

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

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 ($O_2^{\bullet-}$), do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ou do radical hidroxila (OH^{\bullet}), 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.

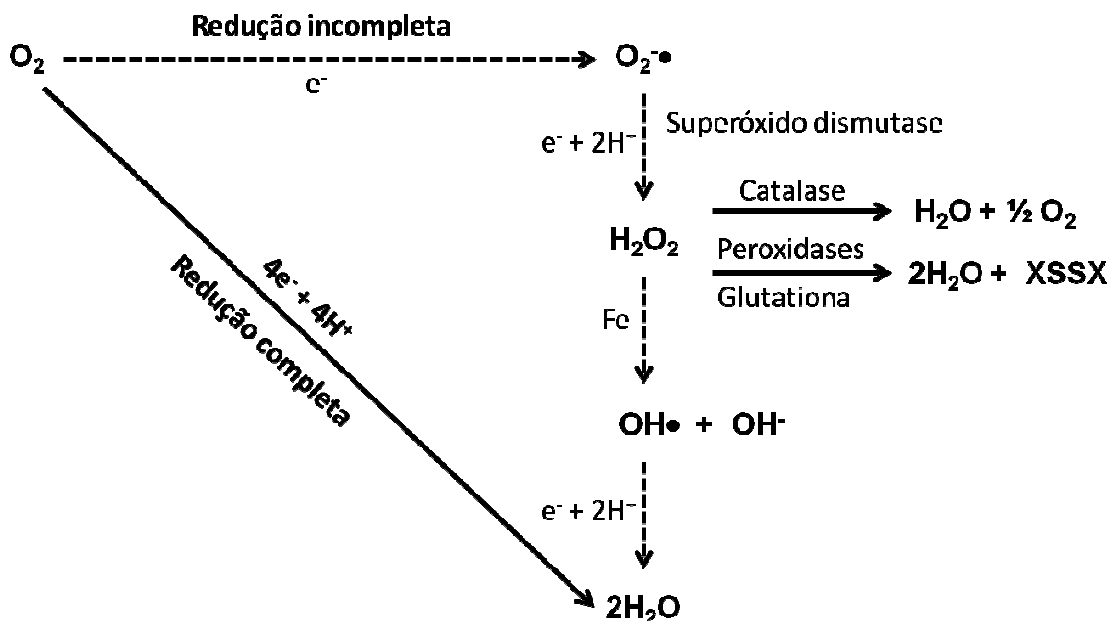
Oxidative stress, caused by increased levels of superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), or the hydroxyl radical (OH^{\bullet}), can lead to damage in all cellular components. Several enzymes are responsible for removing these reactive species from the cell. Alkyl hydroperoxide 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*.

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



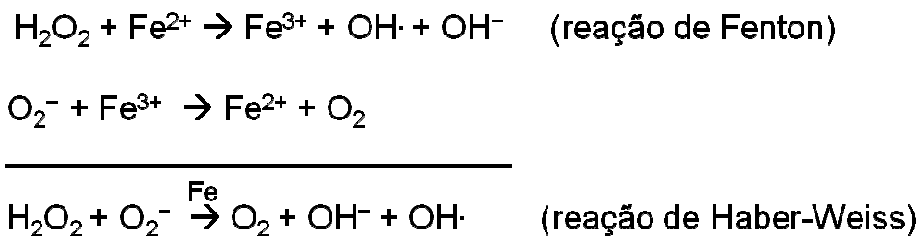
A redução do oxigênio molecular (O_2) pode ocorrer de forma completa ou incompleta. Quando o oxigênio molecular é reduzido completamente à água, não há formação de espécies reativas de oxigênio. No entanto, quando a redução é incompleta, ocorre a formação das espécies reativas: ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), 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 $O_2^{\cdot-}$ 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^{\cdot}). Na próxima etapa, Fe^{3+} foi reduzido a Fe^{2+} por aceitar um elétron do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), 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: $NO^3- \rightarrow NO^2- \rightarrow NO^{\cdot} \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$ (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^{\cdot}) é um composto tóxico, que na presença de superóxido, converte-se espontaneamente a peroxinitrito: $NO^{\cdot} + O_2^{\cdot-} = ONOO^{-}$. 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): $2O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$.

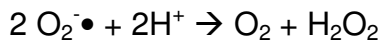
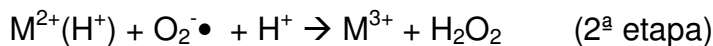
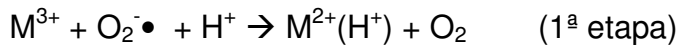
Quatro diferentes tipos de centros de metais são encontrados nas superóxido dismutases, dividindo essa família em Cu/ZnSOD, FeSOD, MnSOD e NiSOD. Enquanto os dois maiores grupos, CuZnSODs e FeSODs/MnSODs, tiveram origens independentes, FeSODs e MnSODs são resultado de duplicação gênica, sendo FeSOD o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

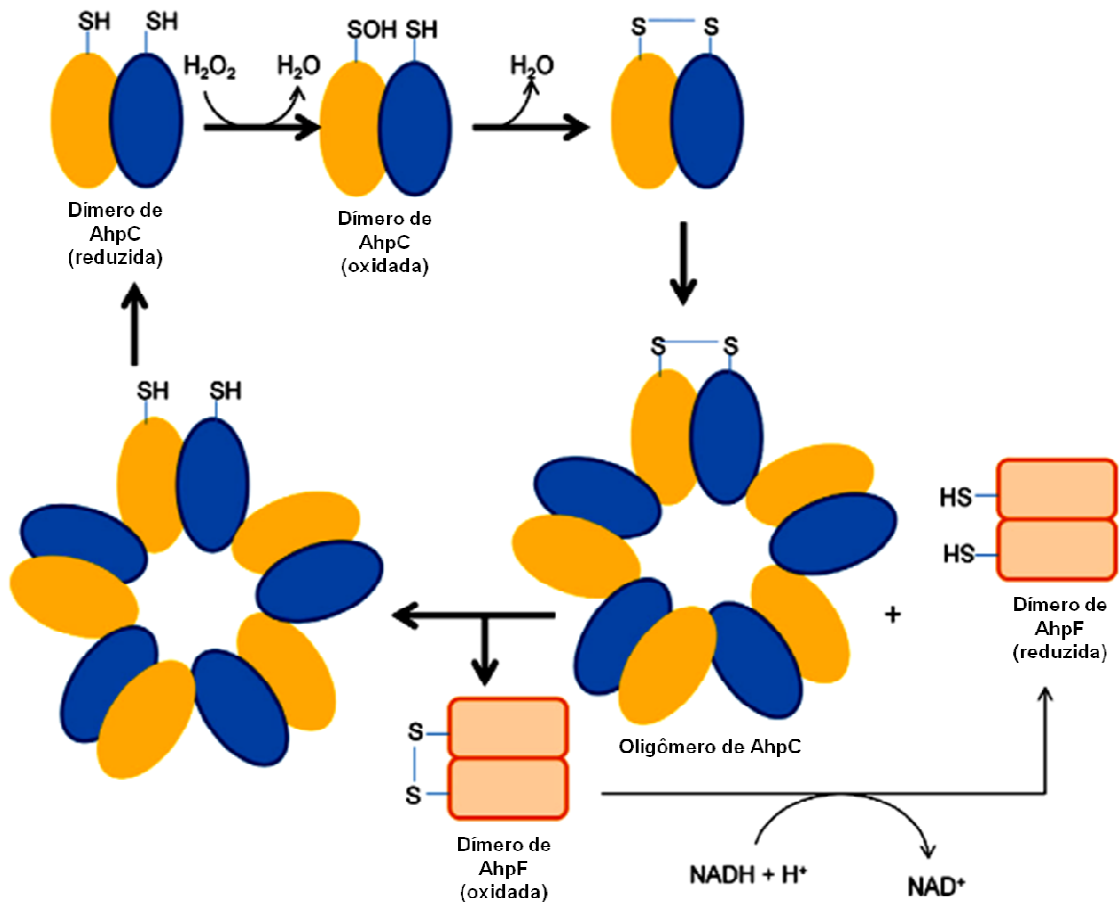
Quanto à regulação do gene *sodC* que codifica a proteína CuZnSOD em *E. coli*, sabe-se que ele é reprimido por Fnr em condição anaeróbica e é induzido em fase estacionária pelo fator sigma RpoS (GORT; FERBER; IMLAY, 1999).

1.2 Peroxirredoxinas

As peroxirredoxinas são um importante componente da defesa bacteriana contra a toxicidade dos peróxidos (DUBBS; MONGKOLSUK, 2007). A proteína AhpC (**A**lky**l**h**y**d**r**o**p**eroxidase) 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.

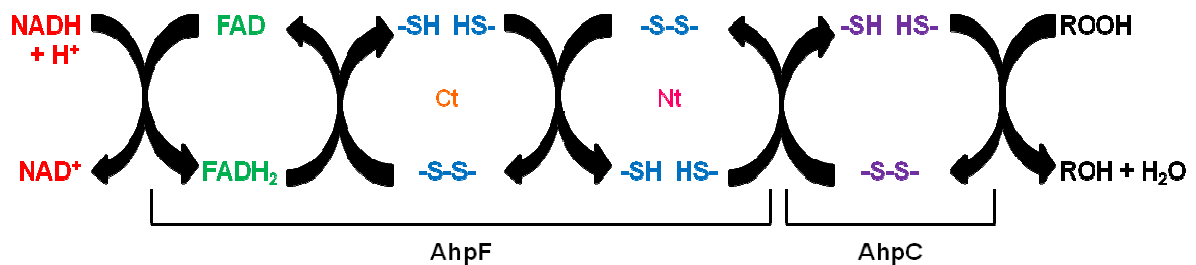
Fonte: adaptado de Mishra e Imlay, 2012.

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 hidróperóxido.

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).

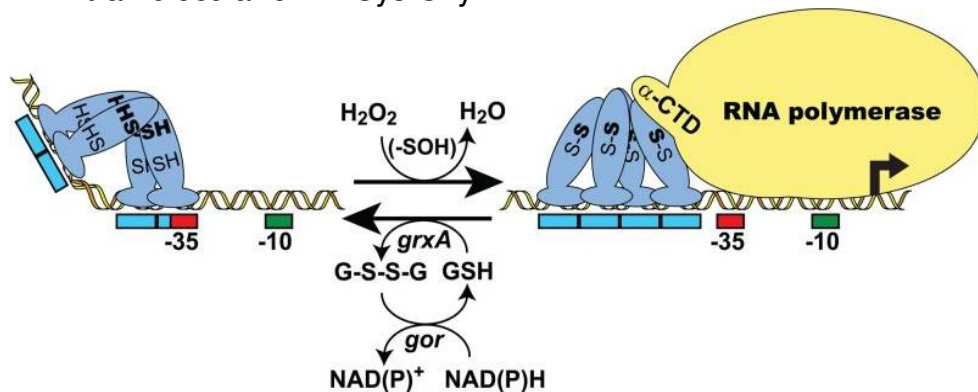
1.3.1 O ativador de transcrição OxyR

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 glutathion 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 FecI) 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* (STARÓN 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).

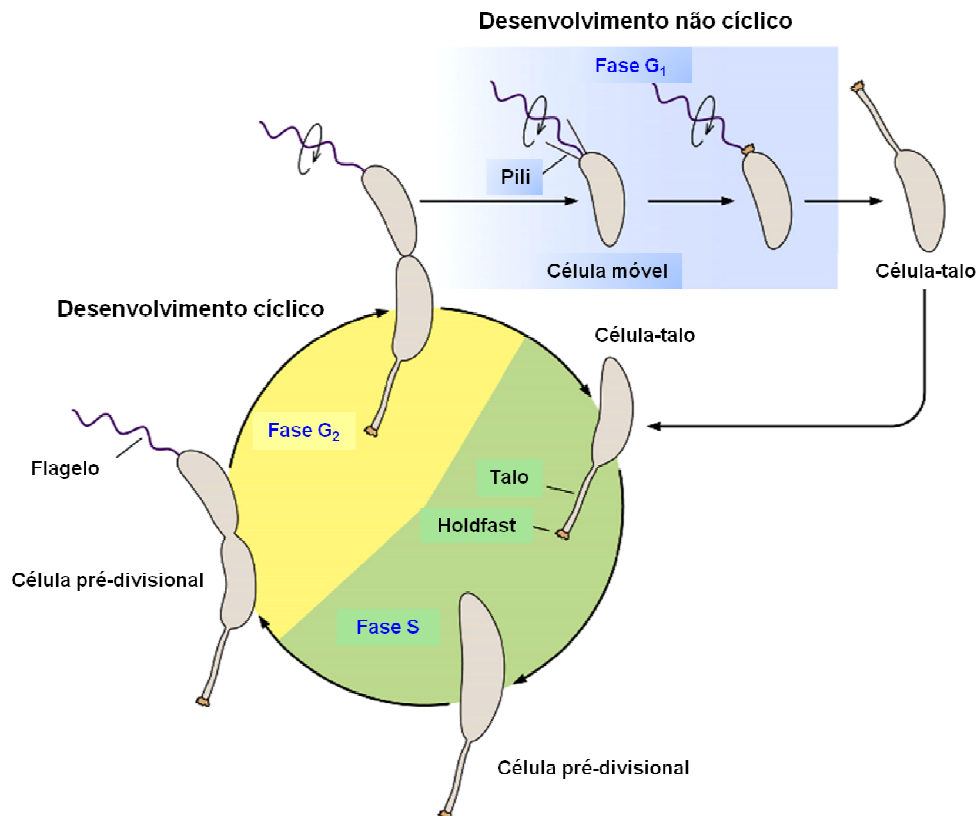
A homeostase de ferro e a resposta a estresse oxidativo são conectadas por meio de interações regulatórias. Em *E. coli*, o controle do metabolismo de ferro é parte integrante da resposta de defesa a antioxidantes, e Fur é regulado tanto por OxyR como por SoxRS (ZHENG et al., 1999). O mutante Δfur de *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-divisória. Na fase pré-divisória 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 sessil 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-divisória 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 ciclohidrolase 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.

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.; GALLETZ, 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.