentus*: NA1000, Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$.

Nos ensaios de RT-PCR quantitativo é necessária a utilização de genes normalizadores, que são os genes denominados *housekeeping* ou controles endógenos, pois teoricamente possuem expressão constante, ou seja, sofrem pequena oscilação quando expostos a fatores externos como hormônios e fatores de crescimento. Esses genes são utilizados porque a expressão gênica relativa é determinada a partir da comparação do gene alvo com um ou mais genes normalizadores (NASCIMENTO et al., 2010). Para os ensaios de qRT-PCR com peróxidos o melhor gene normalizador encontrado foi o gene CC_3760 codificador da proteína Rho, enquanto que nos ensaios com superóxidos foi utilizado o gene CC_0005 da proteína DnaQ (Tabela 6).

Para determinar a existência de diferenças transcricionais entre as fases logarítmica e estacionária para o gene *ahpC* foram realizados ensaios de atividade da β -galactosidase com a fusão de transcrição do promotor de *ahpC* ao gene *lacZ*. Neste ensaio foi possível observar que os níveis transcricionais de *ahpC* aumentam durante a fase estacionária quando a cultura é cultivada em meio PYE, contudo, o mesmo não ocorreu em meio M2G, onde os níveis transcricionais em ambas as fases exponencial e estacionária foram mantidas (Figura 21). Nossos dados diferem dos encontrados por ITALIANI, et al. (2010), onde por meio do ensaio de RT-PCR semi-quantitativo foi demonstrado que os níveis de RNAm de *ahpC* foram mais altos na fase exponencial do que na fase estacionária quando *C. crescentus* NA1000

creceu em PYE. Em ambos os trabalhos foram utilizados ensaios de expressão que avaliam a transcrição do gene, entretanto os resultados foram diferentes.

Isto pode ter ocorrido devido às características de cada método empregado nos trabalhos. No ensaio de atividade da β -galactosidase, a avaliação da transcrição do gene *ahpC* ocorreu de uma forma mais indireta, pois após a transcrição do gene repórter *lacZ* (dependente da região promotora de *ahpC*) foi necessária a tradução desse RNAm, gerando a proteína β -galactosidase. Essa proteína foi descrita como sendo razoavelmente estável (TUMMALA; WELKER; PAPOUTSAKIS, 1999), e pode acumular-se durante um período no citoplasma, o que pode ter influenciado os resultados do ensaio, gerando uma falsa conclusão de que ocorre aumento da expressão de *ahpC* durante a fase estacionária de *C. crescentus*. Entretanto, no RT-PCR semiquantitativo a avaliação da transcrição foi mais direta, já que apenas a conversão do RNA total em cDNA influencia o ensaio. Por isso, serão necessários outros ensaios, como o RT-PCR quantitativo, para determinar qual é o comportamento do gene *ahpC* durante as fases de crescimento de *C. crescentus*.

Com o intuito de determinar os agentes oxidantes que ativam a transcrição do gene *ahpC* em *C. crescentus*, foram realizados ensaios de atividade da β -galactosidase na presença do peróxido inorgânico H_2O_2 e do peróxido orgânico tBOOH. Nesses ensaios foi possível observar a indução da expressão de *ahpC* na presença de $60 \mu M$ de H_2O_2 (Figura 22A). Essa concentração de agente oxidante foi utilizada porque estava padronizada no trabalho de Italiani, et al. (2011), porém, enquanto a catalase-peroxidase (*katG*) é induzida após 15 min da adição de H_2O_2 , o gene *ahpC* foi melhor induzido após 30 min. Além disso, quando fizemos o ensaio de qRT-PCR na presença de H_2O_2 (Figura 22B), os níveis de RNAm de *ahpC* aumentaram para 2,73 vezes com quinze minutos e para 3,1 vezes após trinta minutos de exposição, em comparação a NA1000 sem agente oxidante. Estes resultados demonstram que ocorre indução da transcrição de *ahpC*, quando a célula é exposta H_2O_2 .

Além disso, nos ensaios de atividade da β -galactosidase na presença de peróxido orgânico (tBOOH) também foi possível observar que ocorreu a indução da expressão de *ahpC*, e com isso foi possível determinar o tempo e a concentração ideais para a indução da expressão do gene *ahpC* na presença de tBOOH em meio rico (Figuras 23 e 24). A indução ocorreu a partir de $100 \mu M$ de tBOOH após 15 minutos da adição do agente, então optamos por utilizar a concentração de $200 \mu M$

de tBOOH, com o intervalo de 30 minutos após a adição do agente, como tratamento.

Este aumento da expressão de *ahpC* de *C. crescentus* NA1000, na presença de H₂O₂ ou tBOOH foi um resultado esperado, visto que a proteína AhpCF é uma peroxirredoxina pertencente à família das peroxidases que reduzem divalentemente H₂O₂ e/ou peróxidos orgânicos, por meio de um sítio ativo de tiolato, gerando um intermediário ácido sulfênico (IMLAY, 2008). Na família das peroxidases, além da alquil-hidroperóxido redutase também estão incluídas as catalases. As catalases atuam diferentemente das alquil-hidroperóxido redutases, pois reduzem apenas peróxido inorgânico por meio do seu grupo prostético heme, nesse processo a redução de duas moléculas de peróxido de hidrogênio leva à formação de duas moléculas de água e uma molécula de oxigênio (revisto por ITALIANI et al., 2011; NDONTSA; MOORE; GOODWIN, 2012; SEEVER; IMLAY, 2001;). Embora ambas as enzimas possuam a mesma função, reduzir peróxido, nas células cada uma dessas enzimas atua dependendo de condições específicas.

A peroxirredoxina AhpC é a proteína primária responsável pela retirada de H₂O₂ endógeno de *E. coli*, porque ela é capaz de retirar o peróxido de hidrogênio quando ele está em baixas concentrações. Contudo, em altas concentrações o H₂O₂ é retirado principalmente pela catalase, porque a atividade da alquil-hidroperóxido redutase é limitada pela disponibilidade de NAD(P)H (SEEVER; IMLAY, 2001). Em outras espécies de bactérias, a função de proteção de AhpC contra estresse oxidativo também tem sido descrita, como *Thermotoga marítima* (LAKHAL et al., 2011), *Helicobacter cinaedi* (CHAROENLAP et al., 2012) e *Pseudomonas aeruginosa* (PANMANEE; HASSETT, 2009). Para *Helicobacter cinaedi*, AhpC contribui para a proteção contra peróxidos orgânicos, já que na presença de tert-butil hidroperóxido o mutante *ahpC* foi menos resistente que a cepa selvagem (CHAROENLAP et al., 2012).

Contudo, a indução da expressão de *ahpC* por tBOOH observada em meio rico nos ensaios de atividade da β-galactosidase não foi observada em meio mínimo (Figura 25A). Este mesmo padrão foi observado nos ensaios de qRT-PCR, já que não encontramos a indução em quinze minutos (1,06 vezes), e em trinta minutos encontramos um início de repressão, pois os níveis de RNAm de *ahpC* estão menores (0,61 vez) do que o observado sem estresse (Figura 25B).

O estudo de Hottes et al. (2004) comparou os diferentes genes que são expressos em *C. crescentus* NA1000 em meio complexo (PYE) e meios mínimos com glicose ou xilose como fonte de carbono (M2G e M2X), por meio da análise de microarranjos de DNA. Nesse trabalho o gene *ahpC* não foi diferentemente expresso nos meios estudados, mas em nosso estudo utilizando o ensaio de atividade da β -galactosidase, apesar de sua expressão basal não ser alterada entre os meios PYE e M2G, sua expressão quando induzido por agentes oxidativos foi diferente em meio rico ou meio mínimo, pois a indução em presença de peróxido orgânico só foi observada em meio rico. No trabalho de Christian et. al (1985) com *Salmonella typhimurium*, os autores observaram que a proteína AhpC é constitutivamente expressa, mas essa expressão basal é independente da regulação por OxyR, que é observada na presença de peróxido de hidrogênio. Com isso, talvez em M2G a quantidade de AhpC constitutivamente expressa seja suficiente para a retirada do peróxido orgânico tBOOH.

No trabalho de Liebal et al. (2012) com *Bacillus subtilis*, foi demonstrado por meio de um modelo matemático de “instabilidade pós-transcricional” avaliado por experimentos de *Northern* e *Western blot*, que pode ocorrer um aumento da degradação de proteínas no citoplasma como adaptação do proteoma frente à mudanças ambientais, após a ativação da resposta a estresse geral. Com isso, a ausência da atividade da β -galactosidase em alguns experimentos não ocorreu devido à ausência da ativação do gene estudado, mas devido ao efeito da proteólise da proteína repórter para o citoplasma retornar ao equilíbrio proteômico, após uma resposta a estresse (LIEBAL et al., 2012). A partir disso, possivelmente quando acrescentamos tBOOH à cultura de *C. crescentus*, crescendo em meio mínimo M2, pode ter ocorrido a proteólise da proteína repórter β -galactosidase após ativação da resposta a estresse oxidativo, para que o citoplasma permanecesse em equilíbrio proteômico.

No entanto, como no ensaio de qRT-PCR também não observamos a indução do gene *ahpC*, em meio mínimo, na presença de tBOOH, pode ser que a indução observada em PYE seja resultado da interação de tBOOH com alguma molécula ou composto, presentes neste meio complexo. Esta interação poderia gerar espécies reativas de oxigênio, que seriam responsáveis pela ativação da transcrição de *ahpC*. Desta forma, no meio mínimo não ocorreria a formação de ROS, e por isso o gene

ahpC não seria diferencialmente expresso tanto no ensaio de atividade da β -galactosidase quanto no ensaio de qRT-PCR.

Após a etapa de caracterização do padrão de expressão de *ahpC*, testamos se havia regulação por OxyR, visto que o promotor possui uma sequência consenso para sua ligação que foi identificada para *C. crescentus* no trabalho de Italiani et. al (2011) (Figura 18). Por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase observamos que na linhagem mutante $\Delta oxyR$ a indução do aumento da expressão de *ahpC* na presença de tBOOH que foi observada na linhagem selvagem NA1000 foi perdida, demonstrando que OxyR possui papel regulatório sobre a expressão do gene *ahpC* em *C. crescentus* (Figura 26).

Além disso, verificamos a expressão e a regulação do gene *ahpC* por meio de ensaios de qRT-PCR na linhagem selvagem NA1000 e nas linhagens mutantes Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$ de *C. crescentus* na presença de agentes oxidantes geradores de superóxido.

Na presença de 50 μ M de paraquat o gene *ahpC* teve sua expressão aumentada nas linhagens NA1000 e Δfur , enquanto que nas linhagens $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$ não ocorreu alteração da expressão. Contudo, na linhagem $\Delta oxyR$ o gene *ahpC* foi menos expresso (Figura 27). Com isso entende-se que o regulador de transcrição Fur não influencia a regulação da transcrição de *ahpC*, visto que a expressão foi semelhante à encontrada na linhagem selvagem NA1000. Os fatores sigma de função extracitoplasmática σ^F e σ^J podem ter uma função regulatória sobre *ahpC* mesmo que esta regulação seja indireta, pois na ausência desses sigmas houve alteração na resposta a paraquat. Corroborando os resultados demonstrados nos ensaios anteriores com peróxidos, o regulador transcricional OxyR também regula a transcrição de *ahpC* na presença de paraquat. O aumento da expressão de *ahpC* nas linhagens NA1000 e Δfur pode ter ocorrido devido à formação de peróxidos no citoplasma celular decorrente da atividade das superóxido dismutases que convertem o superóxido em peróxido e água. Mesmo na presença de peróxido, devido à dismutação do superóxido, não houve aumento na expressão de *ahpC* no mutante $\Delta oxyR$, porque a ausência do regulador transcricional OxyR impediu a indução da transcrição do gene codificador da proteína AhpC.

Quando as linhagens foram submetidas a 50 μ M de menadiona o gene *ahpC* teve sua expressão aumentada nas linhagens NA1000, Δfur , $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$, já na linhagem $\Delta oxyR$ este gene foi menos expresso (Figura 28), confirmando novamente

a regulação de *ahpC* por OxyR. Embora nas linhagens NA1000, Δfur , $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$ tenha ocorrido aumento da expressão de *ahpC*, a intensidade desse aumento foi diferente entre as linhagens. Nas linhagens Δfur e $\Delta sigF$ o aumento da expressão de *ahpC* foi maior que o observado na linhagem selvagem, o Δfur manteve o padrão observado no ensaio com paraquat, enquanto no $\Delta sigF$ o resultado observado foi diferente do encontrado no ensaio com paraquat. Na linhagem $\Delta sigJ$ o aumento da expressão de *ahpC* foi menor que o observado na linhagem selvagem, mas foi maior que o observado na presença de paraquat.

O aumento da expressão de *ahpC* nos mutantes $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$ diferentemente do ocorrido na presença de paraquat, pode ter ocorrido devido à maior concentração de superóxido. Embora a menadiona comporte-se como uma droga ciclo-redox geradora de superóxido, ela é a vitamina K₃, e pode ter sido usada pela célula como um suplemento (DOAN et al., 1999). Neste caso, possivelmente, a geração de superóxido seria aumentada pela manutenção da menadiona no citoplasma para sua utilização no metabolismo celular, e deste modo os níveis de expressão relativa seriam maiores que os observados na presença de paraquat. Contudo, para as linhagens mutantes Δfur , $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$ novos ensaios serão necessários para definir a expressão de *ahpC* na presença de menadiona, visto que com os atuais resultados não temos um desvio padrão confiável.

Na presença de 25 μ M ou 50 μ M de pirogalol o gene *ahpC* teve sua expressão aumentada na linhagem Δfur , enquanto nas linhagens NA1000 e $\Delta sigF$ não ocorreu alteração da expressão e, nas linhagens $\Delta oxyR$ e $\Delta sigJ$ o gene foi menos expresso (Figura 29). Acreditamos que provavelmente, nas linhagens NA1000 e $\Delta sigF$ a quantidade da enzima AhpC constitutivamente expressa já é suficiente para a retirada de H₂O₂ que pode ser formada na segunda etapa da oxidação do pirogalol (Figura 12), por isso, não houve alteração da expressão.

No mutante $\Delta oxyR$ a regulação de *ahpC* na presença de pirogalol foi semelhante à observada nos outros agentes estressores, corroborando a regulação por meio da proteína OxyR. Com relação ao mutante Δfur , a expressão do gene *ahpC* manteve-se alta na presença de paraquat, menadiona e pirogalol. Assim, acreditamos que a ausência de controle da concentração intracelular de ferro, pode acelerar a formação de espécies reativas de oxigênio devido à reação de Harber-Weiss ou reação de Fenton (Figura 2). Portanto, seria necessária a presença de *ahpC* para retirada de H₂O₂, para que o peróxido de hidrogênio não reaja com o

superóxido (gerado pelas drogas ciclo-redox) na presença de ferro e forme o radical hidroxila. Esse radical é muito reativo, uma vez que ataca o DNA causando-o lesões e leva à peroxidação de lipídeos (NUNOSHIBA et al., 1999).

De maneira geral, o gene *ahpC* foi principalmente regulado pelo fator de transcrição OxyR, no entanto pode ser regulado também pelos fatores sigma de função extracitoplasmática σ^F e σ^J de maneira ainda desconhecida. O σ^F foi inicialmente caracterizado como necessário para a sobrevivência de *C. crescentus* na presença de H_2O_2 e na fase estacionária (ALVAREZ-MARTINEZ; BALDINI; GOMES, 2006), mas o σ^J ainda não foi publicado.

A proteína OxyR, em *E. coli*, é um fator de transcrição da família LysR, que é ativado por H_2O_2 pela oxidação do resíduo de cisteína 199 (IMLAY, 2008). Quando esse fator é ativado, ele se liga à região promotora dos genes pertencentes ao seu regulon, dentre eles *ahpCF*, estimulando sua transcrição (IMLAY, 2008). Conseqüentemente, a inativação do gene *oxyR* resultou no aumento da sensibilidade a peróxidos e outros oxidantes em muitas bactérias, como *Xanthomonas* (MONGKOLSUK et al., 1998), *Streptomyces coelicolor* (HAHN; OH; ROE, 2002), *Pseudomonas aeruginosa* (OCHSNER et al., 2000), *Brucella abortus* (KIM; MAYFIELD, 2000), *Burkholderia pseudomallei* (LOPRASERT et al., 2002) e *Sinorhizobium meliloti* (LUO et al., 2005). Em *C. crescentus* NA1000, embora exista uma diferença na região hélice-alça-hélice de OxyR, quando comparada à proteína de *E. coli*, os dois resíduos de cisteína são conservados. Nessa bactéria, a linhagem mutante $\Delta oxyR$ demonstrou ser sensível a peróxido de hidrogênio, tanto na fase exponencial quanto na fase estacionária (ITALIANI et al., 2011). Além disso, ficou comprovado que a catalase-peroxidase, codificada pelo gene *katG*, é regulada por OxyR na fase estacionária e em resposta a peróxido de hidrogênio (ITALIANI et al., 2011). Com isso, em estudos posteriores, a indução de *ahpC* de *C. crescentus* em fase estacionária precisará ser avaliada na linhagem mutante $\Delta oxyR$ a fim de determinar se a regulação de *ahpC* também ocorre na fase estacionária como observado para o gene *katG*.

Nas bactérias Gram-positivas *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*, que não possuem o regular OxyR, o sensor para H_2O_2 é a proteína PerR, e muitos dos genes regulados por ela são homólogos ou análogos aos genes pertencentes ao regulon OxyR de *E. coli*, dentre eles *AhpCF* e *Fur* (IMLAY, 2008). Contudo, o regulador PerR atua de forma distinta do regulador OxyR. Segundo o modelo que

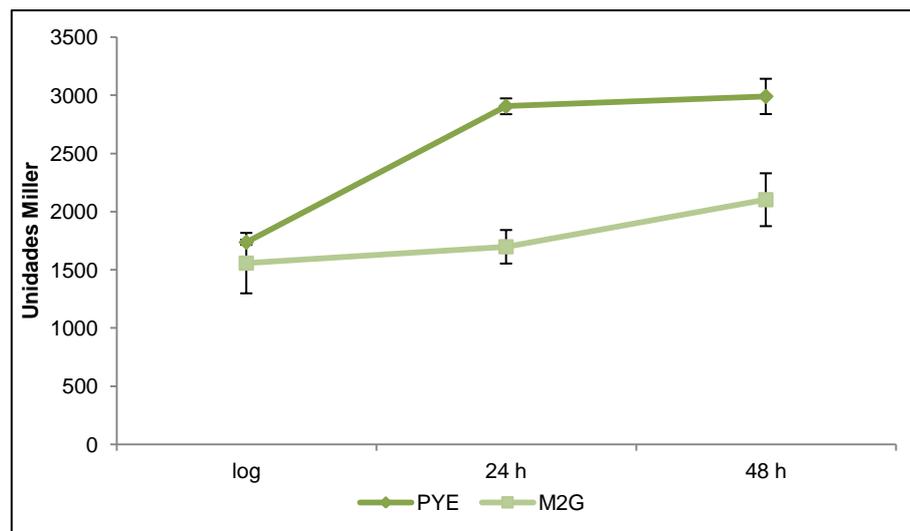
medeia a repressão dos genes-alvo por PerR, em condições não oxidantes a proteína PerR liga-se à região promotora dos gene alvo impedindo o acesso da RNA polimerase a esses promotores. Na presença de peróxido, ocorre uma mudança estrutural em PerR que o torna incapaz de ligar-se ao DNA, permitindo assim que a RNA polimerase tenha acesso à região promotoras dos genes regulados por PerR (DUBBS; MONGKOLSUK, 2007; DUBBS; MONGKOLSUK, 2012).

Tabela 6 - Variação da expressão dos genes normalizadores utilizados nos ensaios de qRT-PCR

Agente	Normalizador		Média	Desvio padrão
	Gene	Proteína		
Peróxidos	CC_0005	DnaQ	23,53	0,54
	CC_0088	hipotética	21,42	0,98
	CC_3760	Rho	20,04	0,37
Superóxidos	CC_0005	DnaQ	22,84	0,68
	CC_0088	hipotética	21,10	1,61
	CC_3760	Rho	21,55	1,06

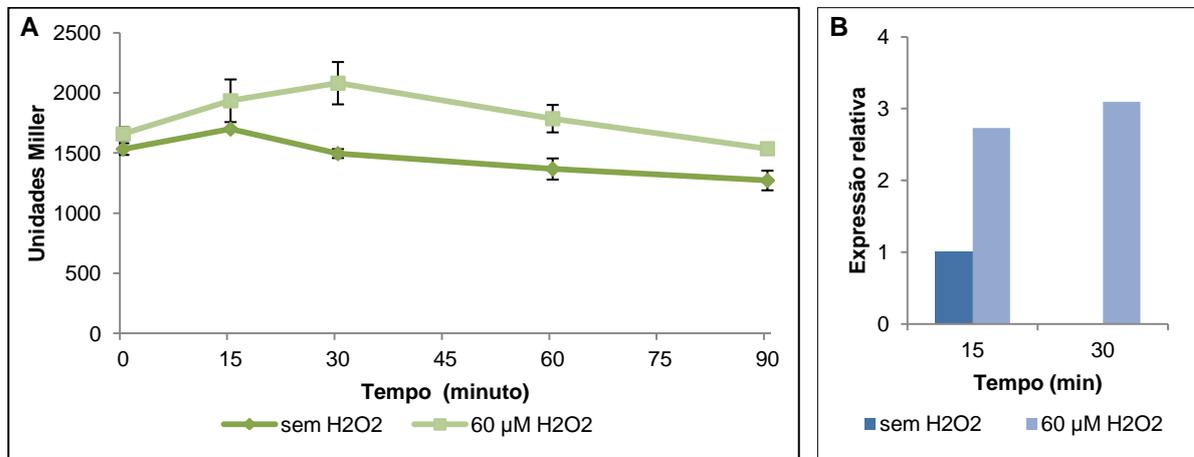
Nota: A média corresponde à variação encontrada entre os Cts de cada gene na presença e ausência dos agentes oxidantes. O Ct é um valor determinado pelo número de ciclos necessários para o início da amplificação da sequência gênica-alvo presente no cDNA de cada amostra.

Figura 21 - Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de *ahpC* na fusão de transcrição



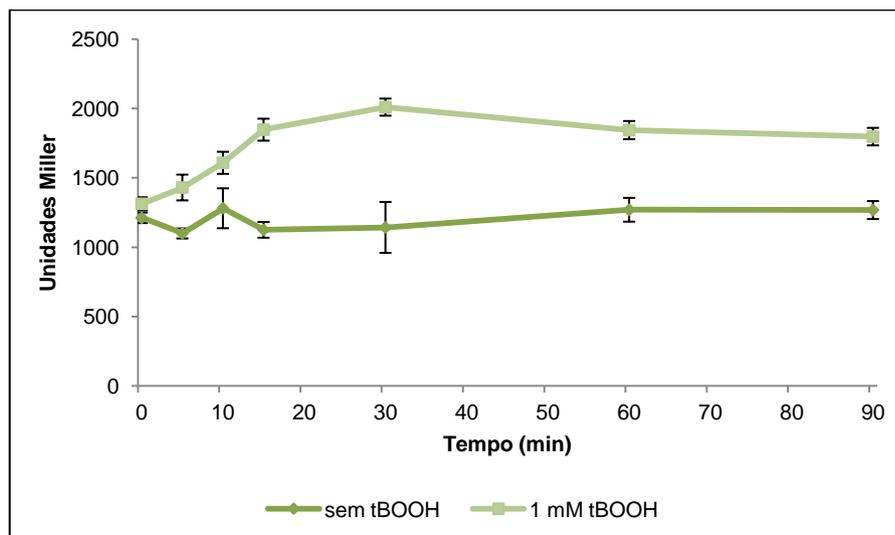
Análise da expressão do gene *ahpC* por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de *ahpC* na fusão de transcrição com a cultura em fase logarítmica ($DO_{600} \approx 0,5$) e estacionária (24 h e 48 h após a $DO_{600} = 0,1$). Os ensaios foram realizados em meio rico (PYE) e meio mínimo (M2G) com a linhagem selvagem *C. crescentus* NA1000. As médias representam dois ensaios independentes com triplicata técnica.

Figura 22 - Análise da expressão de *ahpC* em resposta a H_2O_2 por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo



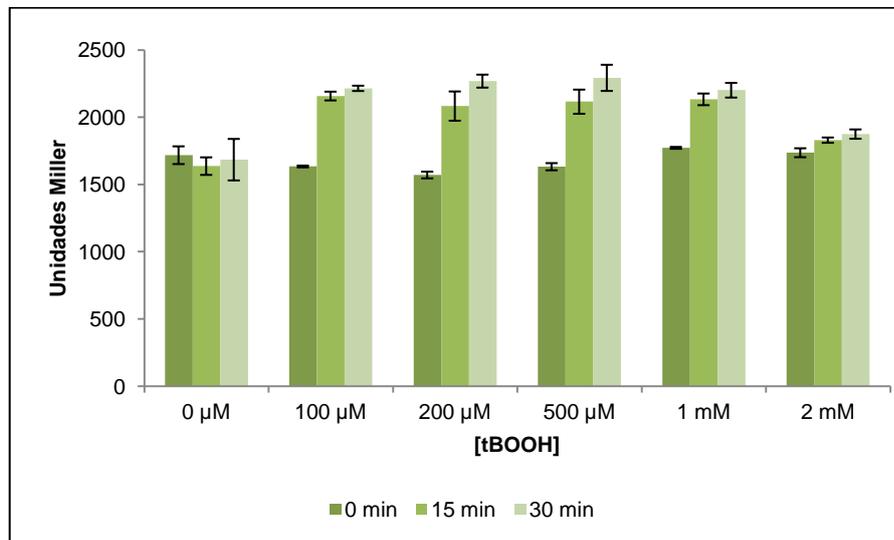
A. Análise da expressão do gene *ahpC* por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase, com o promotor de *ahpC* na fusão de transcrição, em vários tempos na presença de 60 μM de H_2O_2 . O ensaio foi realizado em meio rico com a linhagem selvagem *C. crescentus* NA1000. **B.** Análise da expressão de *ahpC* em resposta a 60 μM peróxido de hidrogênio por meio de RT-PCR quantitativo em meio mínimo M2G, com a linhagem NA1000 de *C. crescentus*. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando Rho como controle endógeno. Quando o desvio padrão não estiver indicado o valor apresentado refere-se a um ensaio.

Figura 23 - Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de *ahpC* na fusão de transcrição em tempos diversos na presença de tBOOH



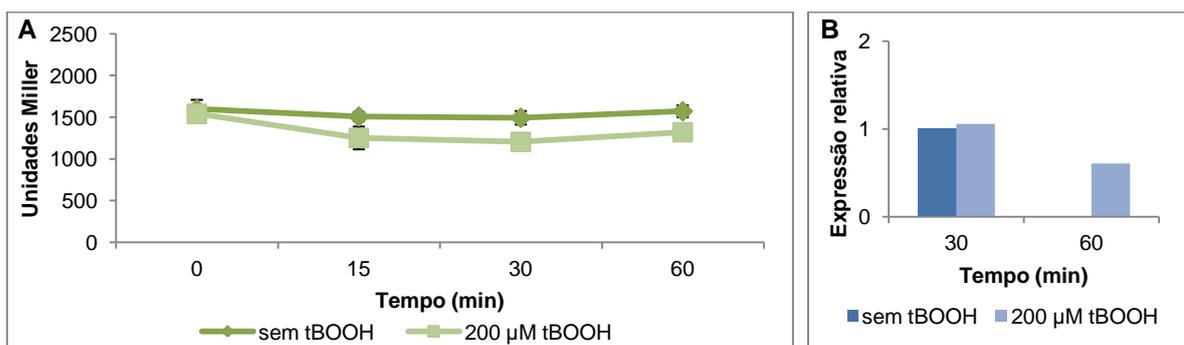
Análise da expressão do gene *ahpC* por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase, com o promotor de *ahpC* na fusão de transcrição, em vários tempos na presença de 1mM de tBOOH. O ensaio foi realizado em meio rico com a linhagem selvagem *C. crescentus* NA1000.

Figura 24 - Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de *ahpC* na fusão de transcrição em várias concentrações de tBOOH



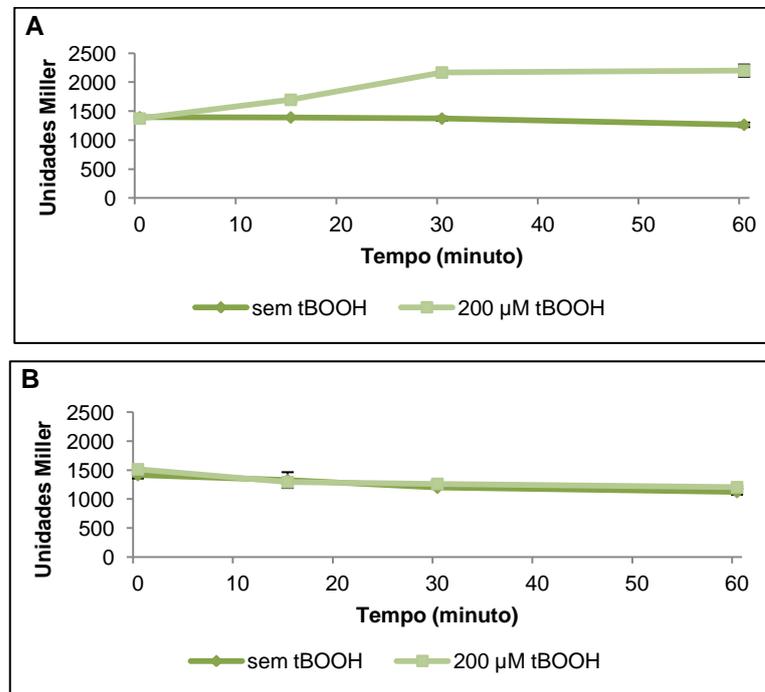
Análise da expressão de *ahpC* por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de *ahpC* na fusão de transcrição em diversas concentrações de tBOOH. O ensaio foi realizado em meio rico (PYE) com a linhagem selvagem *C. crescentus* NA1000.

Figura 25 - Análise da expressão de *ahpC* em resposta a tBOOH por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo



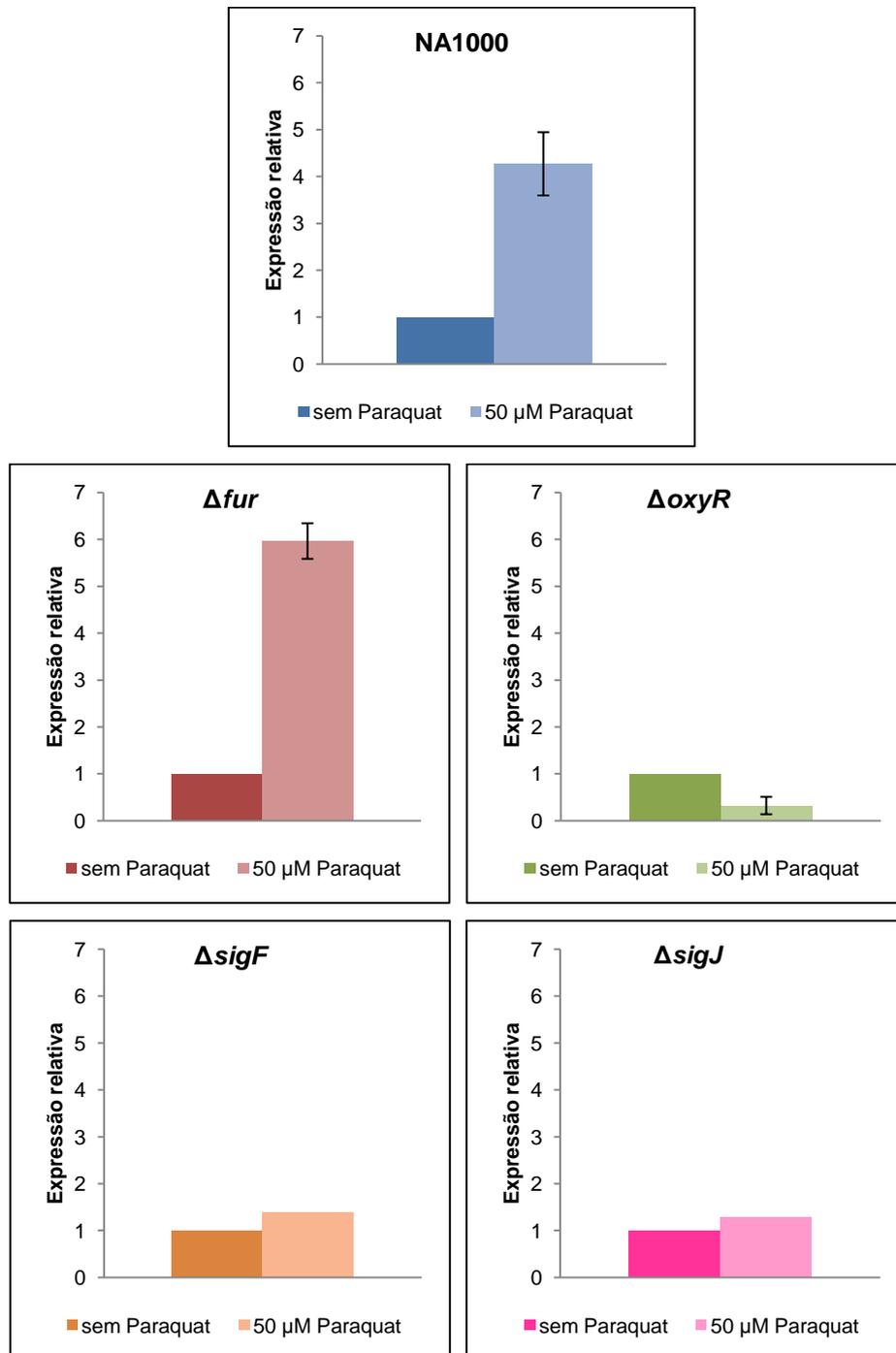
A. Análise da expressão do gene *ahpC* por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de *ahpC* na fusão de transcrição, em vários tempos na presença de 200 μ M de tBOOH. O ensaio foi realizado em meio mínimo com a linhagem selvagem *C. crescentus* NA1000. **B.** Análise da expressão de *ahpC* em resposta a 200 μ M de tBOOH, por meio de RT-PCR quantitativo em meio mínimo M2G, com a linhagem NA1000 de *C. crescentus*. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando Rho como controle endógeno. Quando o desvio padrão não estiver indicado o valor apresentado refere-se a um ensaio.

Figura 26 - Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de *ahpC* na fusão de transcrição nas linhagens de *C. crescentus* NA1000 e $\Delta oxyR$



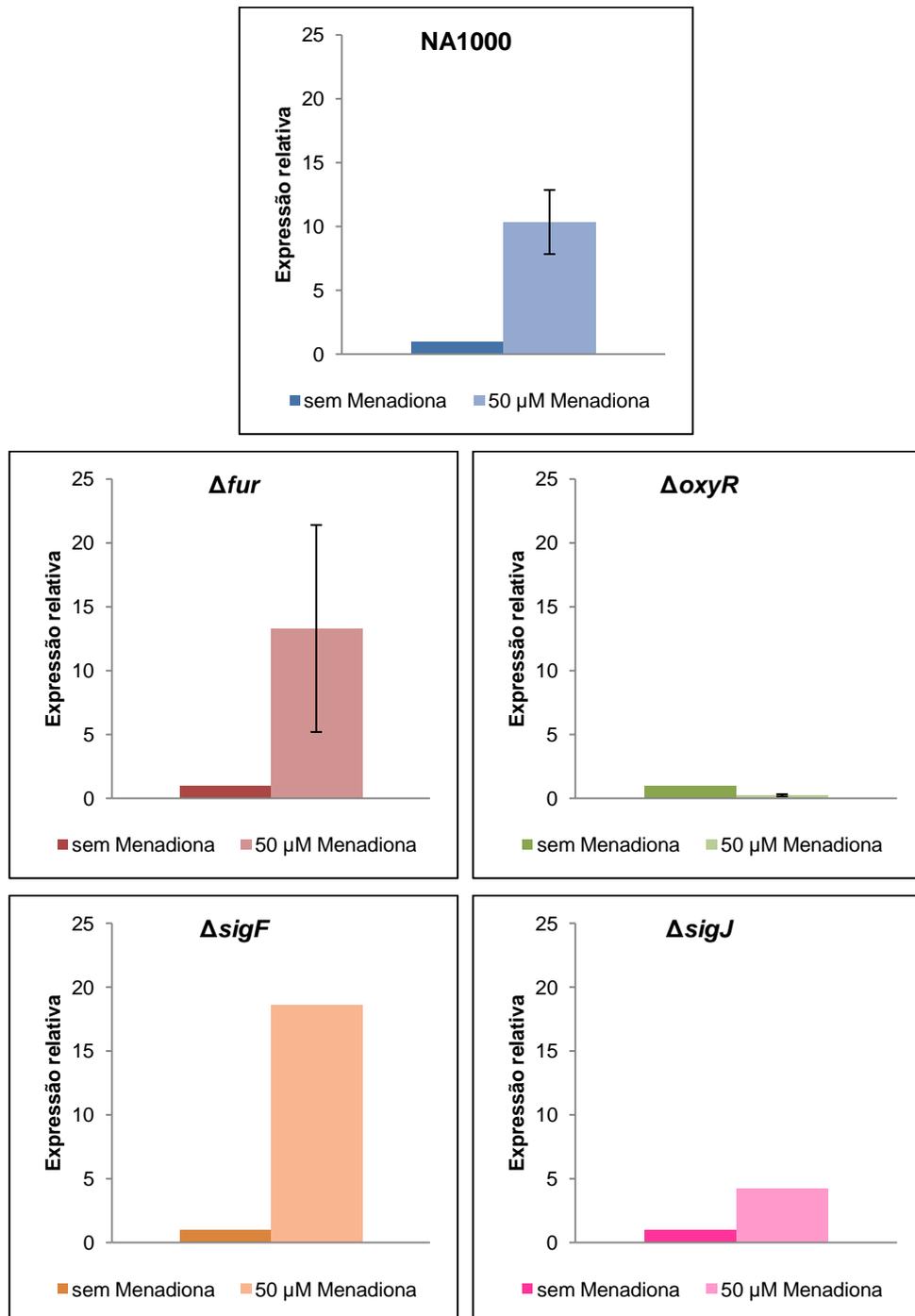
Análise da expressão de *ahpC* por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de *ahpC* na fusão de transcrição. Foi utilizado 200 μ M de tBOOH como agente oxidante em meio rico. **A.** Linhagem selvagem *C. crescentus* NA1000 com o promotor de *ahpC* no vetor pRK*lacZ*290. **B.** Linhagem mutante *C. crescentus* $\Delta oxyR$ com promotor de *ahpC* no plasmídeo pRK*lacZ*290.

Figura 27 - Análise da expressão de *ahpC* em resposta a paraquat por meio de RT-PCR quantitativo



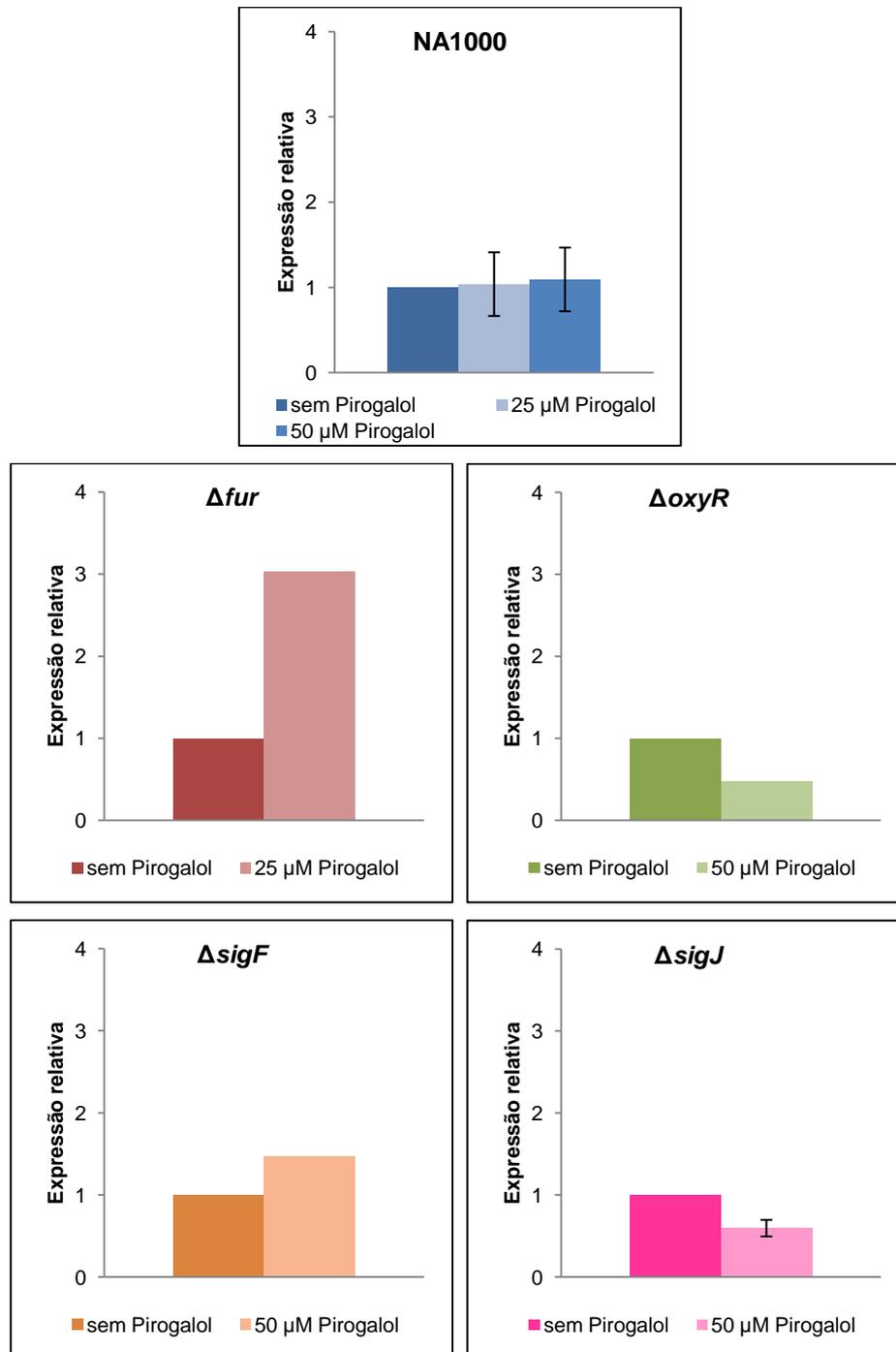
A expressão do gene *ahpC* foi analisada por meio do ensaio de RT-PCR quantitativo. Os níveis do RNAm deste gene foram analisados nas linhagens selvagem (NA1000) e mutantes (Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$) de *C. crescentus* em resposta a paraquat quando cultivada em meio mínimo M2G. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando DnaQ como controle endógeno. Em cada ensaio a média e desvio padrão representam dois ensaios independentes, quando o desvio padrão não estiver indicado o valor apresentado refere-se a um ensaio.

Figura 28 - Análise da expressão de *ahpC* em resposta a menadiona por meio de RT-PCR quantitativo



A expressão do gene *ahpC* foi analisada por meio do ensaio de RT-PCR quantitativo. Os níveis do RNAm deste gene foram analisados nas linhagens selvagem (NA1000) e mutantes (Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$) de *C. crescentus* em resposta a 50 μ M menadiona, quando cultivada em meio mínimo M2G. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando DnaQ como controle endógeno. Em cada ensaio a média e desvio padrão representam dois ensaios independentes, quando o desvio padrão não estiver indicado o valor apresentado refere-se a um ensaio.

Figura 29 - Análise da expressão de *ahpC* em resposta a pirogalol por meio de RT-PCR quantitativo



A expressão do gene *ahpC* foi analisada por meio do ensaio de RT-PCR quantitativo. Os níveis do RNAm deste gene foram analisados nas linhagens selvagem (NA1000) e mutantes (Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$) de *C. crescentus* em resposta a 25 ou 50 μM de pirogalol, quando cultivada em meio mínimo M2G. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando DnaQ como controle endógeno. Em cada ensaio a média e desvio padrão representam dois ensaios independentes, quando o desvio padrão não estiver indicado o valor apresentado refere-se a um ensaio.

3.4 Análise da expressão de *sodA*

A expressão do gene *sodA* foi avaliada, por meio da fusão de transcrição, em culturas expostas a H₂O₂, paraquat, menadiona, sulfato de cádmio (CdSO₄) ou cloreto de cádmio (CdCl₂) em várias concentrações. No entanto, no trabalho de Hu et al. (2005) foi demonstrado que *sodA* tem a expressão basal muito baixa, por isso possivelmente o ensaio de atividade da β-galactosidase não é capaz de detectar variações na expressão do gene *sodA*, sendo necessário o emprego de técnicas mais sensíveis para avaliar a indução desse gene.

Assim, também foi realizado um ensaio de qRT-PCR (RT-PCR quantitativo em tempo real) para estudar a expressão do gene *sodA* em *C. crescentus* NA1000. Os ensaios de qRT-PCR foram feitos a partir do RNA extraído de culturas crescendo exponencialmente em meio mínimo (M2) acrescido dos seguintes agentes: paraquat, menadiona, pirogalol, FeSO₄, DDPI, H₂O₂ ou tBOOH, para posterior comparação dos níveis relativos de RNAm com os presentes em *C. crescentus* NA1000 sem agentes.

Para avaliar a indução da expressão de *sodA* por agentes geradores de superóxido, ensaios de atividade da β-galactosidase foram realizados em meio rico na presença e ausência de paraquat. Porém, por meio desse método não foi possível observar aumento de expressão de *sodA* na presença do agente oxidante (Figura 30A). No entanto, no ensaio de qRT-PCR, *sodA* foi mais expresso na presença de paraquat (Figura 30B). Em *E. coli*, quando a expressão de *sodA* foi monitorada por ensaio de atividade da β-galactosidase por meio do promotor desse gene em fusão com *lacZ*, na presença de 50 μM de paraquat foi possível observar uma alta indução do gene *sodA* (COMPAN; TOUATI, 1993). Essa fusão construída em *E. coli* integrava-se ao cromossomo por recombinação homóloga, diferentemente da fusão em plasmídeo utilizada no nosso trabalho, onde é possível ocorrer de três a cinco plasmídeos por célula. Havia apenas uma cópia do gene *lacZ* com a transcrição dirigida pelo promotor de *sodA* e mesmo assim, as unidades Miller eram próximas a 3370 unidades após 40 minutos da adição do agente indutor, enquanto sem adição as unidades correspondiam a 510 unidades Miller (COMPAN; TOUATI, 1993).

Comparando essas unidades Miller com os valores encontrados em nossos experimentos, em *C. crescentus* a transcrição de *sodA* no nosso trabalho foi muito menor que a encontrada em *E. coli*. Isto pode ter ocorrido porque o fragmento

utilizado na construção da fusão de transcrição foi delineado sem uma parte do motivo m_8 descrito no trabalho de McGrath et al. (2007) (Figura 15). Com isso, é possível que a construção da fusão de transcrição não tenha o motivo para ligação de uma proteína ativadora que atue na regulação do gene *sodA*, impedindo assim, que o aumento da expressão deste gene seja observado nos ensaios de atividade da β -galactosidase.

Em *C. crescentus* NA1000 o gene *sodA*, também não foi induzido na presença de paraquat ou xantina/hipoxantina no trabalho de Alvarez-Martinez, Baldini e Gomes (2006) avaliado por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase. No entanto, os autores encontraram que o gene *sodA* é induzido no início da fase estacionária (12h) sob a regulação do sigma ECF, denominado σ^F , por meio de ensaios de RT-PCR (semiquantitativo). Isto corrobora o perfil encontrado nos nossos ensaios, onde o ensaio de atividade da β -galactosidase não é capaz de detectar diferenças de expressão para o gene *sodA*, mas, em ensaios de RT-PCR quantitativo ou semi quantitativo as alterações na expressão são demonstradas.

Para verificar se o gene *sodA* possui níveis de expressão diferenciados entre as fases exponencial e estacionária, ensaios de atividade da β -galactosidase em meio rico foram realizados no meio da fase logarítmica e na fase estacionária (Figura 31), no entanto, não foi possível observar expressão diferenciada entre as fases logarítmica e estacionária. Entretanto, no trabalho de Alvarez-Martinez, Baldini e Gomes (2006) por meio do ensaio de RT-PCT semiquantitativo, foi demonstrado que *sodA* tem sua maior expressão durante a fase logarítmica, mas em 12 h e 24 h a expressão foi menor gradativamente. Com isso, acreditamos que possivelmente não encontramos a indução de *sodA* na fase exponencial, devido ao fragmento utilizado na fusão de transcrição, como descrito anteriormente.

Além disso, testamos se havia indução da expressão na presença de H_2O_2 , mas não observamos indução (Figura 32A). Todavia, no ensaio de qRT-PCR com peróxidos observamos a indução do RNAm de *sodA* na presença de H_2O_2 , mas o mesmo não ocorreu na presença de tBOOH (Figuras 32B e 32C). A indução por peróxido de hidrogênio foi menor do que a observada na presença de geradores de superóxido (Figuras 34, 35 e 36), isso demonstra que a MnSOD também pode estar envolvida na retirada de espécies reativas de oxigênio quando há excesso de peróxido. Embora as superóxido dismutases não estejam diretamente envolvidas na retirada de H_2O_2 intracelular, o gene *sodA* codificador da MnSOD, pode ter sido

induzido na presença de peróxido para evitar a formação do radical hidroxila. Isso ocorre porque o ânion superóxido é capaz de liberar o ferro que está em moléculas, como as proteínas com grupos ferro-enxofre, favorecendo assim, a reação de Fenton (revisto por TOUATI, 2000).

Com o intuito de validar a indução do gene *sodA* observada por Hu et al. (2005) na presença de cádmio (CdSO_4), fizemos ensaios de atividade da β -galactosidase com o metal pesado cádmio nas formas CdCl_2 e CdSO_4 , utilizando várias concentrações a partir de 6 μM , que foi a concentração utilizada no trabalho citado, mas não foi possível observar a indução da expressão do gene *sodA* por meio desse ensaio (dados não apresentados). Sabe-se que no trabalho de Hu et al. (2005), *sodA* de *C. crescentus* CB15 foi o principal gene na resposta transcricional aos metais pesados cádmio, urânio, cromato e dicromato em ensaios de microarranjos de DNA. Contudo, não foi possível fazer um ensaio de qRT-PCR para verificar o padrão de indução de *sodA* de *C. crescentus* NA1000 na presença do metal cádmio.

No entanto, outros trabalhos demonstraram que *C. crescentus* NA1000 possui quatro fatores sigma de função extracitoplasmática σ^E , σ^F e σ^T/σ^U que estão envolvidos na resposta a metais pesados. Todavia, o gene *sodA* não faz parte do regulon desses sigmas quando estes foram analisados na presença de cádmio (KOHLENER et al., 2012; LOURENÇO; GOMES, 2009; LOURENÇO; KOHLER; GOMES, 2011). Cada um desses fatores sigma é responsável por regular um conjunto distinto de genes, indicando que cada fator contribui de maneira diferente na resposta a metal pesado em *C. crescentus* (KOHLENER et al., 2012). Uma vez que a análise completa do genoma de *C. crescentus* identificou 13 fatores sigma de função extracitoplasmática (NIERMAN; FELDBLYUM; LAUB, 2001), possivelmente o fator responsável pela regulação da expressão de *sodA* na presença dos metais pesados ainda não foi estudado.

Visto que, em *E. coli*, o gene *sodA* é negativamente regulado por Fur na presença de ferro, a expressão de *sodA* também foi testada em ensaio de atividade da β -galactosidase com excesso e carência de ferro. Em nosso trabalho, não foi observada indução em nenhuma das condições, tanto em meio rico quanto em meio mínimo (Figura 33A e 33B). No entanto, o ensaio de qRT-PCR apresentou o padrão observado em *E. coli*, com a expressão de *sodA* menor na presença de FeSO_4 e expressão maior quando a célula é submetida a DDPi (Figura 33C), quando essas

expressões relativas são comparadas à expressão encontrada sem adição de agentes ao meio de cultura.

Segundo Massé e Gottesman (2002), em *E. coli*, *sodA* é negativamente regulado por Fur, por isso na carência de ferro *sodA* é mais transcrito. Além disso, na presença de ácido nalidíxico, a proteína MnSOD tem seu nível aumentado em duas vezes em *E. coli*, no entanto, esse antibiótico não é capaz de gerar superóxido no citoplasma, mas leva à diminuição do ferro disponível (revisto por Hassan e Moody, 1987). Sabe-se também que oxigenação e diminuição do ferro livre, aumentam a biossíntese de MnSOD em *Pseudomonas aeruginosa* (HASSEIT et al., 1993). Portanto, embora no trabalho de Silva Neto et al. (2009) o gene *sodA* não tenha o sítio de ligação para Fur em sua região promotora, Fur pode ser um regulador indireto desse gene. Por isso, novos estudos serão necessários para caracterizar o papel de Fur na regulação do gene *sodA* de *C. crescentus*.

Para determinar os agentes indutores e o regulador do gene *sodA* em *C. crescentus* foram feitos ensaios de qRT-PCR com a linhagem selvagem NA1000 e as linhagens mutantes Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$ de *C. crescentus*, na presença de agentes oxidantes geradores de superóxido.

Quando as linhagens foram submetidas a 50 μM de paraquat o gene *sodA* teve sua expressão aumentada nas linhagens NA1000 e $\Delta oxyR$, enquanto que na linhagem Δfur não ocorreu alteração da expressão. Contudo, nas linhagens $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$ o gene *sodA* foi menos expresso (Figura 34). Com isso entende-se que o regulador transcricional OxyR, possivelmente, não regula a expressão de *sodA*, visto que a expressão foi semelhante à encontrada na linhagem selvagem NA1000. O regulador de transcrição Fur pode ter uma função regulatória sobre *sodA*, mesmo que esta regulação seja indireta, pois na ausência dessa proteína houve alteração na resposta a paraquat. Em adição ao resultado demonstrado por Alvarez-Martinez, Baldini e Gomes (2006) em fase estacionária, o fator sigma de função extracitoplasmática σ^F regula o gene *sodA* também na presença de paraquat. Além disso, o fator sigma de função extracitoplasmática σ^J também pode ser um regulador de *sodA*, porque a expressão foi menor nesse mutante.

Na presença de 50 μM de menadiona o gene *sodA* teve sua expressão aumentada nas linhagens NA1000, Δfur e $\Delta oxyR$, já na linhagem $\Delta sigF$ não houve alteração da expressão, enquanto que na linhagem $\Delta sigJ$ o gene *sodA* foi menos expresso (Figura 35). No $\Delta oxyR$ ocorreu o aumento da expressão de *sodA* maior

que o observado na linhagem mutante, contudo, o desvio padrão foi alto e por isso serão necessários novos ensaios para definir a função do regulador de transcrição OxyR sobre a regulação da transcrição de *sodA*. Apesar de ter ocorrido um aumento da expressão de *sodA* no mutante Δfur , esse aumento foi menor que o observado em NA1000 e $\Delta oxyR$, por isso é possível que o regular transcricional Fur também tenha função regulatório sobre *sodA* na presença de menadiona. Além disso, a regulação de *sodA* pelo fator sigma de função extracitoplasmática σ^J foi corroborada. No mutante $\Delta sigF$ o aumento da expressão observada na linhagem selvagem foi perdido, corroborando a função regulatória de σ^F sobre o gene *sodA* na presença de superóxido.

Quando as linhagens foram submetidas a 25 μ M ou 50 μ M de pirogalol o gene *sodA* teve sua expressão aumentada nas linhagens NA1000 e $\Delta oxyR$, já na linhagem $\Delta sigF$ não houve alteração da expressão, enquanto que na linhagem $\Delta sigJ$ o gene *sodA* foi menos expresso (Figura 36). Assim, os agentes oxidantes menadiona e pirogalol apresentaram o mesmo padrão de indução de expressão para *sodA*: OxyR provavelmente não atua na regulação de *sodA*, enquanto que os fatores sigma de função extracitoplasmática σ^F e σ^J possivelmente são responsáveis por sua regulação. Na presença de 25 μ M de pirogalol a expressão do gene *sodA* ficou inalterada na linhagem NA1000 e aumentou na linhagem Δfur .

Acreditamos que isto ocorreu porque na linhagem selvagem a quantidade de enzimas antioxidantes já existentes são capazes de retirar o superóxido gerado por 25 μ M de pirogalol, enquanto que no mutante Δfur , que é mais sensível a estresse oxidativo, essa concentração provavelmente foi capaz de gerar superóxido em níveis superiores ao geralmente retirado pelas enzimas antioxidantes que são constitutivamente expressas, necessitando então, diferentemente do ocorrido na linhagem selvagem, aumentar a expressão de *sodA*.

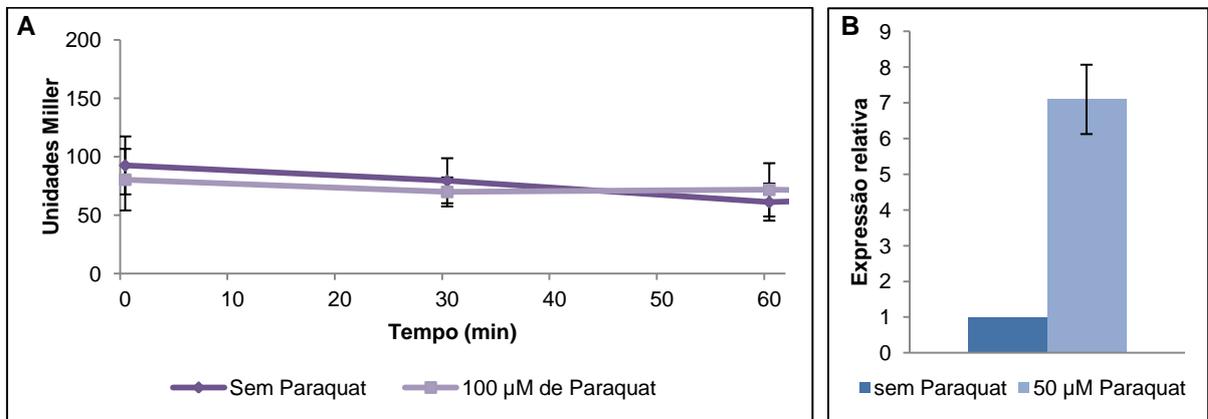
Dessa forma, o gene *sodA* foi aparentemente regulado pelos fatores sigma de função extracitoplasmática σ^F e σ^J . Embora o gene *sodA* já seja descrito como regulado por σ^F no início da fase estacionária e na presença de H_2O_2 (ALVAREZ-MARTINEZ; BALDINI; GOMES, 2006), nós observamos que ele também regula esse gene na presença de superóxidos. O fator σ^J ainda não foi caracterizado, mas segundo nossos estudos ele tem papel importante no estresse oxidativo. Além disso, *sodA* também pode ser regulado por Fur, visto que a expressão observada no mutante Δfur foi sempre diferente da observada na linhagem selvagem NA1000.

Em adição, também foi possível determinar que os agentes oxidantes paraquat, menadiona, pirogalol e H_2O_2 , além do DDPI, são capazes de induzirem à expressão de *sodA* em meio mínimo. Com isso, entende-se que *sodA* é induzido na presença de superóxido, mas a técnica que estávamos usando não era capaz de detectar a indução.

Em trabalhos com *E. coli* onde se estudou a proteína codificada pelo gene *sodA*, a presença de paraquat levou ao aumento da biossíntese de MnSOD (HASSAN; FRIDOVICH, 1978). Enquanto a FeSOD de *E. coli* foi constitutivamente sintetizada, a MnSOD, aumenta sua atividade específica de acordo com a concentração de O_2 , taxa de radicais superóxido (SAKAMOTO; TOUATI, 1984) e presença de paraquat (HASSAN; MOODY, 1987). Além disso, essa proteína também foi induzida em condições de baixo pH em *Lactococcus lactis*, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus* (revisto por BRUNO-BÁRCENA; AZCÁRATE-PERIL; HASSAN, 2010).

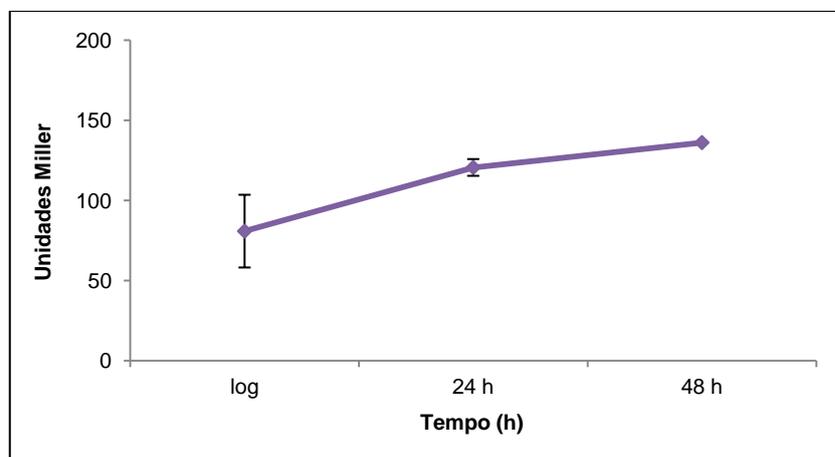
Em *E. coli*, o gene *sodA* é regulado por vários fatores, dentre eles encontram-se o regulador de estresse oxidativo SoxRS e o regulador do metabolismo de ferro Fur (COMPAN; TOUATI, 1993). O regulador SoxRS ativa a transcrição de *sodA* em resposta à drogas ciclo redox (IMLAY, 2013), enquanto o regulador Fur reprime *sodA* em aerobiose (COMPAN; TOUATI, 1993). Contudo, em *C. crescentus*, não encontramos os genes homólogos aos genes *soxR* e *soxS*. Numa comparação entre os aminoácidos presentes nas proteínas SoxR e SoxS de *E. coli*, com as sequências deduzidas das proteínas de *C. crescentus* a similaridade entre os aminoácidos foi muito baixa. Com relação à proteína SoxR, o regulador transcricional da família MerR (CC_3082) foi a proteína com maior identidade (32%). Para SoxS, o regulador transcricional da família AraC (CC_2527), apresentou 34% de identidade com a proteína de *E. coli*. Assim, em *C. crescentus* possivelmente outras proteínas estão envolvidas na regulação de *sodA* na presença de drogas geradoras de superóxido.

Figura 30 - Análise da expressão de *sodA* em resposta a paraquat por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo



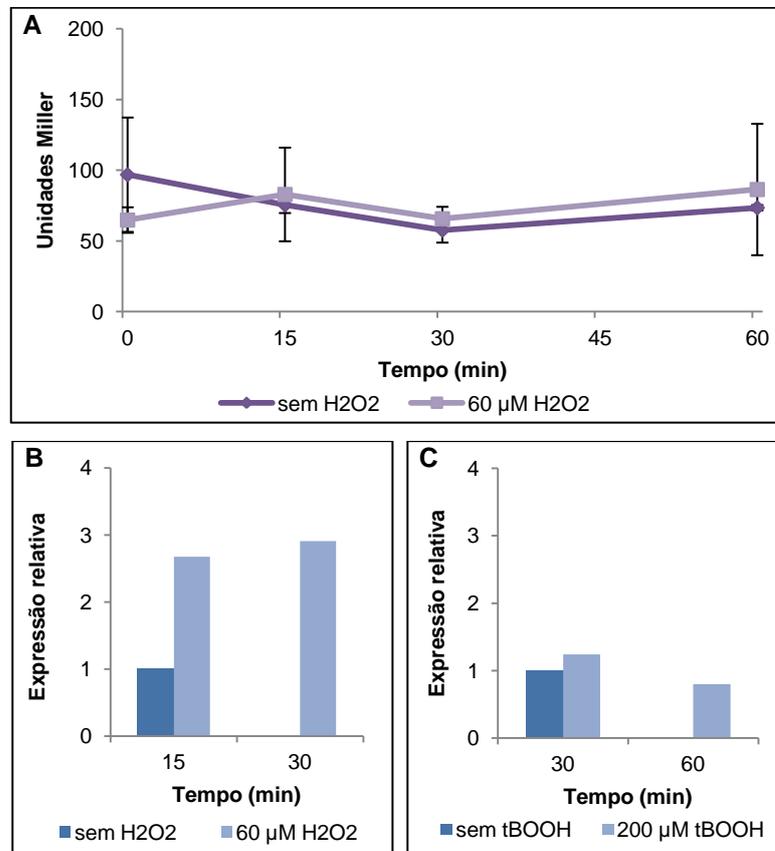
A. Ensaio de atividade da β -galactosidase, em meio rico, com o promotor de *sodA* na fusão de transcrição. **B.** Análise da expressão de *sodA* em resposta a paraquat por meio de RT-PCR quantitativo, em meio mínimo M2, após 60 min da adição do indutor. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando DnaQ como controle endógeno. Ambos os ensaios utilizaram a linhagem *C. crescentus* NA1000.

Figura 31 - Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de *sodA* na fusão de transcrição



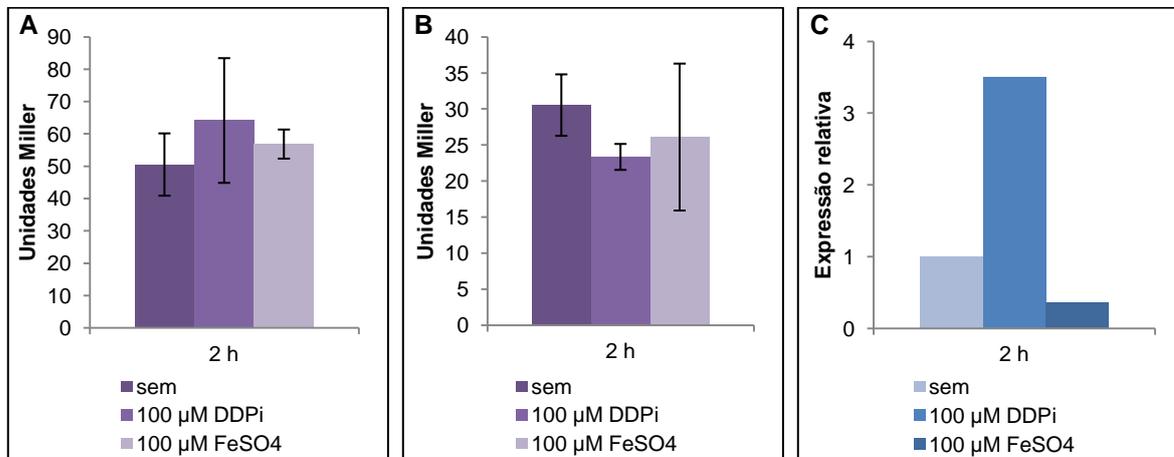
Análise da expressão do gene *sodA* por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor *sodB* na fusão de transcrição (pRKlacZ290) com a cultura em fase logarítmica ($DO_{600} \approx 0,5$) e estacionária (24 h e 48 h após a $DO_{600} = 0,1$). Os ensaios foram realizados em meio rico (PYE) com a linhagem selvagem *C. crescentus* NA1000. As médias representam dois ensaios independentes com triplicata técnica.

Figura 32 - Análise da expressão de *sodA* em resposta a peróxidos por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo



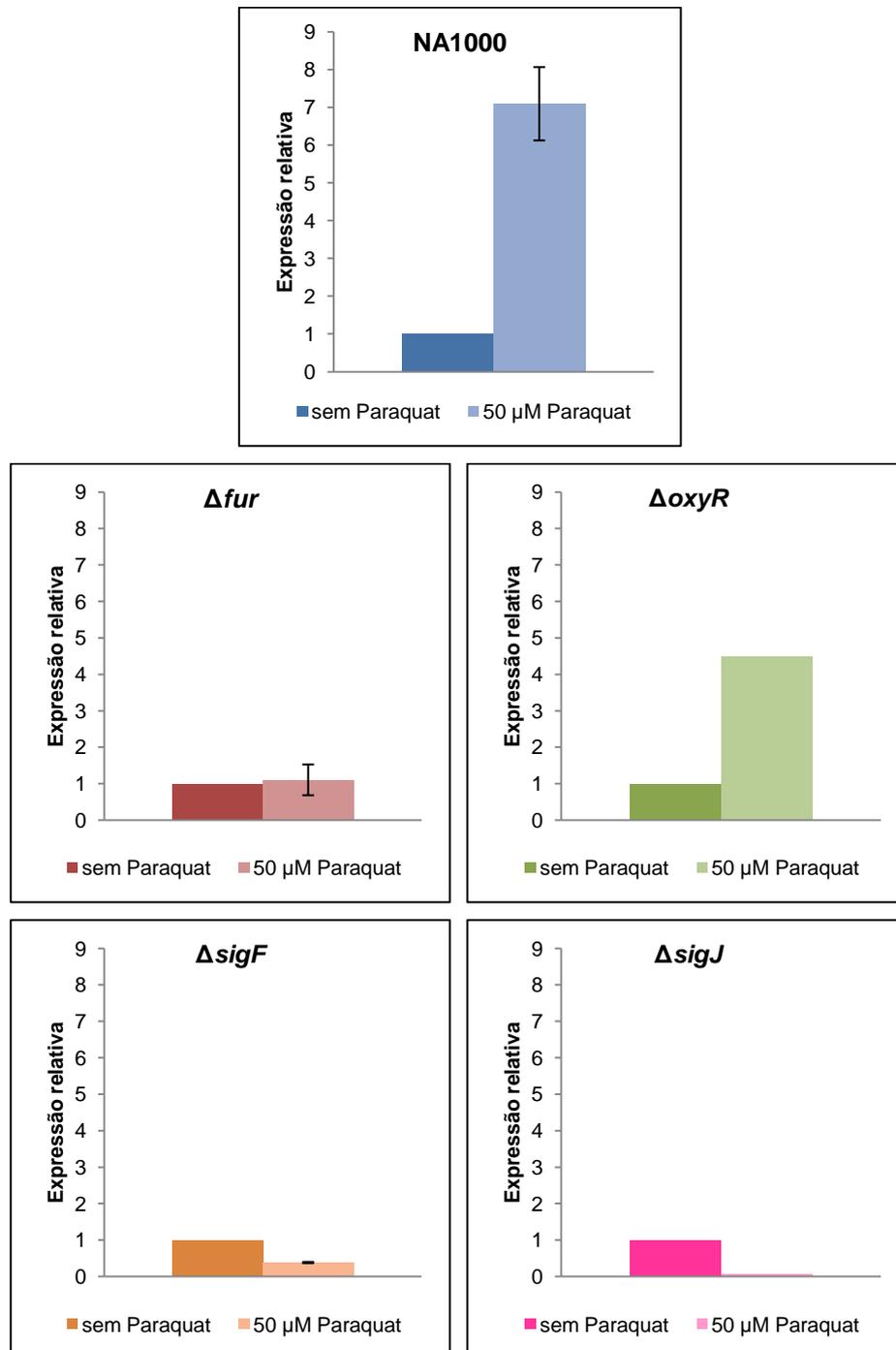
A. Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de *sodA* no pRKlacZ290 (fusão de transcrição), em meio complexo, na presença ou ausência de H₂O₂. **B.** Análise da expressão de *sodA* em resposta a 60 μ M de peróxido de hidrogênio por meio de RT-PCR quantitativo. **C.** Análise da expressão de *sodA* em resposta a 200 μ M de tert-butil hidroperóxido por meio de RT-PCR quantitativo. Os ensaios de qRT-PCR foram realizados com culturas que cresceram em meio mínimo M2G. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando Rho como controle endógeno. Quando o desvio padrão não estiver indicado o valor apresentado refere-se a um ensaio. Ambos os ensaios de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo foram feitos com a linhagem NA1000 de *C. crescentus*.

Figura 33 - Análise da expressão de *sodA* em resposta a ferro por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo



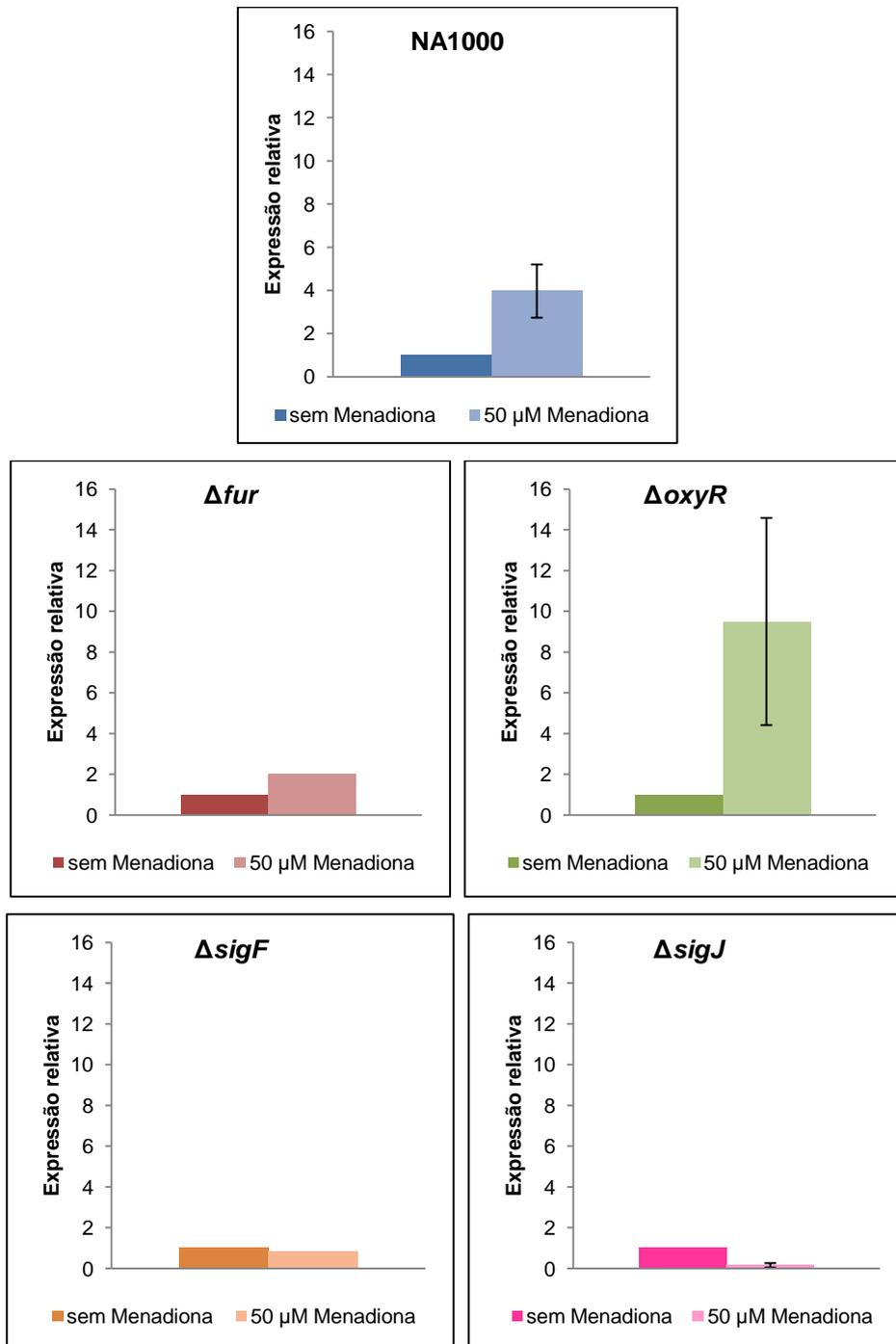
A. Ensaio de atividade da β -galactosidase com a linhagem selvagem de *C. crescentus* NA1000 com o promotor de *sodA* na fusão de transcrição, crescendo em meio rico com 100 μ M FeSO₄ ou 100 μ M DDPi ou sem agentes. **B.** Ensaio de atividade da β -galactosidase com a linhagem *C. crescentus* NA1000 com o promotor de *sodA* no pRK/*lacZ*290, em meio rico com 100 μ M FeSO₄ ou 100 μ M DDPi ou sem agentes. **C.** Análise da expressão de *sodA* em resposta a ferro por meio de RT-PCR quantitativo na linhagem NA1000 cultivada em suficiência de ferro (FeSO₄) ou limitação (DDPi) em meio mínimo M2G. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando Rho como controle endógeno. Quando o desvio padrão não estiver indicado o valor apresentado refere-se a um ensaio.

Figura 34 - Análise da expressão de *sodA* em resposta a paraquat por meio de RT-PCR quantitativo



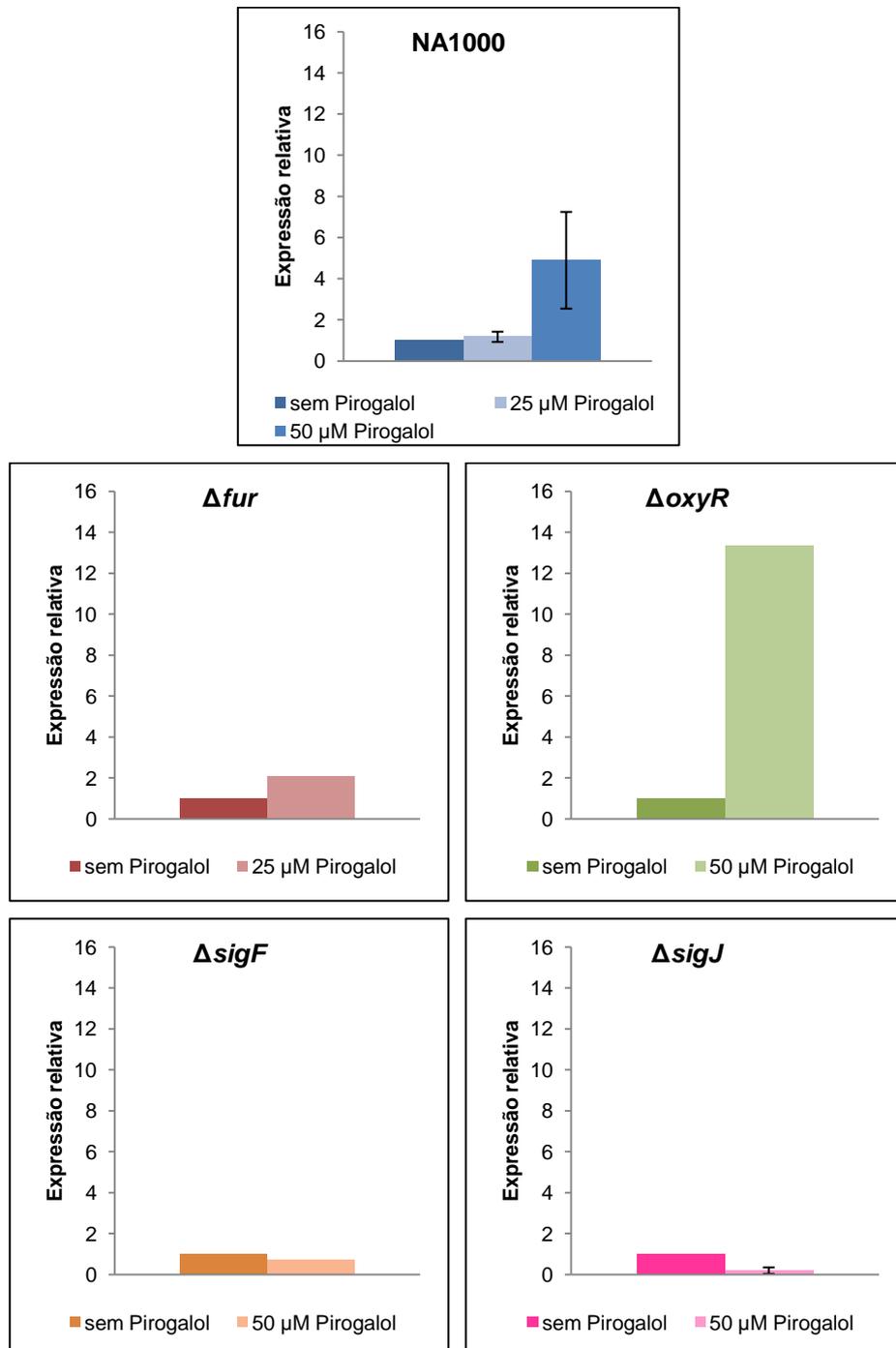
A expressão do gene *sodA* foi analisada por meio do ensaio de RT-PCR quantitativo. Os níveis do RNAm deste gene foram analisados nas linhagens selvagem (NA1000) e mutantes (Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$) de *C. crescentus* em resposta a 50 μM de paraquat, quando cultivada em meio mínimo M2G. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando DnaQ como controle endógeno. Em cada ensaio a média e desvio padrão representam dois ensaios independentes, quando o desvio padrão não estiver indicado o valor apresentado refere-se a um ensaio.

Figura 35 - Análise da expressão de *sodA* em resposta a menadiona por meio de RT-PCR quantitativo



A expressão do gene *sodA* foi analisada por meio do ensaio de RT-PCR quantitativo. Os níveis do RNAm deste gene foram analisados nas linhagens selvagem (NA1000) e mutantes (Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$) de *C. crescentus* em resposta a 50 μM de menadiona, quando cultivada em meio mínimo M2G. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando DnaQ como controle endógeno. Em cada ensaio a média e desvio padrão representam dois ensaios independentes, quando o desvio padrão não estiver indicado o valor apresentado refere-se a um ensaio.

Figura 36 - Análise da expressão de *sodA* em resposta a pirogalol por meio de RT-PCR quantitativo



A expressão do gene *sodA* foi analisada por meio do ensaio de RT-PCR quantitativo. Os níveis do RNAm deste gene foram analisados nas linhagens selvagem (NA1000) e mutantes (Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$) de *C. crescentus* em resposta a 50 μM ou 25 μM de pirogalol, quando cultivada em meio mínimo M2G. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando DnaQ como controle endógeno. Em cada ensaio a média e desvio padrão representam dois ensaios independentes, quando o desvio padrão não estiver indicado o valor apresentado refere-se a um ensaio.

3.5 Análise da expressão de *sodB*

A expressão do gene *sodB* foi avaliada utilizando o ensaio de atividade da β -galactosidase com as culturas crescendo exponencialmente em meio PYE e M2G em condições normais e de estresse oxidativo, gerado pela adição de H_2O_2 , paraquat, $FeSO_4$ ou DDPI. Os ensaios iniciais de qRT-PCR foram feitos em meio mínimo (M2G) acrescido dos seguintes agentes: paraquat, menadiona, pirogalol, $FeSO_4$, DDPI, H_2O_2 ou tBOOH, nas culturas crescendo exponencialmente, com posterior comparação dos níveis relativos com os níveis de NA1000 sem exposição aos agentes.

Para iniciar a caracterização da expressão de *sodB*, fizemos ensaios de atividade da β -galactosidase para determinar se há diferenças na expressão entre as fases exponencial e estacionária (Figura 37). Neste ensaio, foi possível observar que na fase estacionária a expressão de *sodB* é maior que a apresentada na fase logarítmica. Segundo Schnell e Steinman (1995), FeSOD tem a atividade mantida nas fases exponencial e estacionária em *C. crescentus* CB15. Todavia, no trabalho desses autores eles avaliaram a atividade da proteína, enquanto no nosso trabalho avaliamos a transcrição do gene, por isso, os resultados podem apresentar diferenças, visto que pode existir regulação pós-transcricional para FeSOD.

Além disso, quando Schnell e Steinman realizaram seu trabalho eles não quantificaram a atividade da MnSOD codificada pelo gene *sodA*, pois essa proteína não estava identificada em *C. crescentus*. Com isso, a atividade total de SOD, que foi considerada como sendo a de FeSOD juntamente com a de Cu/ZnSOD, e atividade atribuída a FeSOD, podem também conter a possível atividade da MnSOD. Portanto, a ausência de indução de atividade na fase estacionária atribuída a FeSOD demonstrada por Schnell e Steinman (1995), pode ter sido consequência da ausência de indução de MnSOD, visto que *sodA* tem sua maior expressão na fase exponencial com progressiva redução de expressão na fase estacionária (ALVAREZ-MARTINEZ et al, 2006), diluindo assim, a indução de *sodB*. Em *Pseudomonas putida* e *E. coli*, FeSOD é constitutivamente sintetizada e presente em ambos os crescimentos aeróbio e anaeróbio (revisto por HASSAN; FRIDOVICH, 1977; KIM; MILLER; ANDERSON, 1999), contudo a expressão na fase estacionária não foi avaliada nestes trabalhos.

Também testamos peróxidos como possíveis agentes indutores da expressão de *sodB*. Por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase, foi possível observar que *sodB* de *C. crescentus* NA1000 não mostrou um aumento de expressão nos ensaios com H_2O_2 (Figura 38A). No entanto, no ensaio de qRT-PCR na presença de H_2O_2 ou tBOOH (Figura 38B e 38C) houve um pequeno aumento da expressão de *sodB*. De maneira geral, entende-se que o peróxido de hidrogênio não induziria a expressão do gene *sodB*, porque as superóxido dismutases são responsáveis pela retirada de superóxido da célula transformando-o em peróxido de hidrogênio que é retirado pelas enzimas catalases e alquil-hidroperóxido redutases (Fridovich, 1995). Entretanto, como discutido na seção 3.4, as superóxido dismutases poderiam ter sua expressão aumentada na presença de peróxidos para prevenir a formação do radical hidroxila por meio da reação de Haber-Weiss.

Além de testar a indução da expressão de *sodB* com agentes oxidativos, também foi feito ensaio de atividade da β -galactosidase com excesso e carência de ferro, pois nos trabalhos de Silva Neto (2011), FeSOD foi induzida em excesso de ferro (100 μ M $FeSO_4$), e positivamente regulada por Fur nos ensaios de *Northern blot*, qRT-PCR e atividade de SOD em gel. Em nosso trabalho utilizando o ensaio de atividade da β -galactosidase, observamos que não houve aumento da expressão de *sodB* em meio rico (Figura 39A) ou meio mínimo (Figura 39B), tanto na carência quanto no excesso de ferro. Embora os gráficos demonstrem uma tendência de aumento da expressão de *sodB* em algumas condições, no ensaio de atividade da β -galactosidase a diferença encontrada, aproximadamente 50 unidades Miller, é muito pequena para ser considerada um indício de indução. No ensaio de qRT-PCR, em meio mínimo, na presença de $FeSO_4$ ou DDPI, não houve aumento da expressão de *sodB* em ambas as condições (Figura 39C). Esses dados são corroborados pelo estudo de Silva Neto, Lourenço e Marques (2013) que demonstrou que em *C. crescentus* crescendo em meio rico, o gene *sodB* foi menos expresso no mutante Δfur e a regulação dependente de ferro não foi observada nos ensaios de microarranjos de DNA, demonstrando que *sodB*, diferentemente do observado em outras bactérias, não foi afetado pela limitação de ferro.

Segundo Massé e Gottesman (2002), em *E. coli*, *sodB* é positivamente regulado por Fur, por isso na carência de ferro a transcrição de *sodB* é diminuída, mas quando ferro está em excesso a transcrição de *sodB* aumenta. Em *C. crescentus* NA1000, Silva Neto e colaboradores (2009) estudaram os genes

regulados por Fur, mas não encontraram sítio de ligação para Fur na região promotora de *sodB*. Contudo, sabe-se que alguns dos genes regulados positivamente por Fur não possuem “Fur boxes”, sendo essa regulação positiva devido a um mecanismo molecular indireto de regulação (Vecerek et al., 2003). No entanto, ainda não foi possível definir um pequeno RNA em *C. crescentus*, com a mesma função do RNA RhyB de *E. coli*, para verificar se ele também está regulando *sodB*. Com isso, acreditamos que mais estudos serão necessários para definir o efeito do íon ferro sobre a expressão do gene *sodB* de *C. crescentus* NA1000 em meio mínimo e meio complexo.

Com o intuito de verificar se ocorre indução da expressão de *sodB* na presença de superóxido fizemos ensaios de atividade da β -galactosidase com a droga ciclo redox paraquat. Por meio desse ensaio não foi possível observar a indução da expressão do gene *sodB* (Figura 40A). Além disso, no ensaio de qRT-PCR com paraquat houve um pequeno aumento da expressão de *sodB*, na linhagem selvagem, quando exposta a 50 μ M de paraquat (Figura 40B). Esses resultados são corroborados pelo estudo de Carlizoz e Touati (1986), pois apesar de terem observado que em *E. coli* o mutante para FeSOD é mais sensível a paraquat que a cepa selvagem, a análise das proteínas FeSOD e MnSOD na cepa selvagem na presença de 5 μ M ou 50 μ M de paraquat, demonstrou que apenas a MnSOD foi induzida, enquanto que a atividade da FeSOD foi constante. Essas autoras também demonstraram que nos mutantes *sodA* e *sodB* de *E. coli* o padrão de indução na presença de paraquat, observado na linhagem selvagem, foi mantido nas duas linhagens mutantes, caracterizando a ausência de uma regulação compensatória entre as SODs citoplasmáticas, pois no mutante *sodA* na presença de paraquat não houve alteração na atividade da FeSOD, enquanto que no mutante *sodB* ocorreu indução de MnSOD na presença de paraquat.

Para verificar a expressão e a regulação do gene *sodB* em *C. crescentus* na presença de outros agentes oxidantes geradores de superóxido, foram feitos ensaios de qRT-PCR com a linhagem selvagem NA1000 e as linhagens mutantes Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$ de *C. crescentus*.

Na presença de 50 μ M de paraquat o gene *sodB* foi mais expresso na linhagem NA1000, enquanto nas linhagens Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$, e $\Delta sigJ$ foi menos expresso (Figura 41). Com isso, entende-se que os reguladores de transcrição Fur e OxyR, juntamente com os fatores sigma de função extracitoplasmática σ^F e σ^J podem

influenciar a transcrição de *sodB*. Contudo, a identificação de um possível regulador na presença de paraquat tornou-se menos confiável porque expressão relativa de *sodB* na linhagem NA1000 foi menor que 2 vezes.

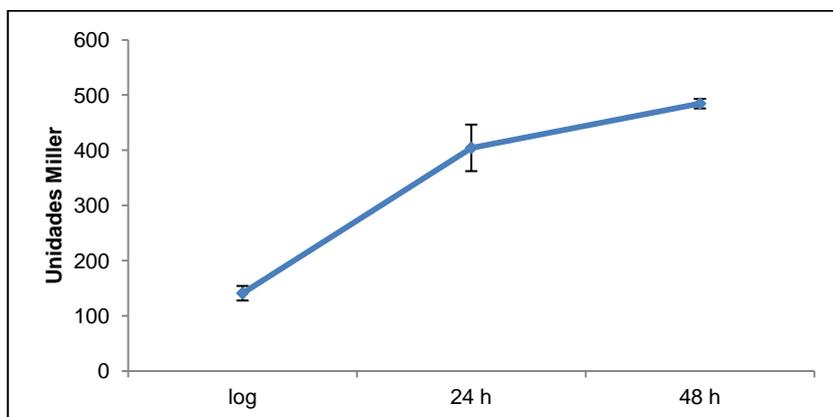
Quando as linhagens foram submetidas a 50 μM de menadiona o gene *sodB* teve sua expressão aumentada nas linhagens NA1000, Δfur e $\Delta sigF$, já nas linhagens $\Delta oxyR$ e $\Delta sigJ$ o gene *sodB* não teve alteração na expressão (Figura 42). Na linhagem Δfur o aumento da expressão foi menor que o observado na linhagem selvagem, por isso o regulador transcricional Fur ainda pode ter função regulatória sobre o gene *sodB*. No $\Delta sigF$, o resultado inicial indica que este fator sigma de função extracitoplasmática não influencia a regulação da transcrição de *sodB* pois a expressão foi semelhante à encontrada na linhagem selvagem NA1000, contudo novos ensaios serão necessários para definir a função de σ^F na regulação de *sodB*. O regulador de transcrição OxyR e o fator sigma de função extracitoplasmática σ^J , possivelmente estão envolvidos na regulação de *sodB*. Mas, nos ensaios com o $\Delta oxyR$ o desvio padrão está alto e por isso não podemos definir o padrão de expressão do gene *sodB* nesta linhagem mutante. Além disso, o aumento da expressão de *sodB* na presença de menadiona foi maior que o observado na presença de paraquat, demonstrando que a droga ciclo redox menadiona foi mais hábil para gerar superóxido no citoplasma de *C. crescentus*, isso pode ter ocorrido porque a vitamina K_3 poderia entrar na célula com mais facilidade que o paraquat, uma vez que é um composto que poderia ser utilizado no metabolismo celular.

Na presença de 25 μM ou 50 μM de pirogalol o gene *sodB* não apresentou alterações de expressão nas linhagens NA1000, Δfur , $\Delta oxyR$ e $\Delta sigF$. No entanto, na linhagem $\Delta sigJ$ o gene foi menos expresso (Figura 43). Consequentemente, os reguladores de transcrição OxyR e Fur, além do fator sigma de função extracitoplasmática σ^F não demonstraram função regulatória na transcrição de *sodB*. No entanto, o fator sigma de função extracitoplasmática σ^J , mais uma vez, pode estar envolvido na regulação de *sodB*, pois na presença de todos os geradores de superóxido utilizados nesse trabalho a expressão de *sodB* apresentada em NA1000 é diminuída no $\Delta sigJ$.

De maneira geral, o gene *sodB* foi principalmente regulado pelo fator sigma de função extracitoplasmática σ^J . Contudo, ainda é necessário determinar outros agentes, além da menadiona, que sejam capazes de induzirem a expressão de *sodB*. Além disso, um ensaio de qRT-PCR quantitativo, com análise da expressão

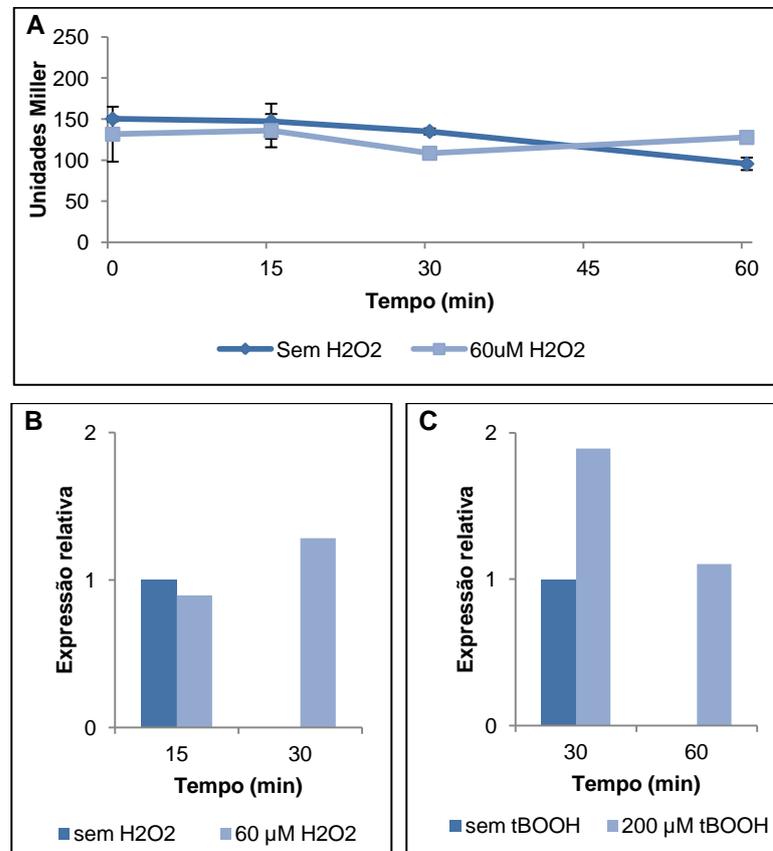
absoluta ao invés da expressão relativa, poderia demonstrar se os níveis constitutivos de *sodB* na linhagem selvagem são suficientes para retirada do superóxido testado e se os níveis constitutivos de *sodB* nas linhagens mutantes é diferente do apresentado na linhagem NA1000 de *C. crescentus*.

Figura 37 - Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de *sodB* na fusão de transcrição



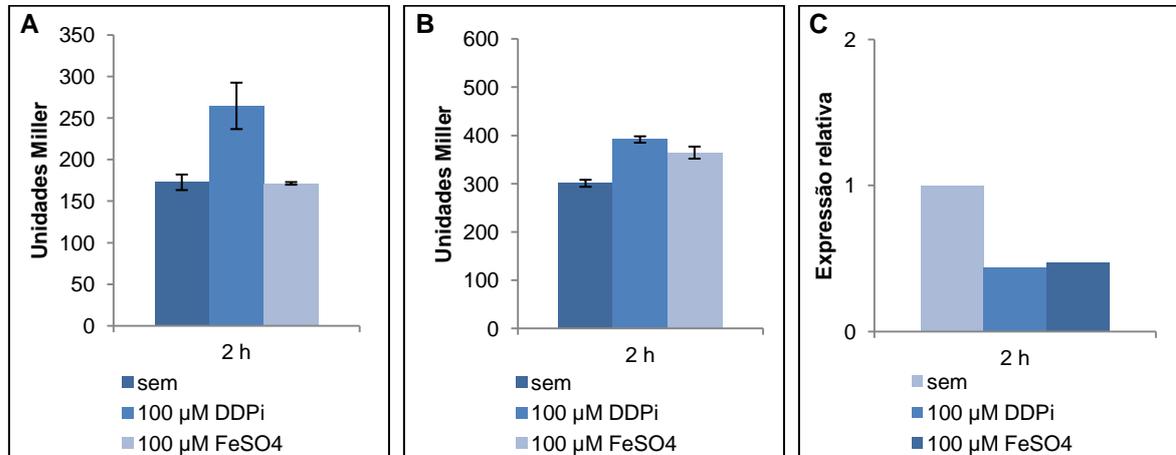
Análise de expressão por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de *sodB* na fusão de transcrição, quando a cultura estava em fase logarítmica ($DO_{600} \approx 0,5$) e estacionária (24 h e 48 h após a $DO_{600} = 0,1$). Os ensaios foram realizados em meio rico (PYE) com a linhagem selvagem *C. crescentus* NA1000. As médias representam dois ensaios independentes com triplicata técnica.

Figura 38 - Análise da expressão de *sodB* em resposta a peróxidos por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo



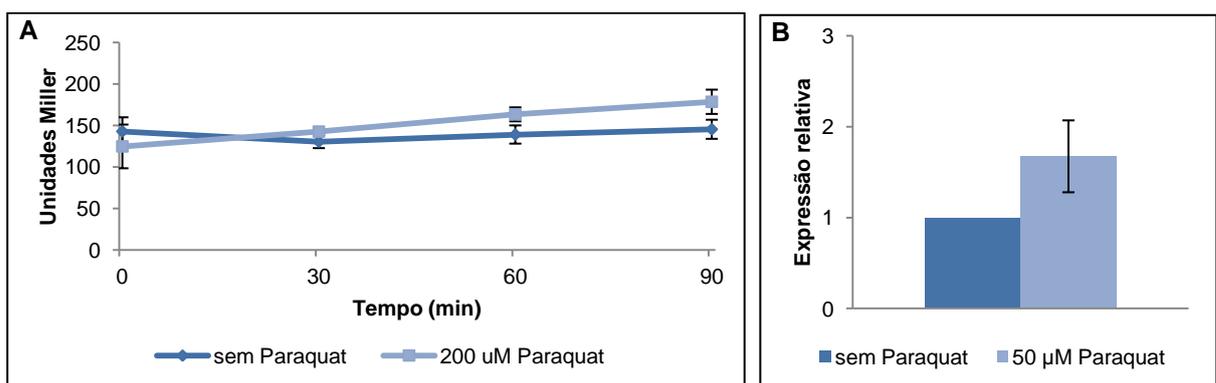
A. Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de *sodB* na fusão de transcrição, em meio complexo na presença ou ausência de H_2O_2 . **B.** Análise da expressão de *sodB*, por meio do ensaio de RT-PCR quantitativo, em resposta a 60 μM de peróxido de hidrogênio. **C.** Análise da expressão de *sodB* em resposta a 200 μM de tert-butil hidroperóxido por meio de RT-PCR quantitativo. Os ensaios de qRT-PCR foram realizados com culturas que cresceram em meio mínimo M2G. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando Rho como controle endógeno. Quando o desvio padrão não estiver indicado o valor apresentado refere-se a um ensaio. Ambos os ensaios de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo foram feitos com a linhagem NA1000 de *C. crescentus*.

Figura 39 - Análise da expressão de *sodB* em resposta a ferro por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo



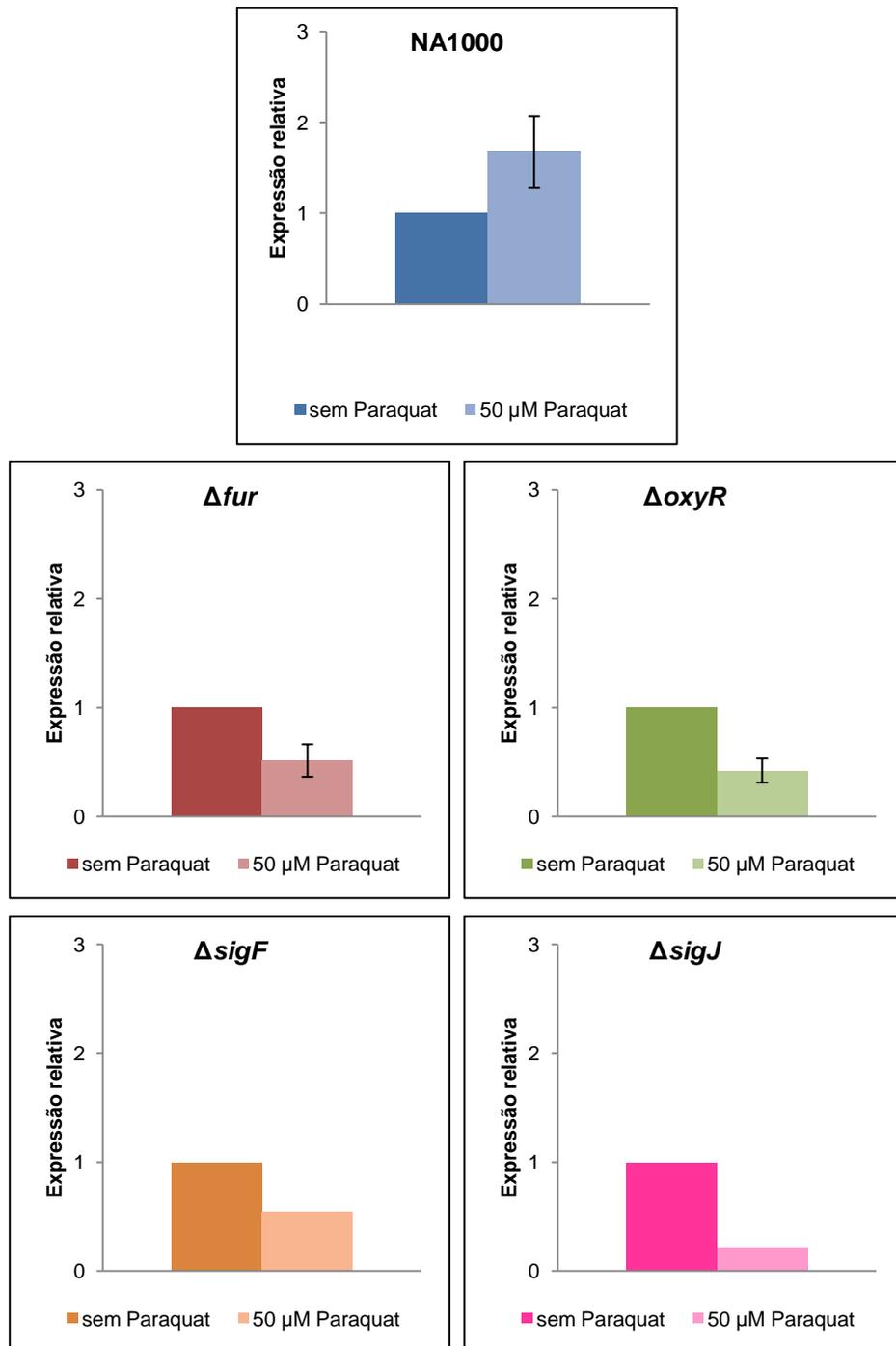
A. Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de *sodB* na fusão de transcrição, em meio rico PYE, com 100 μ M FeSO₄ ou 100 μ M DDPi ou sem agentes. **B.** Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de *sodB* no pRK/lacZ290 em meio mínimo M2G, com 100 μ M FeSO₄ ou 100 μ M DDPi ou sem agentes. **C.** Análise da expressão de *sodB* em resposta a ferro por meio de RT-PCR quantitativo, em meio mínimo M2G. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando Rho como controle endógeno. Quando o desvio padrão não estiver indicado o valor apresentado refere-se a um ensaio. Os três ensaios foram realizados com a linhagem *C. crescentus* NA1000 cultivada em suficiência de ferro (FeSO₄), limitação (DDPi) ou sem adição de compostos.

Figura 40 - Análise da expressão de *sodB* em resposta a paraquat por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo



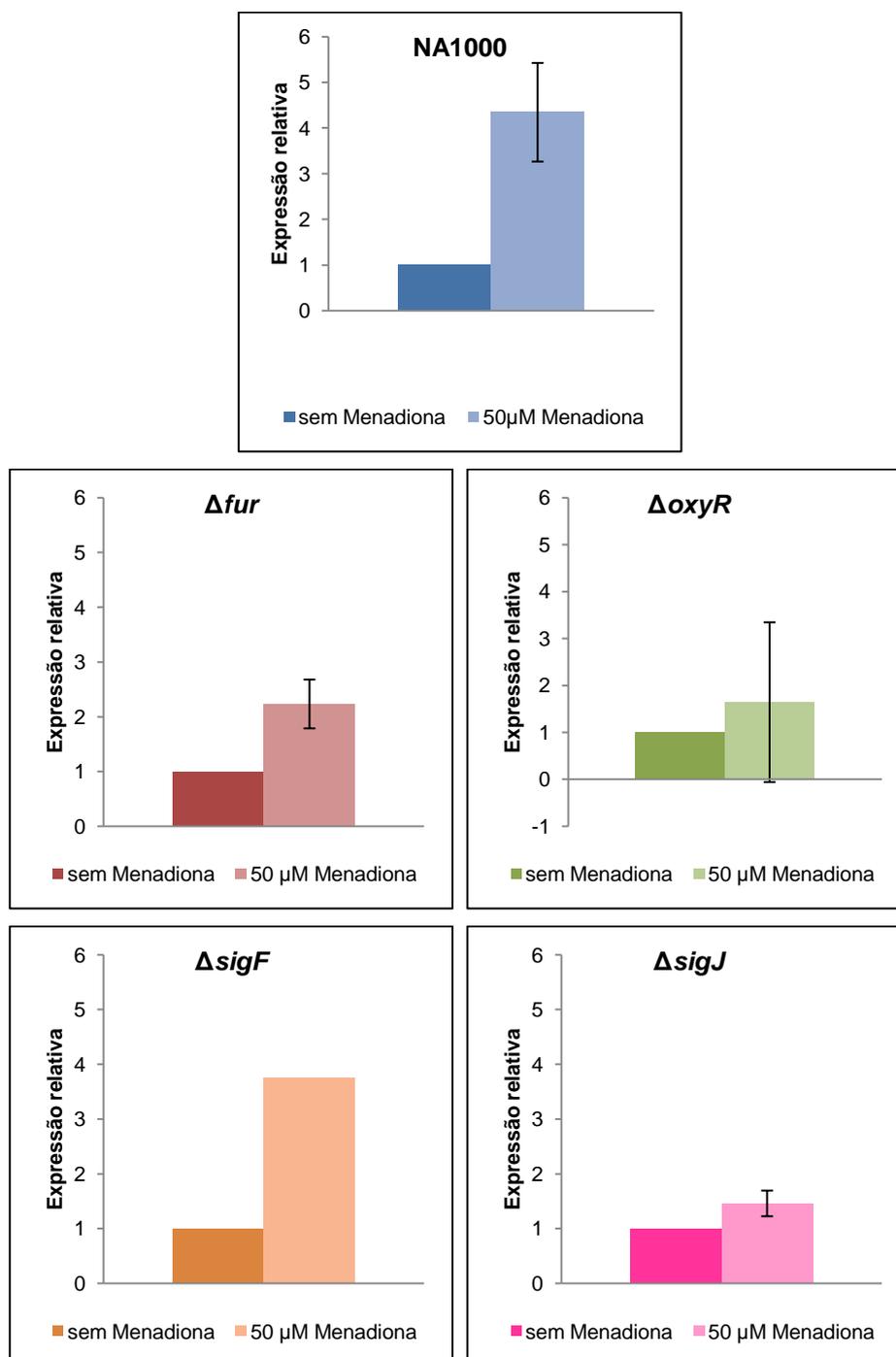
A. Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de *sodB* na fusão de transcrição, em meio rico, na presença ou ausência de paraquat. **B.** Análise da expressão de *sodB* em resposta a paraquat em meio mínimo M2, por meio de RT-PCR quantitativo. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando DnaQ como controle endógeno. Ambos os ensaios utilizaram a linhagem *C. crescentus* NA1000.

Figura 41 - Análise da expressão de *sodB* em resposta a paraquat por meio de RT-PCR quantitativo



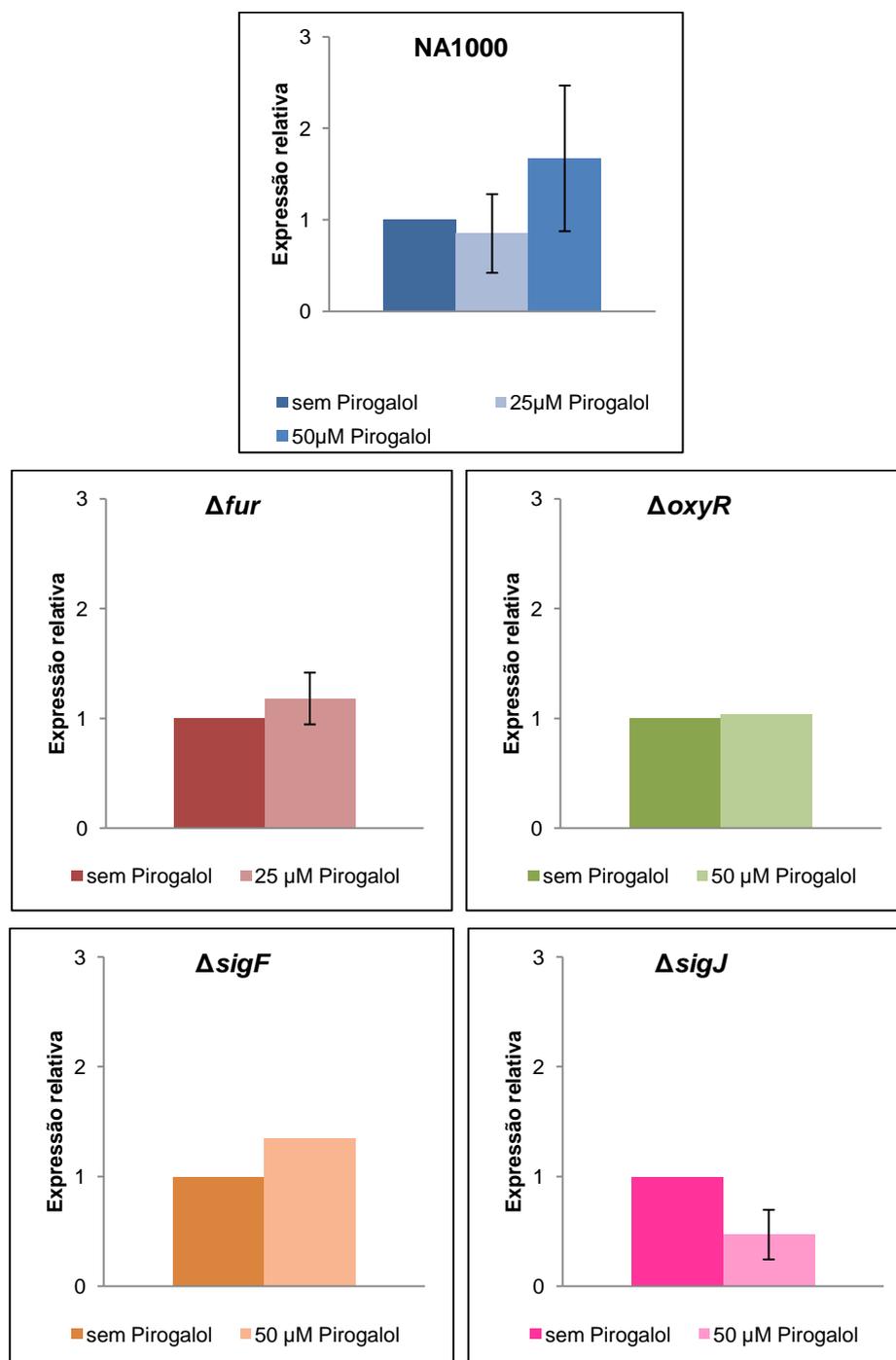
A expressão do gene *sodB* foi analisada por meio do ensaio de RT-PCR quantitativo. Os níveis do RNAm deste gene foram analisados nas linhagens selvagem (NA1000) e mutantes (Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$) de *C. crescentus* em resposta a 50 μ M de paraquat, quando cultivada em meio mínimo M2G. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando DnaQ como controle endógeno. Em cada ensaio a média e desvio padrão representam dois ensaios independentes, quando o desvio padrão não estiver indicado o valor apresentado refere-se a um ensaio.

Figura 42 - Análise da expressão de *sodB* em resposta a menadiona por meio de RT-PCR quantitativo



A expressão do gene *sodB* foi analisada por meio do ensaio de RT-PCR quantitativo. Os níveis do RNAm deste gene foram analisados nas linhagens selvagem (NA1000) e mutantes (Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$) de *C. crescentus* em resposta a 50 μM de menadiona, quando cultivada em meio mínimo M2G. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando DnaQ como controle endógeno. Em cada ensaio a média e desvio padrão representam dois ensaios independentes, quando o desvio padrão não estiver indicado o valor apresentado refere-se a um ensaio.

Figura 43 - Análise da expressão de *sodB* em resposta a pirogalol por meio de RT-PCR quantitativo



A expressão do gene *sodB* foi analisada por meio do ensaio de RT-PCR quantitativo. Os níveis do RNAm deste gene foram analisados nas linhagens selvagem (NA1000) e mutantes (Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$) de *C. crescentus* em resposta a 50 μM ou 25 μM de pirogalol, quando cultivada em meio mínimo M2G. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando DnaQ como controle endógeno. Em cada ensaio a média e desvio padrão representam dois ensaios independentes, quando o desvio padrão não estiver indicado o valor apresentado refere-se a um ensaio.

3.6 Análise da expressão de *sodC*

Utilizamos o ensaio de atividade da β -galactosidase para avaliar a expressão do gene *sodC* sob condições normais e de estresse oxidativo gerado pela adição de H_2O_2 ou paraquat nas culturas crescendo exponencialmente em meio PYE e M2G. Também realizamos ensaios de qRT-PCR em meio mínimo (M2G) acrescido dos seguintes agentes: paraquat, menadiona, pirogalol, H_2O_2 ou tBOOH (tert-butil hidroperóxido) nas culturas crescendo exponencialmente, para definir o padrão de expressão e a regulação do gene *sodC*.

Com o intuito de analisar os níveis de expressão do gene *sodC* nas fases exponencial e estacionária em meio rico, ensaios de atividade da β -galactosidase, foram realizados no meio da fase logarítmica e na fase estacionária (Figura 44). Nesse ensaio foi possível observar que ocorreu um aumento da expressão do gene *sodC*, que codifica a enzima CuZnSOD, na fase estacionária. No trabalho de Schnell e Steinman (1995) foi observado que na fase estacionária os níveis da proteína CuZnSOD de *C. crescentus* CB15 aumentam em 3,7 vezes, em meio PYE, corroborando a indução da expressão do gene encontrada nesta fase em nosso trabalho.

Utilizando o ensaio de atividade da β -galactosidase também testamos se havia indução da expressão de *sodC* na presença de H_2O_2 , mas não observamos alterações na expressão desse gene (Figura 45A). O mesmo ocorreu no ensaio de qRT-PCR com peróxidos, pois a expressão relativa do RNAm de *sodC* na presença de H_2O_2 ou tBOOH foi menor que 1,5 vezes (Figuras 45B e 45C). Esses resultados demonstram que o gene *sodC* possivelmente não é induzido pela presença de peróxidos. Usualmente, entende-se que os peróxidos não induziriam a expressão dos genes codificadores das enzimas superóxido dismutases, como descrito na seção 3.5. Consequentemente, a ausência de aumento da expressão de *sodC* na presença de peróxidos, possivelmente, é uma característica normal para esse gene.

A fim de avaliar a existência de indução da expressão de *sodC* por agentes geradores de superóxido ensaios de atividade da β -galactosidase foram realizados em meio rico na presença e ausência de paraquat. Por meio desse ensaio não foi possível observar a indução da expressão do gene *sodC* (Figura 46A). Igualmente, no ensaio de qRT-PCR com paraquat, também não observamos aumento da expressão de *sodC*, na linhagem selvagem, quando exposta a 50 μ M de paraquat

(Figura 46B), pois embora a média da expressão relativa esteja próxima a 2 vezes, a extensão do desvio padrão anulou o indício de indução. Esse padrão de expressão é esperado para *sodC*, visto que em *C. crescentus* CB15 não ocorreu indução de CuZnSOD na presença desse agente oxidante, enquanto que em *E. coli*, a indução desse gene ocorre apenas na fase estacionária e na presença de menadiona (IMLAY; IMLAY, 1996; KUMAR; GAUTAM; SHARMA, 2013; SCHNELL; STEINMAN, 1995).

Outros ensaios de qRT-PCR com a linhagem selvagem NA1000 e as linhagens mutantes Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$ de *C. crescentus*, na presença de agentes oxidantes geradores de superóxido, iniciaram a definição dos agentes indutores e dos possíveis reguladores do gene *sodC* em *C. crescentus*.

Quando as linhagens foram submetidas a 50 μ M de paraquat o gene *sodC* teve sua expressão aumentada na linhagem Δfur , enquanto que nas linhagens NA1000 e $\Delta sigF$ a expressão relativa foi menor que 2 vezes. Contudo, nas linhagens $\Delta oxyR$ e $\Delta sigJ$ o gene *sodC* foi menos expresso (Figura 47). Com isso, acreditamos que o fator sigma de função extracitoplasmática σ^F não está envolvido na regulação da expressão de *sodC*, porque os níveis de expressão para esse gene na linhagem selvagem NA1000 e na linhagem mutante $\Delta sigF$ foram semelhantes. Na linhagem mutante Δfur , os níveis de expressão de *sodC* foram aumentados, mas o desvio padrão também foi alto, por isso é possível que o regulador de transcrição Fur não tenha influência sobre a regulação de *sodC*, além disso, segundo o trabalho de Silva Neto et al. (2009) o gene *sodC* não pertence ao regulon de Fur. Assim, possivelmente o regulador transcricional OxyR e o fator sigma de função extracitoplasmática σ^J são os reguladores que podem estar envolvidos na regulação de *sodC*.

Na presença de 50 μ M de menadiona o gene *sodC* teve sua expressão aumentada nas linhagens NA1000, Δfur e $\Delta sigF$, já na linhagem $\Delta oxyR$ a expressão relativa de 0,7 vezes, juntamente com desvio padrão, dão o indício de que não houve alteração da expressão, enquanto que na linhagem $\Delta sigJ$ o gene *sodC* foi menos expresso (Figura 48). Assim, entende-se que o fator sigma de função extracitoplasmática σ^F não influenciou a regulação da transcrição de *sodC*, visto que a expressão foi semelhante à encontrada na linhagem selvagem NA1000, corroborando o resultado observado no ensaio com paraquat. No Δfur o aumento da expressão de *sodC* foi maior que o observado na linhagem selvagem, isto pode ter

ocorrido porque, como descrito na seção anterior, a ausência do controle da concentração de ferro no citoplasma pode aumentar a quantidade de espécies reativas de oxigênio formadas, ou quantidades menores de agentes oxidantes neste mutante podem gerar um estresse oxidativo maior, e por isso são necessárias proteínas antioxidantes acima da quantidade constitutivamente expressa. Além disso, a possível regulação de *sodC* pelo fator sigma de função extracitoplasmática σ^J foi corroborada. Novamente, como observado na análise da expressão de *sodB*, o aumento da expressão de *sodC* na presença de menadiona, mas não na presença de paraquat, demonstrou que a droga ciclo redox menadiona pode ser mais hábil para gerar superóxido no citoplasma de *C. crescentus*. Em *E. coli*, também foi demonstrado que o gene *sodC* tem sua expressão aumentada na presença de menadiona, por meio de um ensaio de microarranjos de DNA (KUMAR; GAUTAM; SHARMA, 2013).

Quando as linhagens foram submetidas a 25 μ M ou 50 μ M de pirogalol o gene *sodC* teve sua expressão aumentada nas linhagens Δfur e $\Delta sigF$, já nas linhagens NA1000 e $\Delta oxyR$, não houve alteração da expressão, enquanto que na linhagem $\Delta sigJ$ o gene *sodC* foi menos expresso (Figura 49). Assim, o regulador de transcrição OxyR não atua na regulação de *sodC*, visto que sua expressão foi semelhante à encontrada na linhagem selvagem. Enquanto que o fator sigma de função extracitoplasmática σ^J possivelmente é responsável por sua regulação posto que, novamente, *sodC* teve sua expressão menor neste mutante. Na presença de 25 μ M de pirogalol a expressão do gene *sodC* ficou inalterada na linhagem NA1000 e aumentou na linhagem Δfur . O mesmo ocorreu quando analisamos a expressão de *sodA* no Δfur , corroborando a hipótese de que na linhagem selvagem a quantidade de enzimas antioxidantes já existentes são capazes de retirar o superóxido gerado por 25 μ M de pirogalol, enquanto que no mutante Δfur , que é mais sensível a estresse oxidativo, essa concentração provavelmente foi capaz de gerar superóxido em níveis superiores ao geralmente retirado pelas enzimas antioxidantes, necessitando então, diferentemente do ocorrido na linhagem selvagem, aumentar a expressão de *sodC*.

No trabalho de Schnell e Steinman (1995), o mutante nulo para *sodC* de *C. crescentus* CB15 foi submetido a testes com pirogalol em meio complexo. Nessas condições foram feitos ensaios de sobrevivência, onde o mutante SodC⁻ foi 2 vezes mais sensível em fase exponencial e 20 vezes mais sensível em início de fase

estacionária do que a cepa selvagem. Além disso, Steinman (1993) demonstrou que o mutante de CuZnSOD de *C. crescentus* CB15 não apresenta resposta diferente com relação à linhagem selvagem CB15 quando exposta a paraquat. Esses autores justificaram esse fenótipo com os dados de Hassan e Fridovich (1979) porque eles concluíram que paraquat forma superóxido apenas no citoplasma e superóxido não atravessa a membrana de gram-negativas.

No entanto, nosso trabalho demonstrou que a ativação da transcrição do gene *sodC* ocorre na presença de superóxido no citoplasma quando a célula é exposta a menadiona, contudo essa indução não ocorreu na presença de paraquat ou pirogalol. Essa diferença de indutores entre os três trabalhos pode ser devido ao meio utilizado: nos trabalhos de Schnell e Steinman (1995) e Steinman (1993) os agentes oxidantes, paraquat ou pirogaol, foram adicionados às culturas que cresciam em meio complexo PYE, enquanto que no nosso trabalho nós utilizamos o meio mínimo M2G.

Quando analisamos a mudança no pH do meio durante o crescimento de *C. crescentus* NA1000 em meio mínimo e meio rico, encontramos que durante o crescimento em M2G o meio torna-se acidificado, com pH inicial 7 e após 8 h de crescimento o pH estava próximo a 6 (Figura 50A). Esta acidificação do meio ocorreu principalmente durante a fase exponencial do crescimento e manteve-se inalterado após a fase estacionária. No meio rico PYE, o pH inicial também foi 7, mas ao longo do crescimento foi ocorrendo a alcalinização do meio que chegou a 8,5 após 12 h de crescimento (Figura 50B). Os ensaios de expressão apresentados neste trabalho foram geralmente realizados no meio da fase logarítmica, durante este período em meio mínimo o pH observado foi de 6,8, enquanto no meio rico foi 7,8.

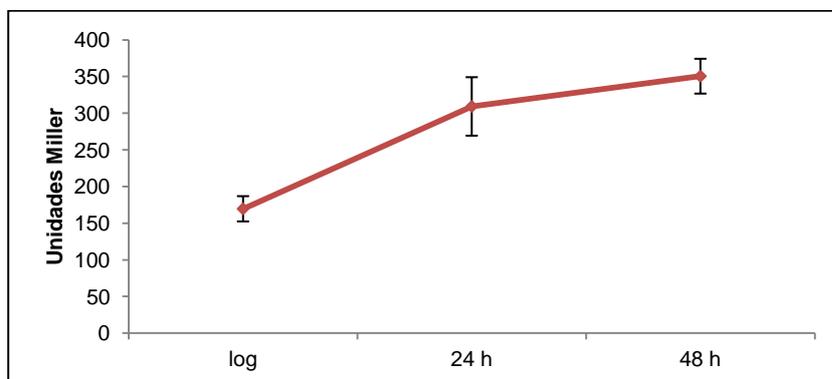
Com isso, durante os ensaios com M2G o pH da cultura não anulou o efeito do pirogalol, que é inativado em pH 8,2 (Schnell e Steinman 1995). Além disso, a concentração do agente oxidante utilizada foi diferente, enquanto em nosso trabalho utilizamos 50 μ M de paraquat, menadiona e pirogalol, nos trabalhos citados foram utilizados 200 μ M ou 500 μ M de paraquat e 1 mM ou 2 mM de pirogalol. Em nosso estudo essas concentrações utilizadas nos trabalhos anteriores não foram utilizadas porque causavam a morte das culturas que cresciam em M2G inviabilizando a execução dos experimentos (Figuras 8, 9 e 13).

Na presença de FeSO_4 e DDPI o ensaio de qRT-PCR indicou que provavelmente esses agentes não interferem na indução de *sodC* pois na presença de FeSO_4 (0,77 vezes) ou DDPI (1,49 vezes) os níveis de RNAm estão muito próximos aos dos encontrados quando não há estresse na célula (dados não apresentados).

Dessa forma, o gene *sodC* foi aparentemente regulado pelo fator sigma de função extracitoplasmática σ^J , corroborando a hipótese de que esse sigma tem papel importante no estresse oxidativo. Contudo, ainda é necessário determinar outros agentes, além da menadiona, que sejam capazes de induzir a expressão de *sodC*. Demonstramos, também, que *sodC* é induzido na presença de superóxido no citoplasma, mas ainda não foi possível determinar se *sodC* é regulado pelo mesmo fator na presença de superóxido apenas no periplasma.

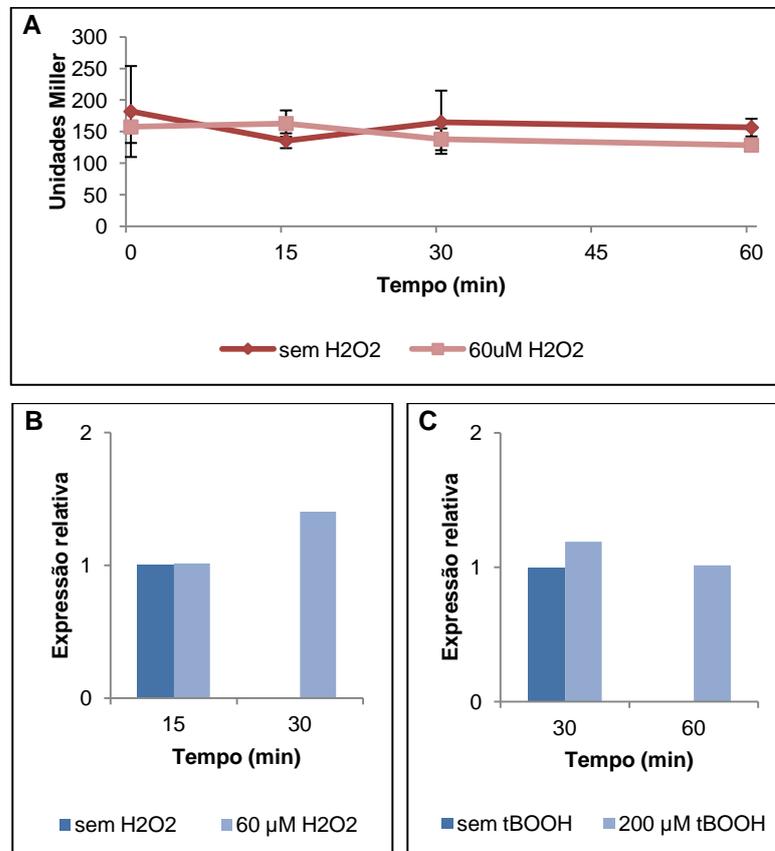
Em *E. coli*, o gene *sodC* é induzido pelo fator sigma RpoS em fase estacionária e pela fumarato nitrato redutase (Fnr) em condição anaeróbica (GORT; FERBER; IMLAY, 1999). No entanto, em α -proteobactérias não foi encontrado um gene homólogo ao *rpoS* (revisto por ALVAREZ-MARTINEZ; BALDINI; GOMES, 2006), e por isso não foi possível encontrar o mesmo regulador para *sodC* em *E. coli* (γ -proteobactéria) e em *Caulobacter crescentus* (α -proteobactéria). Contudo, no grupo das α -proteobactérias foram encontrados 55 ECFs exclusivos, denominados ECF15-EsfG-like, que são fortemente sugeridos como os reguladores de resposta a estresse geral (STARÓN et al., 2009). Dentre estes ECFs encontra-se o fator sigma T de *C. crescentus* envolvido na resposta a vários estresses e por isso foi considerado um sigma de resposta a estresse geral, contudo os genes regulados por este sigma já foram estudados (ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2007; LOURENÇO; KOHLER; GOMES, 2011), mas os genes do presente trabalho não foram encontrados como regulados por σ^T . Com isso, outros ECF15-EsfG-like, como o fator sigma J de *C. crescentus*, que durante os nossos ensaios de qRT-PCR demonstrou-se envolvido na regulação dos genes *sodA* e *sodC*, que codificam proteínas envolvidas na resposta a estresse oxidativos, pode ser outro sigma de resposta a estresse oxidativo nesta bactéria.

Figura 44 - Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de *sodC* na fusão de transcrição



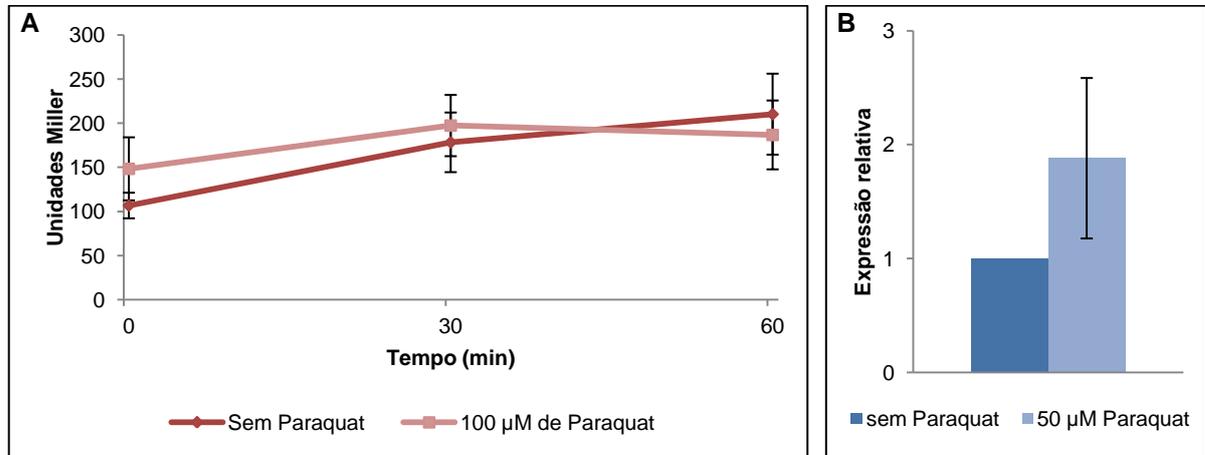
Análise de expressão por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de *sodC* na fusão de transcrição, quando a cultura estava em fase logarítmica ($DO_{600} \approx 0,5$) e estacionária (24 h e 48 h após a $DO_{600} = 0,1$). Os ensaios foram realizados em meio rico (PYE) com a linhagem selvagem *C. crescentus* NA1000. As médias representam dois ensaios independentes com triplicata técnica.

Figura 45 - Análise da expressão de *sodC* em resposta a peróxidos por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo



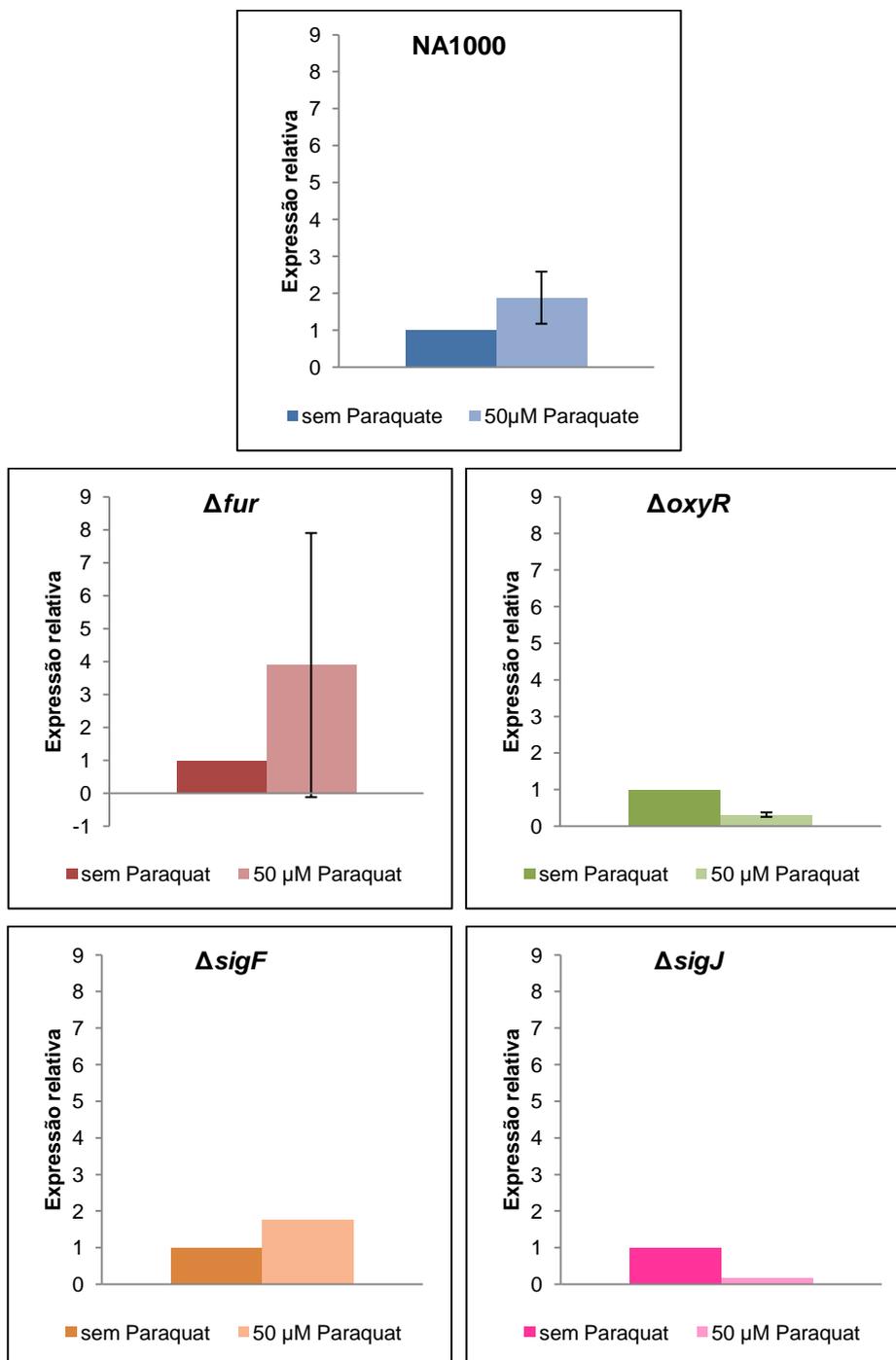
A. Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de *sodC* na fusão de transcrição em meio complexo na presença ou ausência de H₂O₂. **B.** Análise da expressão de *sodC* em resposta a 60 μ M de peróxido de hidrogênio por meio de RT-PCR quantitativo. **C.** Análise da expressão de *sodC* em resposta a 200 μ M de tert-butil hidroperóxido por meio de RT-PCR quantitativo. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando Rho como controle endógeno. Quando o desvio padrão não estiver indicado o valor apresentado refere-se a um ensaio. Ambos os três ensaios foram realizados com a linhagem NA1000 de *C. crescentus*.

Figura 46 - Análise da expressão de *sodC* em resposta a paraquat por meio do ensaio de atividade da β -galactosidase e RT-PCR quantitativo



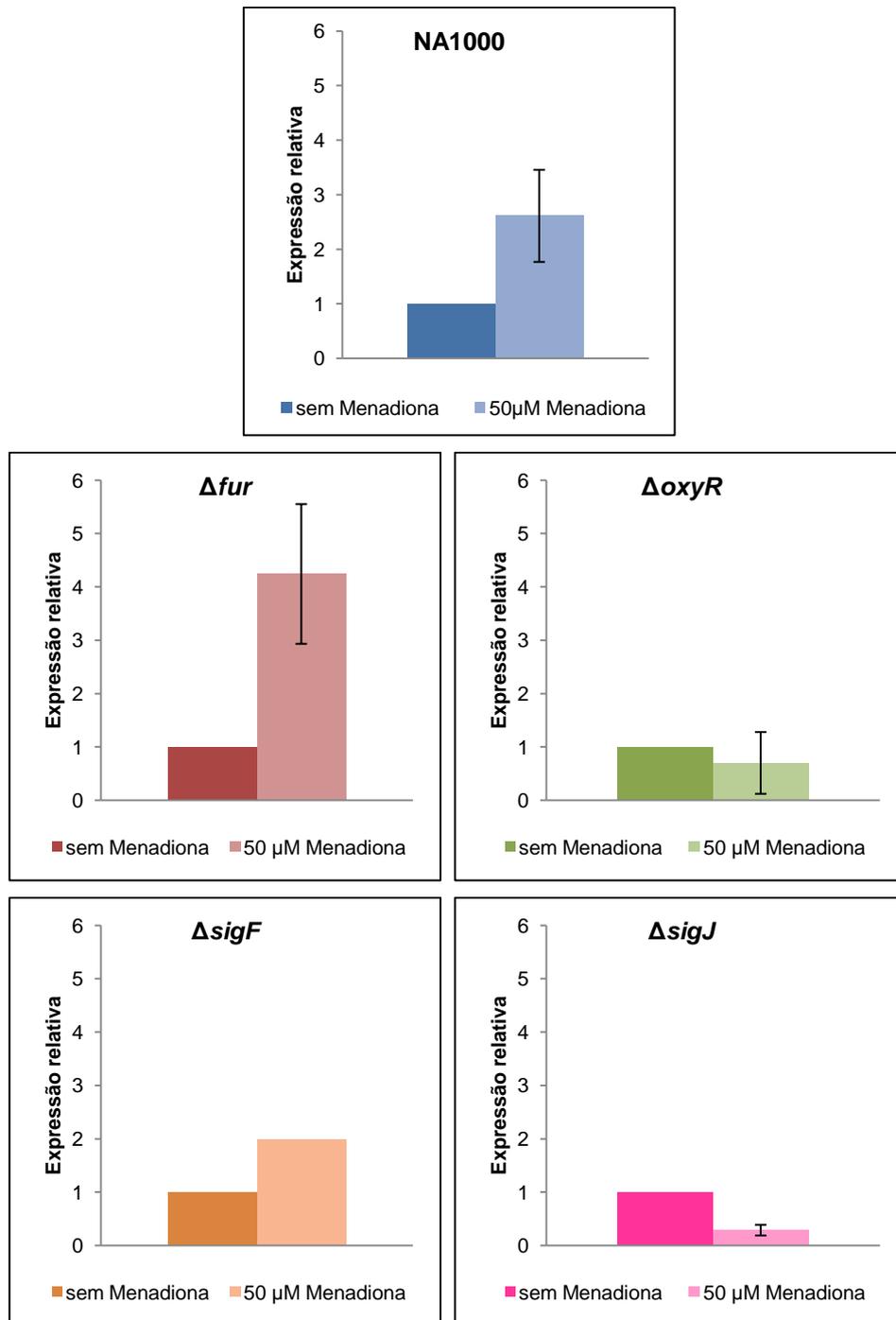
A. Ensaio de atividade da β -galactosidase com o promotor de *sodC* no pRK/*lacZ*290, em meio rico na presença ou ausência de paraquat. **B.** Análise da expressão de *sodC* em resposta a paraquat, em meio mínimo M2, por meio de RT-PCR quantitativo. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando DnaQ como controle endógeno. Em ambos os ensaios foi utilizada a linhagem *C. crescentus* NA1000.

Figura 47 - Análise da expressão de *sodC* em resposta a paraquat por meio de RT-PCR quantitativo



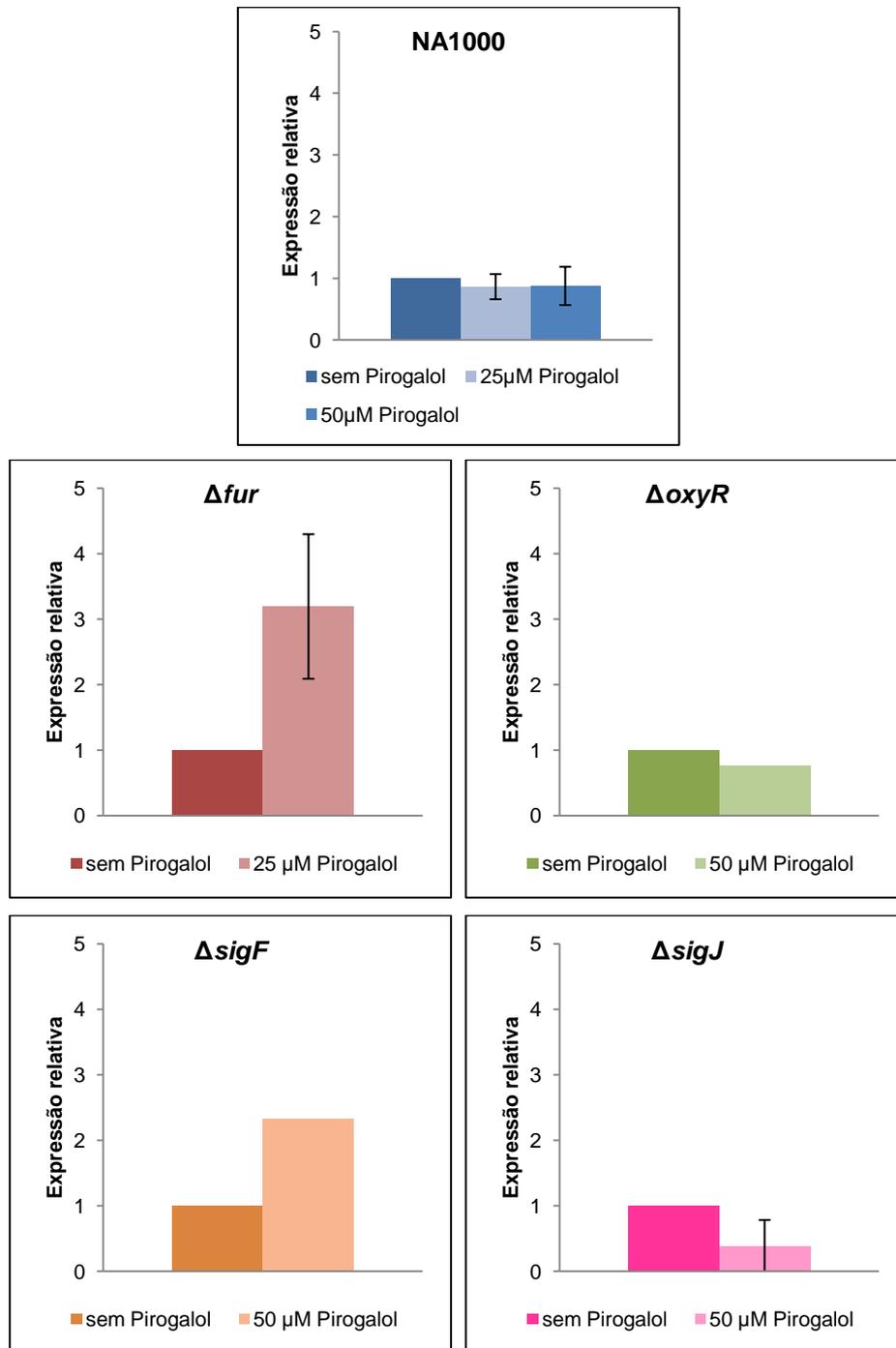
A expressão do gene *sodC* foi analisada por meio do ensaio de RT-PCR quantitativo. Os níveis do RNAm deste gene foram analisados nas linhagens selvagem (NA1000) e mutantes (Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$) de *C. crescentus* em resposta a 50 μM de paraquat, quando cultivada em meio mínimo M2G. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando DnaQ como controle endógeno. Em cada ensaio a média e desvio padrão representam dois ensaios independentes, quando o desvio padrão não estiver indicado o valor apresentado refere-se a um ensaio.

Figura 48 - Análise da expressão de *sodC* em resposta a menadiona por meio de RT-PCR quantitativo



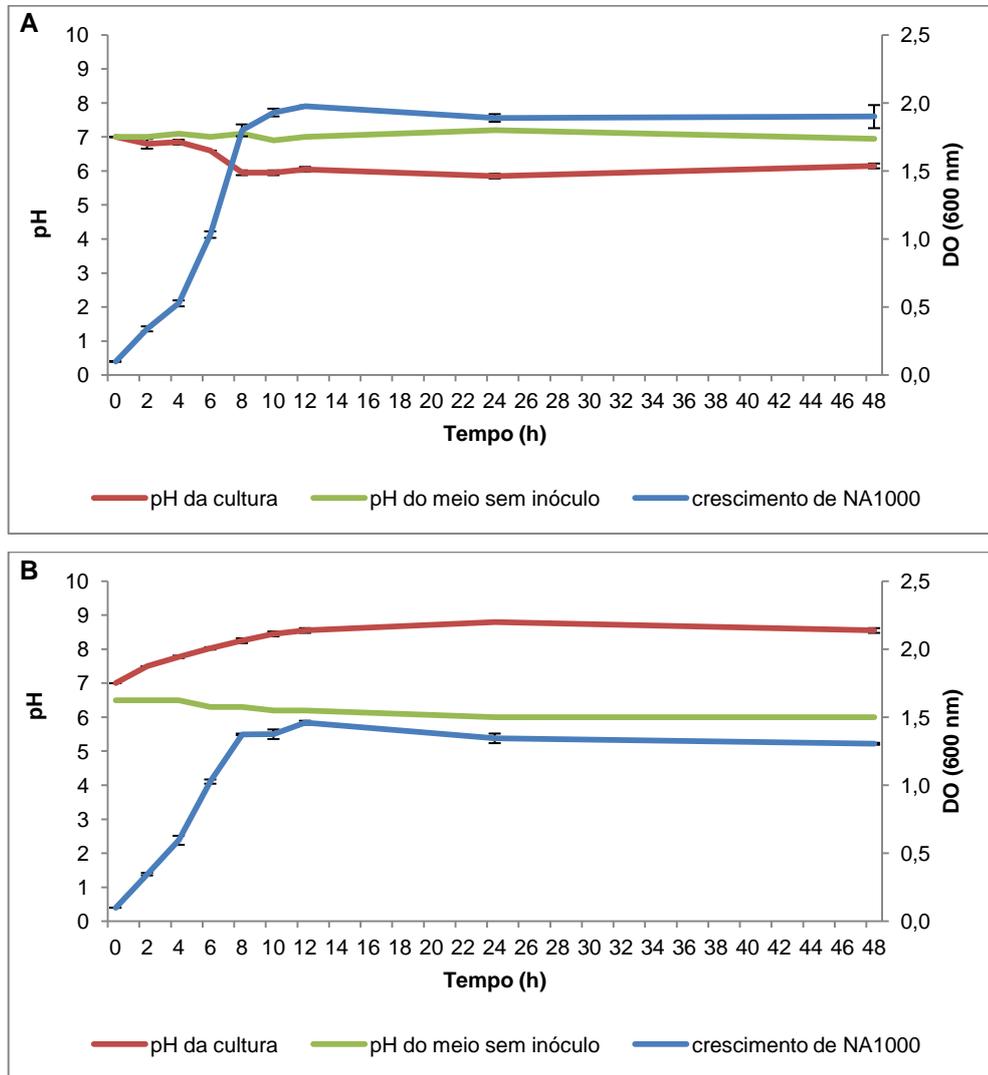
A expressão do gene *sodC* foi analisada por meio do ensaio de RT-PCR quantitativo. Os níveis do RNAm deste gene foram analisados nas linhagens selvagem (NA1000) e mutantes (Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$) de *C. crescentus* em resposta a 50 μ M de menadiona, quando cultivada em meio mínimo M2G. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ utilizando DnaQ como controle endógeno. Em cada ensaio a média e desvio padrão representam dois ensaios independentes, quando o desvio padrão não estiver indicado o valor apresentado refere-se a um ensaio.

Figura 49 - Análise da expressão de *sodC* em resposta a pirogalol por meio de RT-PCR quantitativo



A expressão do gene *sodC* foi analisada por meio do ensaio de RT-PCR quantitativo. Os níveis do RNAm deste gene foram analisados nas linhagens selvagem (NA1000) e mutantes (Δfur , $\Delta oxyR$, $\Delta sigF$ e $\Delta sigJ$) de *C. crescentus* em resposta a 50 µM ou 25 µM de pirogalol, quando cultivada em meio mínimo M2G. Os níveis de expressão relativa foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ utilizando DnaQ como controle endógeno. Em cada ensaio a média e desvio padrão representam dois ensaios independentes, quando o desvio padrão não estiver indicado o valor apresentado refere-se a um ensaio.

Figura 50 - Análise da alteração do pH em culturas de *C. crescentus* NA1000 crescendo em meio mínimo ou meio complexo



A. Alterações do pH durante o crescimento da cultura em meio mínimo M2G. **B.** Mudanças no pH do meio quando a cultura cresce em meio complexo PYE. Ambos os ensaios foram realizados com a linhagem selvagem *C. crescentus* NA1000. As médias representam os resultados de duas réplicas biológicas.

3.7 Análise geral da expressão e regulação dos genes de resposta a estresse oxidativo

Ao longo deste trabalho, definimos alguns agentes indutores e possíveis reguladores para quatro genes envolvidos na resposta a estresse oxidativo de *C. crescentus* NA1000. Estes resultados foram obtidos por meio do ensaio de qRT-PCR com culturas que cresceram em meio mínimo (Tabela 7). Para formação desta tabela consideramos que houve aumento da expressão quando o gene apresentou a expressão relativa entre 2 e 3 vezes ($2 \geq x \leq 3$). Quando a expressão relativa ficou acima de 3 vezes ($x > 3$), consideramos que houve um grande aumento da expressão do gene. Se a expressão do gene ficou entre 0,51 e 1,99 vezes ($0,5 > x < 2$) consideramos que não houve alteração na expressão do gene, e o gene foi menos expresso quando a expressão relativa foi menor ou igual a 0,5 vezes ($x \leq 0,5$).

Na linhagem selvagem foi possível observar que os quatro genes estudados no presente trabalho tiveram suas expressões alteradas na presença de diversos agentes oxidantes. Na presença de paraquat os genes *ahpC* e *sodA* tiveram as expressões relativas bastante aumentadas, demonstrando que na linhagem selvagem as proteínas de resposta a estresse oxidativo são utilizadas conjuntamente na retirada de superóxido, que é convertido a peróxido de hidrogênio, do citoplasma celular. A droga ciclo redox menadiona foi o agente oxidante que aumentou a expressão dos quatro genes estudados neste trabalho, enquanto o pirogalol influenciou a expressão apenas do gene *sodA*. Portanto, a utilização de várias drogas geradoras da mesma espécie reativa de oxigênio, o ânion superóxido, permitiu a observação de diferentes padrões de resposta a estresse, demonstrando que para cada alteração encontrada no meio *Caulobacter* pode adaptar-se utilizando proteínas diferentes que provavelmente estão sobre o controle de reguladores distintos.

Na linhagem selvagem, também observamos que os genes *ahpC* e *sodA* tiveram as expressões relativas aumentadas na presença de peróxido de hidrogênio, mas o mesmo não ocorreu na presença de peróxido orgânico, pois nenhum dos genes estudados por ensaios de qRT-PCR, tiveram a expressão alterada na presença deste agente oxidante, entretanto, a indução de *ahpC* por tBOOH foi observada em ensaios de β -galactosidase em meio complexo PYE. Em condições

de crescimento com excesso de ferro devido à complementação com FeSO_4 , os genes *sodA* e *sodB* foram menos expressos, enquanto em condições de crescimento com carência de ferro, devido à presença do quelante DDPi, *sodA* foi mais expresso e *sodB* foi menos expresso.

A linhagem mutante Δfur demonstrou-se bastante sensível aos diversos agentes estressores utilizados, pois em várias condições os genes de resposta a estresse oxidativo foram observados com a expressão relativa aumentada. Diferentemente do observado na linhagem selvagem, nesta linhagem mutante o gene *ahpC* foi mais expresso na presença de pirogalol e o gene *sodA* foi diferencialmente expresso na presença de paraquat e pirogalol. Em trabalhos anteriores foi demonstrado que o regulador transcricional Fur é responsável pela regulação dos genes *sodA* e *sodB* em *E. coli*, e do gene *sodB* em *C. crescentus* (CONPAN; TOUATI, 1993; MASSÉ; VANDERPOOL; GOTTESMAN, 2005; SILVA NETO; LOURENÇO; MARQUES, 2013). Adicionalmente, em nosso estudo o gene *sodA* de *C. crescentus* também pode ser regulado por Fur.

Nos ensaios com a linhagem mutante $\Delta oxyR$, o gene *ahpC* foi o gene com o padrão de expressão mais alterado com relação ao observado na linhagem selvagem. Na presença de todas as drogas geradoras do ânion superóxido, a expressão do gene *ahpC* foi diminuída na linhagem mutante, confirmando a regulação pelo regulador de transcrição OxyR que foi observada nos ensaios de atividade da β -galactosidase. Nesta linhagem mutante os genes *sodB* e *sodC* também foram menos expressos na presença de paraquat e menadiona, quando comparamos com a expressão observada na linhagem selvagem. Demonstrando que em *C. crescentus*, o regulador OxyR também pode estar envolvido na regulação das enzimas superóxido dismutases da família Fe-Mn, embora em *E. coli* este regulador não seja responsável pela regulação desses genes (revisito por DUBBS; MONGKOLSUK, 2007).

Na linhagem $\Delta sigF$, o gene *sodA* foi o gene mais afetado pela ausência do fator sigma F, pois nas três condições estudadas este gene foi menos expresso na linhagem mutante com relação à linhagem selvagem. Estes dados corroboram os resultados encontrados por Alvarez-Martinez, Baldini e Gomes (2006) e aumentam as condições nas quais o ECF σ^F atua como regulador. Os genes *ahpC* na presença de paraquat e *sodC* na presença de pirogalol também foram diferencialmente

expressos nesta linhagem mutante, mas novos ensaios serão necessários para definirmos se existe regulação por σ^F para esses genes.

Nos ensaios com a linhagem mutante ΔsigJ , os genes *sodA*, *sodB* e *sodC*, codificantes das enzimas superóxido dismutases, foram diferencialmente expressos em comparação com a linhagem selvagem, demonstrando que o fator sigma J está envolvido na resposta a estresse oxidativo, como esta linhagem ainda não foi caracterizada, nossos dados iniciais podem auxiliar a definição da função regulatória deste sigma ECF.

Tabela 7 - Quadro resumo com os dados obtidos nos ensaios de RT-PCR quantitativo nas linhagens de *C. crescentus* em meio mínimo

Gene	Agente oxidante	Concentração	Tempo	NA1000	Δfur	$\Delta oxyR$	$\Delta sigF$	$\Delta sigJ$
<i>ahpC</i>	Paraquat	50 μ M	1 h	++	++	-	0	0
	Menadiona	50 μ M		++	++	-	++	++
	Pirogalol	25 μ M		0	++			
		50 μ M		0			-	0
	H_2O_2	60 μ M	15 min	+				
			30 min	++				
	tBOOH	200 μ M	30 min	0				
			1 h	0				
	FeSO ₄	100 μ M	2 h	0				
	DDPi	100 μ M		0				
<i>sodA</i>	Paraquat	50 μ M	1 h	++	0	++	-	-
	Menadiona	50 μ M		++	+	++	0	-
	Pirogalol	25 μ M		0	+			
		50 μ M		++			++	0
	H_2O_2	60 μ M	15 min	+				
			30 min	+				
	tBOOH	200 μ M	30 min	0				
			1 h	0				
	FeSO ₄	100 μ M	2 h	-				
	DDPi	100 μ M		++				
<i>sodB</i>	Paraquat	50 μ M	1 h	0	0	-	0	-
	Menadiona	50 μ M		++	+	?	++	0
	Pirogalol	25 μ M		0	0			
		50 μ M		0			0	0
	H_2O_2	60 μ M	15 min	0				
			30 min	0				
	tBOOH	200 μ M	30 min	0				
			1 h	0				
	FeSO ₄	100 μ M	2 h	-				
	DDPi	100 μ M		-				
<i>sodC</i>	Paraquat	50 μ M	1 h	0	?	-	0	-
	Menadiona	50 μ M		+	++	0	+	-
	Pirogalol	25 μ M		0	++			
		50 μ M		0			0	+
	H_2O_2	60 μ M	15 min	0				
			30 min	0				
	tBOOH	200 μ M	30 min	0				
			1 h	0				
	FeSO ₄	100 μ M	2 h	0				
	DDPi	100 μ M		0				

Nota: Significado dos símbolos utilizados:

- (sinal negativo): quando o gene teve a expressão relativa menor ou igual a 0,5 vezes ($x \leq 0,5$), porque consideramos que ele foi menos expresso.

0 (zero): quando o gene demonstrou a expressão relativa entre 0,51 e 1,99 vezes ($0,5 > x < 2$), porque consideramos que não houve alteração na expressão do gene.

+ (sinal positivo): utilizado quando o gene apresentou a expressão relativa entre 2 e 3 vezes ($2 \geq x \leq 3$), porque consideramos que a expressão foi maior.

++ (dois sinais positivos) quando o gene teve a expressão relativa superior a 3 vezes ($x > 3$), porque consideramos que a expressão foi muito maior.

? (ponto de interrogação): o desvio padrão está alto, impedindo uma conclusão do padrão de expressão.

4 CONCLUSÕES

Em *C. crescentus*, o gene *ahpC* (AhpC) é induzido por peróxidos em meio rico, e em meio mínimo, *ahpC* foi induzido na presença de peróxido de hidrogênio, paraquat e menadiona. Além disso, definimos que *ahpC* é regulador por OxyR, no entanto, pode ser regulado também pelos fatores sigma de função extracitoplasmática σ^F e σ^J de maneira ainda desconhecida.

O gene *sodA* (MnSOD) foi induzido em meio mínimo na presença de paraquat, menadiona, pirogalol e peróxido de hidrogênio. Este gene também foi induzido na presença de DDPi e reprimido na presença de FeSO_4 . Quanto à regulação, na presença de superóxido o gene *sodA* foi regulado pelos fatores sigma de função extracitoplasmática σ^F e σ^J .

Foi possível determinar que *sodB* (FeSOD) possui indução na fase estacionária em meio complexo, e em meio mínimo foi mais expresso na presença de menadiona, mas tanto na carência quanto em excesso de ferro, *sodB* foi reprimido. Este gene possivelmente é regulado pelo fator sigma de função extracitoplasmática σ^J .

Quanto ao gene *sodC* (CuZnSOD), definimos que é induzido em meio mínimo por menadiona e possivelmente é regulado pelo fator sigma de função extracitoplasmática σ^J nessa condição.

REFERÊNCIAS¹

- 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 σ^T is involved in osmotic and oxidative stress responses in *Caulobacter crescentus*. **Molecular Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 1240-1255, 2007.
- ANDERSON, D. K.; OHTA, N.; WU, J.; NEWTON, A. Regulation of the *Caulobacter crescentus* rpoN gene and function of the purified σ_{54} in flagellar gene transcription. **Molecular and General Genetics MGG**, v. 246, n. 6, p. 697-706, 1995.
- ANDREWS, S. C.; ROBINSON, A. K.; RODRÍGUEZ-QUIÑONES, F. Bacterial iron homeostasis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 27, n. 2-3, p. 215-237, 2003.
- AUCHÈRE, F.; RUSNAK, F. What is the ultimate fate of superoxide anion in vivo?. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 7, n. 6, p. 664-667, 2002.
- 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 & Sons, 1995. 900 p.
- BAFANA, A.; DUTT, S.; KUMAR, A.; KUMAR, S.; AHUJA, P. S. The basic and applied aspects of superoxide dismutase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 68, n. 2, p. 129-138, 2011.
- BECK, R.; PEDROSA, R. C.; DEJEANS, N.; GLORIEUX, C.; LEVÊQUE, P.; GALLET, B.; VERRAX, J. Ascorbate/menadione-induced oxidative stress kills cancer cells that express normal or mutated forms of the oncogenic protein Bcr-Abl. An in vitro and in vivo mechanistic study. **Investigational New Drugs**, v. 29, n. 5, p. 891-900, 2011.
- BOORSTEIN, W. R.; CRAIG, E. A. [25] Primer extension analysis of RNA. **Methods in Enzymology**, v. 180, p. 347-369, 1989.
- BRUNO-BÁRCENA, J. M.; AZCÁRATE-PERIL, M. A. e HASSAN, H. M. Role of antioxidant enzymes in bacterial resistance to organic acids. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 9, p. 2747-2753, 2010.
- BUS, J. S.; GIBSON, J. E. Paraquat: model for oxidant-initiated toxicity. **Environmental health perspectives**, v. 55, p. 37, 1984.

¹ De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

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

CARLIOZ, A.; TOUATI, D. Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life?. **The EMBO Journal**, v. 5, n. 3, p. 623, 1986.

CARR, R. J.; BILTON, R. F.; ATKINSON, T. Toxicity of paraquat to microorganisms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1112-1116, 1986.

CASTELL, J. V.; TERESA DONATO, M.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. Metabolism and bioactivation of toxicants in the lung. The in vitro cellular approach. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 57, p. 189-204, 2005.

CHAROENLAP, N.; EIAMPHUNGORN, W.; CHAUVATCHARIN, N.; UTAMAPONGCHAI, S.; VATTANAVIBOON, P.; MONGKOLSUK, S. OxyR mediated compensatory expression between *ahpC* and *kata* and the significance of *ahpC* in protection from hydrogen peroxide in *Xanthomonas campestris*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 249, n. 1, p. 73-78, 2005.

CHAROENLAP, N.; SHEN, Z.; MCBEE, M. E.; MUTHUPALANI, S.; WOGAN, G. N.; FOX, J. G.; SCHAUERA, D. B. Alkyl hydroperoxide reductase is required for *Helicobacter cinaedi* intestinal colonization and survival under oxidative stress in BALB/c and BALB/c interleukin-10^{-/-} mice. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 3, p. 921-928, 2012.

CHEN, Z.; LEWIS, K. A.; SHULTZABERGER, R. K.; LYAKHOV, I. G.; ZHENG, M.; DOAN, B.; SCHNEIDER, T. D. Discovery of Fur binding site clusters in *Escherichia coli* by information theory models. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 20, p. 6762-6777, 2007.

CHIANG, S. M.; SCHELLHORN, H. E. Regulators of oxidative stress response genes in *Escherichia coli* and their functional conservation in bacteria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 525, n. 2, p. 161-169, 2012.

CHRISTMAN, M. F.; MORGAN, R. W.; JACOBSON, F. S.; AMES, B. N. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. **Cell**, v. 41, n. 3, p. 753-762, 1985.

CHRISTMAN, M. F.; STORZ, G.; AMES, B. N. OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 10, p. 3484-3488, 1989.

COMPAN, I.; TOUATI, D. Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 6, p. 1687-1696, 1993.

CURTIS, P. D.; BRUN, Y. V. Getting in the loop: regulation of development in *Caulobacter crescentus*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 1, p. 13-41, 2010.

DEGNEN, S. T.; NEWTON, A. Chromosome replication during development in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Molecular Biology**, v. 64, n. 3, p. 671-680, 1972.

DOAN, N.; CONTRERAS, A.; FLYNN, J.; MORRISON, J.; SLOTS, J. Proficiencies of three anaerobic culture systems for recovering periodontal pathogenic bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 1, p. 171-174, 1999.

DUBBS, J. M.; MONGKOLSUK, S. Peroxiredoxins in bacterial antioxidant defense. In: **Peroxiredoxin Systems**. Springer Netherlands, 2007. p. 143-193.

DUBBS, J. M.; MONGKOLSUK, S. Peroxide-sensing transcriptional regulators in bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 194, n. 20, p. 5495-5503, 2012.

DUBRAC, S.; TOUATI, D. Fur Positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 13, p. 3802-3808, 2000.

ELY, B. [17] Genetics of *Caulobacter crescentus*. **Methods in Enzymology**, v. 204, p. 372-384, 1991.

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

FRIDOVICH, I. Superoxide radical and superoxide dismutases. **Annual Review of Biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 97-112, 1995.

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

GORT, A. S.; FERBER, D. M.; IMLAY, J. A. The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 1, p. 179-191, 1999.

GRAM, T. E. Chemically reactive intermediates and pulmonary xenobiotic toxicity. **Pharmacological Reviews**, v. 49, n. 4, p. 297-342, 1997.

GRÜNENFELDER, B.; RUMMEL, G.; VOHRADSKY, J.; RODER, D.; LANGEN, H.; JENAL, U. Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 8, p. 4681-4686, 2001.

GU, M.; IMLAY, J. A. The SoxRS response of *Escherichia coli* is directly activated by redox-cycling drugs rather than by superoxide. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 5, p. 1136-1150, 2011.

HAHN, J. S.; OH, S. Y.; ROE, J. H. Role of OxyR as a peroxide-sensing positive regulator in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 19, p. 5214-5222, 2002.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Oxford university press, 4^a ed. 2007. 888p.

HANAHAH, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v. 166, n. 4, p. 557-580, 1983.

HASSAN, H. M.; FRIDOVICH, I. Regulation of superoxide dismutase synthesis in *Escherichia coli*. Induction by methyl viologen. **J. Biol. Chem**, v. 252, n. 21, p. 7667-7672, 1977.

_____. Regulation of the synthesis of catalase and peroxidase in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem**, v. 253, p. 6445-6450, 1978.

_____. Paraquat and *Escherichia coli*. Mechanism of production of extracellular superoxide radical. **Journal of Biological Chemistry**, v. 254, n. 21, p. 10846-10852, 1979.

HASSAN, H. M.; MOODY, C. S. Regulation of manganese-containing superoxide dismutase in *Escherichia coli*. Anaerobic induction by nitrate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 35, p. 17173-17177, 1987.

HASSEIT, D. J.; WENDY, T.; WOODRUFF, A.; WOZNIAK, D. J.; VASIL, M. L.; COHEN, M. S.; OHMAN, D. E. Cloning and characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* *sodA* and *sodB* genes encoding manganese-and iron-cofactored superoxide dismutase: demonstration of increased manganese superoxide dismutase activity in alginate-producing bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 23, p. 7658-7665, 1993.

HO, T. D.; ELLERMEIER, C. D. Extra cytoplasmic function σ factor activation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 182-188, 2012.

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

HORSBURG, M. J.; INGHAM, E.; FOSTER, S. J. In *Staphylococcus aureus*, Fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 2, p. 468-475, 2001.

HOTTES, A. K.; MEEWAN, M.; YANG, D.; ARANA, N.; ROMERO, P.; MCADAMS, H. H. e STEPHENS, C. Transcriptional profiling of *Caulobacter crescentus* during growth on complex and minimal media. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 5, p. 1448-1461, 2004.

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

IMLAY, J. A.; CHIN, S. M.; LINN, S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. **Science**, v. 240, n. 4852, p. 640-642, 1988.

IMLAY, K. R.; IMLAY, J. A. Cloning and analysis of *sodC*, encoding the copper-zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 9, p. 2564-2571, 1996.

IMLAY, J. A. Pathways of oxidative damage. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 57, n. 1, p. 395-418, 2003.

IMLAY, J. A. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. **Annual Review of Biochemistry**, v. 77, p. 755, 2008.

IMLAY, J. A. The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 7, p. 443-454, 2013.

ITALIANI, V. C. S.; BRAZ, V. S.; XIAO, X.; STEINMAN, H. M.; MARQUES, M. V. Catalase-peroxidase activity is decreased in a *Caulobacter crescentus* rho mutant. **FEMS Microbiology Letters**, v. 303, n. 1, p. 48-54, 2010.

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

JAIR, K. W.; MARTIN, R. G.; ROSNER, J. L.; FUJITA, N.; ISHIHAMA, A.; WOLF, R. E. Purification and regulatory properties of MarA protein, a transcriptional activator of *Escherichia coli* multiple antibiotic and superoxide resistance promoters. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 24, p. 7100-7104, 1995.

KATONA, L. I.; TOKARZ, R.; KUHLOW, C. J.; BENACH, J.; BENACH, J. L. The fur homologue in *Borrelia burgdorferi*. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 19, p. 6443-6456, 2004.

KIM, Y. C.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J. Transcriptional regulation by iron of genes encoding iron-and manganese-superoxide dismutases from *Pseudomonas putida*. **Gene**, v. 239, n. 1, p. 129-135, 1999.

KIM, J. A.; MAYFIELD, J. Identification of *Brucella abortus* OxyR and its role in control of catalase expression. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 19, p. 5631-5633, 2000.

KOHLER, C. et al. Extracytoplasmic function (ECF) sigma factor σ^F is involved in *Caulobacter crescentus* response to heavy metal stress. **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. 210, 2012.

KULLIK, I.; STEVENS, J.; TOLEDANO, M. B.; STORZ, G. Mutational analysis of the redox-sensitive transcriptional regulator OxyR: regions important for DNA binding and multimerization. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 5, p. 1285-1291, 1995.

KUMAR, S.; GAUTAM, S.; SHARMA, A. Antimutagenic and antioxidant properties of plumbagin and other naphthoquinones. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 755, p. 30-41, 2013.

LACOUR, S.; LANDINI, F. σ S-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of σ S-dependent genes and identification of their promoter sequences. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 21, p. 7186-7195, 2004.

LAKHAL, R.; AURIA, R.; DAVIDSON, S.; OLLIVIER, B.; DURAND, MC; DOLLA, A.; HAMDI, M. e COMBET-BLANC, Y. Oxygen uptake rates in the hyperthermophilic anaerobe *Thermotoga maritima* grown in a bioreactor under controlled oxygen exposure: clues to its defence strategy against oxidative stress. **Archives of Microbiology**, v. 193, n. 6, p. 429-438, 2011.

LANDT, S. G.; ABELIUK, E.; MCGRATH, P. T.; LESLEY, J. A.; MCADAMS, H. H.; SHAPIRO, L. Small non-coding RNAs in *Caulobacter crescentus*. **Molecular Microbiology**, v. 68, n. 3, p. 600-614, 2008.

LANDT, S. G.; LESLEY, J. A.; BRITOS, L.; SHAPIRO, L. CrfA, a small noncoding RNA regulator of adaptation to carbon starvation in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 18, p. 4763-4775, 2010.

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

LAWLER, M. L.; BRUN, Y. U. A molecular beacon defines bacterial cell asymmetry. **Cell**, v. 124, n. 5, p. 891-893, 2006.

LIEBAL, U. W.; SAPPA, P. K.; MILLAT, T.; STEIL, L.; HOMUTH, G.; VÖLKER, U.; WOLKENHAUER, O. Proteolysis of beta-galactosidase following SigmaB activation in *Bacillus subtilis*. **Molecular BioSystems**, v. 8, n. 6, p. 1806-1814, 2012.

LIVAK K. J.; SCHMITTGEN T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOPRASERT, S.; SALLABHAN, R.; WHANGSUK, W.; MONGKOLSUK, S. Regulation of the *katG-dpsA* operon and the importance of KatG in survival of *Burkholderia pseudomallei* exposed to oxidative stress. **FEBS Letters**, v. 542, n. 1, p. 17-21, 2003.

LOPRASERT, S.; SALLABHAN, R.; WHANGSUK, W.; MONGKOLSUK, S. The *Burkholderia pseudomallei oxyR* gene: expression analysis and mutant characterization. **Gene**, v. 296, n. 1, p. 161-169, 2002.

LOURENÇO, R. F.; GOMES, S. L. The transcriptional response to cadmium, organic hydroperoxide, singlet oxygen and UV-A mediated by the σ^E -ChrR system in *Caulobacter crescentus*. **Molecular Microbiology**, v. 72, n. 5, p. 1159-1170, 2009.

LOURENÇO, R. F.; KOHLER, C.; GOMES, S. L. A two-component system, an anti-sigma factor and two paralogous ECF sigma factors are involved in the control of

general stress response in *Caulobacter crescentus*. **Molecular Microbiology**, v. 80, n. 6, p. 1598-1612, 2011.

LUNDRIGAN, M. D.; ARCENEUX, J. E.; ZHU, W.; BYERS, B. R. Enhanced hydrogen peroxide sensitivity and altered stress protein expression in iron-starved *Mycobacterium smegmatis*. **Biometals**, v. 10, n. 3, p. 215-225, 1997.

LUO, L.; QI, M. S.; YAO, S. Y.; CHENG, H. P.; ZHU, J. B.; YU, G. Q. Role of oxyR from *Sinorhizobium meliloti* in regulating the expression of catalases. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 37, n. 6, p. 421-428, 2005.

MAGNANI, L.; GAYDOU, E. M.; HUBAUD, J. C. Spectrophotometric measurement of antioxidant properties of flavones and flavonols against superoxide anion. **Analytica Chimica Acta**, v. 411, n. 1, p. 209-216, 2000.

MALAKOOTI, J.; ELY, B. Principal sigma subunit of the *Caulobacter crescentus* RNA polymerase. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 23, p. 6854-6860, 1995.

MARQUES, M. V. **Biologia molecular e genética bacteriana**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2012. 348 p.

MARTINEZ, A.; KOLTER, R. Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 16, p. 5188-5194, 1997.

MASSÉ, E.; GOTTESMAN, S. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 7, p. 4620-4625, 2002.

MASSÉ, E.; VANDERPOOL, C. K.; GOTTESMAN, S. Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 187, n. 20, p. 6962-6971, 2005.

MCGRATH, P. T.; LEE, H.; ZHANG, L.; INIESTA, A. A.; HOTTES, A. K.; TAN, M. H.; et al. High-throughput identification of transcription start sites, conserved promoter motifs and predicted regulons. **Nature Biotechnology**, v. 25, n. 5, p. 584-592, 2007.

MEY, A. R.; WYCKOFF, E. E.; KANUKURTHY, V.; FISHER, C. R.; PAYNE, S.M. Iron and fur regulation in *Vibrio cholerae* and the role of fur in virulence. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 8167-8178, 2005.

MILLER, J. H. **Experiments in molecular genetics**. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972. 466 p.

MISHRA, S.; IMLAY, J. Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide?. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 525, n. 2, p. 145-160, 2012.

MONGKOLSUK, S.; SUKCHAWALIT, R.; LOPRASERT, S.; PRAITUAN, W.; UPAICHIT, A. Construction and physiological analysis of a *Xanthomonas* mutant to examine the role of the *oxyR* gene in oxidant-induced protection against peroxide killing. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 15, p. 3988-3991, 1998.

MULVEY, M. R.; SWITALA, J.; BORYS, A.; LOEWN, P. C. Regulation of transcription of *katE* and *katF* in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 12, p. 6713-6720, 1990.

NASCIMENTO, S.; SUAREZ, E. R.; PINHAL, M. A. S. Tecnologia de PCR e RT-PCR em tempo real e suas aplicações na área médica. **RBM**, V 67, Especial Oncologia. 2010.

NIERMAN, W. C.; FELDBLYUM, T. V.; LAUB, M. T.; et al. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 7, p. 4136-4141, 2001.

NDONTSA, E. N.; MOORE, R. L.; GOODWIN, D. C. Stimulation of KatG catalase activity by peroxidatic electron donors. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 525, n. 2, p. 215-222, 2012.

NUNOSHIBA, T.; HIDALGO, E.; CUEVAS, C. A.; DEMPLE, B. Two-stage control of an oxidative stress regulon: the *Escherichia coli* SoxR protein triggers redox-inducible expression of the *soxS* regulatory gene. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 19, p. 6054-6060, 1992.

NUNOSHIBA, T.; OBATA, F.; BOSS, A. C.; OIKAWA, S.; MORI, T.; KAWANISHI, S.; YAMAMOTO, K. Role of iron and superoxide for generation of hydroxyl radical, oxidative DNA lesions, and mutagenesis in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 49, p. 34832-34837, 1999.

OCHSNER, U. A.; VASIL, M. L.; ALSABBAGH, E.; PARVATIYAR, K.; HASSETT, D. J. Role of the *Pseudomonas aeruginosa oxyR-recG* operon in oxidative stress defense and DNA repair: OxyR-dependent regulation of *katB-ankB*, *ahpB*, and *ahpC-ahpF*. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 16, p. 4533-4544, 2000.

PANMANEE, W.; HASSETT, D. J. Differential roles of OxyR-controlled antioxidant enzymes alkyl hydroperoxide reductase (AhpCF) and catalase (KatB) in the protection of *Pseudomonas aeruginosa* against hydrogen peroxide in biofilm vs. planktonic culture. **FEMS Microbiology Letters**, v. 295, n. 2, p. 238-244, 2009.

POINDEXTER, J. S. The *Caulobacters*: ubiquitous unusual bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 45, n. 1, p. 123, 1981.

POOLE, L. B.; REYNOLDS, C. M.; WOOD, Z. A.; KARPLUS, P. A.; ELLIS, H. R.; LI CALZI, M. AhpF and other NADH: peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low M_r thioredoxin reductase. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 20, p. 6126-6133, 2000.

POOLE, L. B. Bacterial defenses against oxidants: mechanistic features of cysteine-based peroxidases and their flavoprotein reductases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 433, n. 1, p. 240-254, 2005.

REISENAUER, A.; MOHR, C. D.; SHAPIRO, L. Regulation of a heat shock sigma 32 homolog in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 7, p. 1919-1927, 1996.

SAKAMOTO, H.; TOUATI, D. Cloning of the iron superoxide dismutase gene (*sodB*) in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 159, n. 1, p. 418-420, 1984.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N. Y.: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SCHNELL, S.; STEINMAN, H. M. Function and stationary-phase induction of periplasmic copper-zinc superoxide dismutase and catalase/peroxidase in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 20, p. 5924-5929, 1995.

SEAVER, L. C.; IMLAY, J. A. Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 24, p. 7173-7181, 2001.

SILVA NETO, J. F.; 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 Research**, v. 37, n. 14, p. 4812-4825, 2009.

SILVA NETO, J. F. **Identificação de genes regulados em resposta à carência de ferro em *Caulobacter crescentus***. São Paulo, 2011. 39p.

SILVA NETO, J. F.; LOURENÇO, R. F.; MARQUES, M. V. Global transcriptional response of *Caulobacter crescentus* to iron availability. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1-16, 2013.

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

SOUZA, D. de; MACHADO, S. A. S. Estudo eletroanalítico do herbicida paraquat em soluções aquosas por voltametria de onda quadrada utilizando ultramicroeletrodos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 644-647, 2003.

STAROŃ, A.; SOFIA, H. J.; DIETRICH, S.; ULRICH, L. E.; LIESEGANG, H.; MASCHER, T. The third pillar of bacterial signal transduction: classification of the extracytoplasmic function (ECF) σ factor protein family. **Molecular Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 557-581, 2009.

STEINMAN, H. M. Function of periplasmic copper-zinc superoxide dismutase in *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 4, p. 1198-1202, 1993.

STEINMAN, H. M.; FAREED, F.; WEINSTEIN, L. Catalase-peroxidase of *Caulobacter crescentus*: function and role in stationary-phase survival. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 21, p. 6831-6836, 1997.

STORZ, G.; IMLAY, J. A. Oxidative stress. **Current Opinion in Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 188-194, 1999.

STORZ, G.; ZHENG, M. **Oxidative stress**: bacterial stress responses. Washington, D. C.: ASM Press, 2000. 485 p.

TOUATI, D.; JACQUES, M.; TARDAT, B.; BOUCHARD, L.; DESPIED, S. Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in Δfur mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 9, p. 2305-2314, 1995.

TOUATI, D. Iron and oxidative stress in bacteria. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373, n. 1, p. 1-6, 2000.

TUMMALA, S. B.; WELKER, N. E.; PAPOUTSAKIS, E. T. Development and Characterization of a Gene Expression Reporter System for *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 3793-3799, 1999.

VEČEREK, B.; MOLL I.; AFONYUSHKIN, T.; KABERDIN, V.; BLASI, U. Interaction of the RNA chaperone Hfq with mRNAs: direct and indirect roles of Hfq in iron metabolism of *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 50, n. 3, p. 897-909, 2003.

WEISSBACH, H.; ETIENNE, F.; HOSHI, T.; HEINEMANN, S. H.; LOWTHER, W. T.; MATTHEWS, B.; BROT, N. Peptide methionine sulfoxide reductase: structure, mechanism of action, and biological function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 397, n. 2, p. 172-178, 2002.

WOOD, Z. A.; POOLE, L. B.; HANTGAN, R. R.; KARPLUS, P. A. Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins. **Biochemistry**, v. 41, n. 17, p. 5493-5504, 2002.

WOOD, Z. A.; SCHRÖDER, E.; ROBIN HARRIS, J.; POOLE, L. B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 28, n. 1, p. 32-40, 2003.

WU, J.; NEWTON, A. Isolation, identification, and transcriptional specificity of the heat shock sigma factor sigma 32 from *Caulobacter crescentus*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 7, p. 2094-2101, 1996.

ZAFAR M. A.; SANCHEZ-ALBEROLA, N.; WOLF JR, R. E. Genetic evidence for a novel interaction between transcriptional activator SoxS and region 4 of the σ^{70} subunit of RNA polymerase at class II SoxS-Dependent promoters in *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**, v. 407, n. 3, p. 333-353, 2011.

ZHANG, J.; MADDEN, T. L. PowerBLAST: a new network BLAST application for interactive or automated sequence analysis and annotation. **Genome Research**, v. 7, n. 6, p. 649-656, 1997.

ZHENG, M.; DOAN, B.; SCHNEIDER, T. D.; STORZ, G. OxyR and SoxRS regulation of *fur*. **J. Bacteriol.** v. 181, n. 15, p. 4639-4643, 1999.

ZOU, P. J.; BOROVIK, I.; DE ORUÉ LUCANA, D. O.; MÜLLER, D.; SCHREMPF, H. **Microbiology**, v. 145, n. 3, p. 549-559, 1999.