

CAROLINA ANTUNES DO PRADO TAVARES DA SILVA

**ESTUDO DA REGULAÇÃO DO GENE *cspD*
DE *Caulobacter crescentus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, para obtenção de Título de Doutor em Biotecnologia.

São Paulo
2011

CAROLINA ANTUNES DO PRADO TAVARES DA SILVA

**ESTUDO DA REGULAÇÃO DO GENE *cspD*
DE *Caulobacter crescentus***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT para obtenção de Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de atuação: Biotecnologia

Orientador: Prof^ª. Dr^ª. Marilis do Valle Marques

Versão corrigida:

Versão original encontra-se arquivada no serviço de comunicação do Instituto de Ciências Biomédicas.

São Paulo
2011

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

© reprodução total

da Silva, Carolina Antunes do Prado Tavares.

Estudo da regulação do gene *cspD* de *Caulobacter crescentus* /
Carolina Antunes do Prado Tavares da Silva. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Marilis do Valle Marques.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan. Área de concentração: Biotecnologia. Linha de pesquisa: Regulação Gênica.

Versão do título para o inglês: The study of *cspD* gene regulation in *Caulobacter crescentus*

Descritores: 1. *cspD* 2. Fase Estacionária 3. ppGpp 4. Regulador de resposta 5. Resposta a estresse em bactérias 6. *Caulobacter crescentus* I. Marques, Marilis do Valle II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB0189/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia
Universidade de São Paulo, Instituto Butantan, Instituto de Pesquisas Tecnológicas

Candidato(a): Carolina Antunes do Prado Tavares da Silva.

Título da Tese: Estudo da regulação do gene *cspD* de *Caulobacter crescentus*.

Orientador(a): Marilis do Valle Marques.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

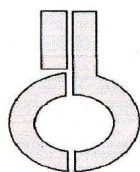
Examinador(a): Nome completo: Beny Spira
Instituição: ICB/USP

Examinador(a): Nome completo: Suely Lopes Gomes
Instituição: IQ-USP

Examinador(a): Nome: Heloíza Ramos Barbosa
Instituição: ICB/USP

Examinador(a): Nome: Jose Gregorio Cabrera Gomez
Instituição: ICB/USP

Presidente: Nome completo: Marilis do Valle Marques
Instituição: ICB-USP



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

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

Comissão de Ética em Pesquisa

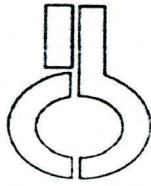
CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 208/07, referente ao projeto intitulado *Estudo da regulação do gene cspD de Caulobacter crescentus* sob a responsabilidade de **Carolina Antunes do Prado Tavares da Silva**, foi analisado na presente data pela CEPsh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por esta Comissão.

São Paulo, 09 de maio de 2007.

Prof. Dr. PAOLO M.A ZANOTTO

Vice-Coordenador da CEPsh-ICB/USP



**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) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **081** nas fls. **34** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Marilis do Valle Marques, Coordenador(a) da Linha de Pesquisa "**Estudo da regulação de genes envolvidos na resposta a estresses ambientais em caulobacter crescentus**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Valéria Cristina da Silva Italiani, Ricardo Ruiz Mazzon, Heloise Balhesteros, Carolina Antunes**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **22.06.2006**.

São Paulo, 23 de junho de 2006.

Prof. Dra. Marília C.L. Seelaender
Coordenadora -CEEA - ICB/USP

Prof. Dra. Patrícia Castelucci
Secretária Suplente CEEA – ICB/USP

Aos meus pais Sandra e Roberto pelo exemplo de amor, união, dedicação, pelo apoio e incentivo nos momentos mais importantes da minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marilis do Valle Marques pela excelente orientação, pela confiança em meu trabalho, pelos ensinamentos em todos os momentos de dúvida, pelo exemplo de profissional, pela dedicação e seriedade no laboratório e formação dos seus alunos.

Aos colegas de laboratório, Elza, Valéria Italiani, Vânia, José, Valéria Karla, André, Daniella, Ricardo, Heloise, Juliana, Ynês, Maristela, Mirian, Rafael e João, pela colaboração e ajuda, pela amizade e principalmente pelo convívio harmonioso que tornaram meu cotidiano mais leve graças ao entusiasmo e à boa vontade.

Aos professores e alunos do grupo de seminários e aos componentes da banca de qualificação pelas sugestões, em especial ao Prof. Beny Spira, Prof Suely Lopes Gomes e ao Dr. Rogério Ferreira Lourenço.

Aos secretários Eliane, Fábria e Marcos pelo trabalho sério e prestativo, meu reconhecimento à disponibilidade com que sempre me atenderam à solicitação.

Aos funcionários Marlene, Iris e Emílio pelo carinho, eficiência e apoio técnico.

Aos funcionários do setor de esterilização, em especial ao senhor José.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

Aos amigos Vânia, José, Ricardo e Heloi pela ajuda essencial neste trabalho, incentivo e exemplos de profissionais dedicados.

Aos meus pais Roberto e Sandra pela lição de esperança; sempre repetindo palavras essenciais de confiança necessárias para realizar os meus sonhos.

Aos meus queridos irmãos Felipe e Pedro por estarem sempre presentes.

À minha Tia Sônia, pelo reconhecimento para além do trabalho, pela indispensável colaboração em muitos momentos ao longo desse período. Sou imensamente grata pelo apoio e afeto.

A todos os meus amigos, por terem enriquecido minha vida com exemplos de solidariedade e amizade compartilhadas todo esse tempo. Meu muitíssimo obrigado pelas múltiplas e inestimáveis contribuições.

Ao meu amado noivo Roberto, pela amizade, carinho, compreensão e principalmente por compartilhar nossas vidas, nossos sonhos, nossos medos, obrigada por estar sempre ao meu lado nessa jornada.

A todos aqueles que, embora não nomeados, me brindaram com seus inestimáveis apoios em distintos momentos e por suas presenças afetivas, o meu reconhecido e muito obrigado!

"Além da mente humana e como um impulso livre, cria-se a ciência. Esta se renova, assim como as gerações, frente a uma atividade que constitui o melhor jogo do *homo ludens*: a ciência é, no mais estrito e melhor dos sentidos, uma gloriosa diversão"

Jacques Barzun

RESUMO

DA SILVA, C. A. P. T. Estudo da regulação do gene *cspD* de *Caulobacter crescentus*. 2011. 125 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CspD é uma das quatro proteínas de choque frio de *Caulobacter crescentus*, sendo maior que as outras CSPs por possuir dois domínios de choque frio, e tem seu papel na célula ainda desconhecido. O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar os fatores *in cis* e *in trans* envolvidos na regulação da expressão do gene *cspD* em *C. crescentus*. Neste trabalho foi visto que a expressão de *cspD* é induzida pela carência de glicose no meio, mas não pela carência de nitrogênio. Esta indução é dependente do sinalizador ppGpp, indicando que ppGpp está envolvido na sinalização de carência de carbono. Um regulador de resposta de um sistema de dois componentes (SpdR) foi identificado como responsável pela indução em fase estacionária, sendo fosforilado pela histidina quinase cognata SpdS. Através de ensaios de EMSA e DNaseI *footprinting* pudemos verificar que a proteína SpdR se liga em uma sequência repetida invertida no promotor de *cspD*, e que essa ligação é dependente da fosforilação no resíduo de aspartato na posição 64 da proteína. Foi construído um mutante nulo do gene SpdR e este foi testado quanto à resistência a estresse oxidativo causado por H₂O₂ e viabilidade em fase estacionária; o mutante não apresentou diferença na resposta em relação à linhagem selvagem.

Palavras-chave: Fase estacionária. CspD. Regulador de resposta. ppGpp Regulação gênica. Resposta a estresse em bactérias. *Caulobacter crescentus*.

ABSTRACT

DA SILVA, C. A. P. T. The study of *cspD* gene regulation in *Caulobacter crescentus*. 2011.125 p. Thesis (PhD in Biotechnology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

CspD is one of the four cold shock proteins of *Caulobacter crescentus* being larger than the other ones by possessing two cold shock domains, and its cellular role is still unknown. The aim of this work was to identify and characterize factors *in cis* and *in trans* involved in regulation of *cspD* expression in *C. crescentus*. In this work we determined that *cspD* expression is induced by glucose starvation but not by nitrogen starvation. This induction is dependent on the signalling molecule ppGpp, indicating that it is involved in carbon starvation signaling. A response regulator of a two-component system (SpdR) was identified as responsible for stationary phase induction, being phosphorylated by the cognate histidine kinase SpdS. EMSA and DNaseI footprinting assays showed that the SpdR protein binds to an inverted repeat at the *cspD* promoter, and that this binding is dependent on phosphorylation at the aspartate residue at position 64. A null *spdR* mutant strain was constructed and its resistance to H₂O₂ and stationary phase viability were determined, however the mutant showed no difference in response when compared to the wild type.

Keywords: Stationary-phase. CspD. Response Regulator. Gene regulation. ppGpp. Bacterial stress response. *Caulobacter crescentus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ciclo celular de <i>C. crescentus</i>	19
Figura 2 - Modelo do funcionamento das proteínas de choque frio.....	23
Figura 3 - Níveis da regulação de σ^S	27
Figura 4 - Morfologia e viabilidade de <i>C. crescentus</i> na fase estacionária.....	29
Figura 5 – Resposta severa.....	33
Figura 6 - Morfologia e viabilidade $\Delta cspC$, $\Delta cspD$ e $\Delta cspCD$ na fase estacionária.	35
Figura 7 - Região regulatória do gene <i>cspD</i>	36
Figura 8 - Mapeamento da região promotora do gene <i>cspD</i>	37
Figura 9 - Esquema da varredura da biblioteca de mutantes.....	45
Figura 10 - Esquema da reação de PCR reverso.	50
Figura 11 - Esquema da mutação sítio-específica.	55
Figura 12 - Visualização da reação de PCR reverso (1ª biblioteca).....	66
Figura 13 - Curva de crescimento de NA1000 e mutante 46/2A.	68
Figura 14 - Visualização da reação de PCR reverso (2ª biblioteca).....	71
Figura 15 - Domínios da proteína codificada pelo gene CC0247	72
Figura 16 - Posição dos genes CC0248 e CC0247 na região do genoma de <i>C. crescentus</i>	73
Figura 17 - Expressão de <i>cspD</i> no mutante SP0247.....	73
Figura 18 - Expressão dirigida por pEL4 em carência de glicose.....	75
Figura 19 - Expressão dirigida por pEL5 em carência de glicose.....	75
Figura 20 - Expressão dirigida por pEL4 em carência de amônia.	76
Figura 21 - Posição da extremidade 5' do inserto no plasmídeo pCA1.	77
Figura 22 - Expressão dirigida por diferentes construções da região regulatória do gene <i>cspD</i>	78
Figura 23 - Confirmação da ocorrência de dupla recombinação do mutante $\Delta spoT$	79
Figura 24 - Avaliação da expressão de <i>cspD</i> na linhagem selvagem NA1000 e no mutante SP0200.....	80
Figura 25 - Expressão de <i>cspD</i> em diferentes meios na linhagem selvagem NA1000	82
Figura 26 - Expressão de <i>cspD</i> em diferentes meios na linha mutante SP0200.....	83
Figura 27 - Expressão de <i>cspD</i> na linhagem mutante SP0200.....	84
Figura 28 - Expressão de <i>cspD</i> na linhagem mutante SP0247 complementada e no mutante SP0210.....	86
Figura 29 - Reação de transferência de fosfato <i>in vitro</i>	87

Figura 30 - Ligação de SpdR na região promotora de <i>cspD</i>	88
Figura 31 - Efeito da mutação no sítio de fosforilação da proteína SpdR.....	90
Figura 32 - Determinação da sequência de ligação da proteína SpdR.	91
Figura 33 - <i>Western blotting</i> para confirmação da indução da proteína CspD.	93
Figura 34 - Curva de crescimento da linhagem NA1000 superexpressando a proteína CspD	94
Figura 35 - Viabilidade relativa da linhagem NA1000 superexpressando CspD.....	95
Figura 36 - Microscopia de células da linhagem NA1000 superexpressando CspD	96
Figura 37 - Ensaio de inibição por H ₂ O ₂ . Em células superexpressndo CspD.....	98
Figura 38 - Curva de crescimento da linhagem mutante SP2710 (NA1000 Δ <i>spdR</i>)	100
Figura 39 - Viabilidade relativa das linhagens NA1000 e SP2710 (Δ <i>spdR</i>).....	101
Figura 40 - Ensaio de inibição por H ₂ O ₂	102
Figura 41 - Morfologia celular NA1000 e SP2710 (Δ <i>spdR</i>).....	103

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens utilizadas.	40
Tabela 2 - Plasmídeos utilizados	41
Tabela 3 - Oligonucleotídeos utilizados	42
Tabela 4 - Composição dos meios M2	51
Tabela 5 - Atividade de β -Galactosidase nos mutantes selecionados.	65
Tabela 6 - Identificação dos genes interrompidos nos mutantes da primeira biblioteca.....	67
Tabela 7 - Atividade de β -Galactosidase nos mutantes selecionados.	70
Tabela 8 - Identificação dos genes interrompidos nos mutantes da segunda biblioteca.	71
Tabela 9 - Possíveis genes regulados por SpdR.	92

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	<i>Caulobacter crescentus</i>	17
1.2	Proteínas de Choque Frio	20
1.3	Fase estacionária	25
1.4	Resposta severa	31
1.5	A Proteína CspD	33
2	OBJETIVO	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	40
3.1	Meios Utilizados e Condições de Crescimento	40
3.2	Linhagens e plasmídeos	40
3.3	Oligonucleotídeos	41
3.4	Transformação de DH5α por eletroporação	42
3.5	Conjugação	43
3.6	Construção da biblioteca de mutantes	43
3.7	Varredura da biblioteca de mutantes	44
3.7.1	<u>Ensaio de atividade de β-Galactosidase</u>	45
3.7.2	<u>Identificação dos genes interrompidos pelo Tn5 nos mutantes isolados</u>	46
3.7.3	<u>Minipreparação de DNA cromossomal</u>	46
3.7.4	<u>Clonagem do fragmento contendo Tn5 no vetor pBC KS</u>	47
3.7.5	<u>Minipreparação de DNA plasmidial</u>	47
3.7.6	<u>Sequenciamento dos clones positivos</u>	48
3.8	Ensaio de expressão do gene <i>cspD</i> em diferentes meios	50
3.9	Construção do mutante nulo $\Delta spoT$	51
3.9.1	<u>Amplificação dos fragmentos para construção do mutante</u>	51
3.9.2	<u>Clonagem das regiões flanqueadoras do gene <i>spoT</i> deletado no plasmídeo pNPTS138</u>	52
3.9.3	<u>Obtenção da linhagem recombinante de <i>Caulobacter crescentus</i></u>	52
3.10	Construção do plasmídeo pCA1	53
3.11	Complementação e vetores de expressão	54
3.12	Construção da linhagem mutante <i>C. crescentus</i> $\Delta spoT \Delta spdR$	55
3.13	Expressão de SpdR e SpdS	56

3.14	Fosforilação <i>in vitro</i>	56
3.15	Ensaio de mobilidade em gel (EMSA)	56
3.16	Ensaio de “ <i>DNase I Footprinting</i> ”	57
3.17	Construção do plasmídeo pCA50	57
3.18	<i>Western Blot</i>	58
3.19	Construção do mutante nulo Δ <i>spdR</i>	59
3.20	Teste de viabilidade e curva de crescimento	60
3.21	Ensaio de sensibilidade a H ₂ O ₂	61
3.22	Ensaio de Microscopia	61
3.23	Análise <i>in silico</i> de prováveis sítios de ligação da proteína SpdR	62
3.24	Extração de RNA total	62
3.25	RT-PCR semi-quantitativo	62
4	RESULTADOS	64
4.1	Varredura da primeira biblioteca de mutantes	64
4.2	Identificação do sítio de inserção do transposon Tn5	65
4.3	Construção e varredura de nova biblioteca de mutantes por inserção do transposon Tn5	70
4.4	Estudo da expressão do gene <i>cspD</i> em carência de glicose ou nitrogênio	74
4.5	Mapeamento da região regulatória do promotor de <i>cspD</i>	76
4.6	Ensaio de expressão de <i>cspD</i> no mutante nulo Δ <i>spoT</i> e em diferentes condições nutricionais	78
4.7	Papel de SpdR e SpdS na ativação da transcrição de <i>cspD</i>	85
4.8	Análise do papel de CspD em <i>C. crescentus</i>	92
4.9	Análise do fenótipo do mutante SP2710 em resposta fase estacionária e a diferentes estresses	99
5	DISCUSSÃO	104
6	CONCLUSÕES	111
	REFERÊNCIAS ¹	112

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Caulobacter crescentus*

Caulobacter crescentus é uma bactéria que cresce em ambientes aquáticos, e é um membro da subdivisão α das proteobactérias. *C. crescentus* é um dos principais sistemas modelo para análise do ciclo celular bacteriano e diferenciação celular, e os mecanismos moleculares envolvidos vêm sendo detalhados extensivamente devido ao seu desenvolvimento dimórfico e estilo de vida (RYAN; SHAPIRO, 2003; MCADAMS; SHAPIRO, 2003; CHRISTEN et al., 2011)

A progressão do ciclo celular de *C. crescentus* requer uma precisa coordenação morfológica e metabólica. Este ciclo começa com uma célula móvel, que possui em um dos polos um flagelo para mobilidade e pili para adesão em superfícies bióticas e abióticas. A célula móvel não pode iniciar a replicação do DNA, e permanece na fase G1 com apenas uma cópia do cromossomo. Após um período definido, a célula móvel se diferencia em uma célula-talo. Durante esta diferenciação, o flagelo é perdido juntamente com os pili, os receptores de aparato sensorial quimiotático são degradados e o crescimento do envelope é redirecionado para originar um talo no mesmo polo antes ocupado pelo flagelo. Coincidentemente com essa transição morfológica, a célula entra na fase S e inicia a replicação do DNA. No polo oposto ao talo inicia-se a montagem de um novo flagelo, de pili e do aparato sensorial quimiotático. Após o término da replicação do DNA, cada compartimento recebe uma cópia do cromossomo, e a seguir a célula se divide assimetricamente originando duas células filhas distintas (CHRISTEN et al., 2011).

A hierarquia do controle do ciclo celular em *C. crescentus* possui um circuito genético cíclico envolvendo quatro reguladores globais (CtrA, GcrA, DnaA, e CcrM), que juntos controlam a expressão de mais de 200 genes (COLLIER; MURRAY; SHAPIRO, 2006; COLLIER; SHAPIRO, 2007; HOLTZENDORFF et al., 2004; HOTTES; SHAPIRO; MCADAMS, 2005; LAUB et al., 2002). As quatro proteínas são sintetizadas em sucessão para impulsionar uma série de funções modulares, que desta maneira executam o ciclo celular (perda do flagelo, replicação e metilação do cromossomo, divisão da célula, etc.). A estabilidade destas proteínas é ativamente controlada durante todo o ciclo celular. Os mecanismos moleculares que controlam a proteólise de CtrA foram caracterizados recentemente, já os controles de proteólise de GcrA e DnaA são desconhecidos (BIONDI et al., 2006; INIESTA et al., 2006; MCGRATH et al., 2006).

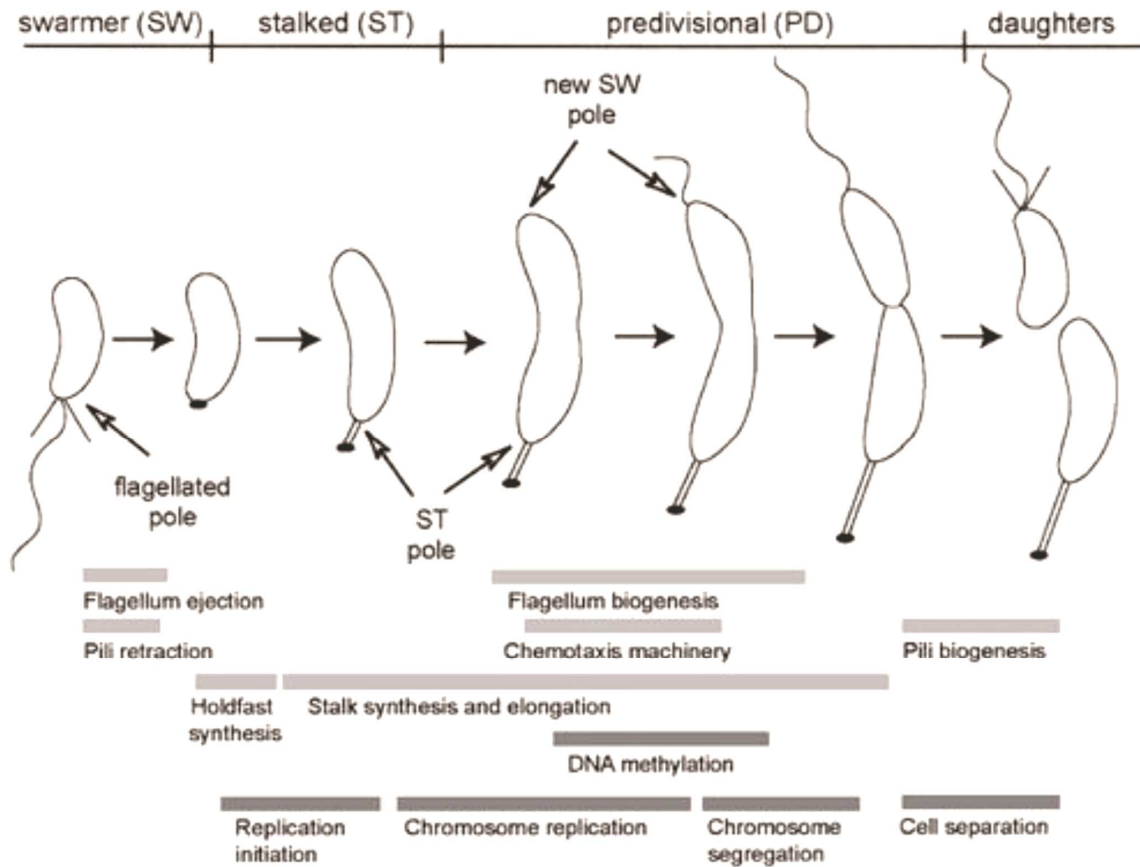
INTRODUÇÃO

Um dos reguladores globais do ciclo celular de *C. crescentus*, CtrA, é um regulador de resposta membro de um sistema de dois componentes. CtrA está presente em altas concentrações nas células móveis, onde se liga na origem de replicação (Cori) para silenciar o início da replicação do DNA, e também exerce um controle negativo sobre a expressão de GcrA. Desta maneira CtrA regula a expressão de genes que atuam na divisão celular e de genes que codificam subunidades do filamento dos pili e flagelo (QUON; MARCZYNSKI; SHAPIRO, 1996).

A proteólise de CtrA se dá no momento de formação da célula-talo, tanto na separação celular como durante a transição de célula móvel para célula-talo, assim a origem de replicação deixa de ser inibida (INIESTA et al., 2006; MCGRATH et al., 2006). Neste ponto do ciclo celular, inicia a síntese de DnaA, proteína que inicia a replicação do DNA, juntamente com a formação do replissoma e ativação da transcrição de uma grande quantidade de genes, inclusive de *gcrA* (COLLIER; MURRAY; SHAPIRO, 2006; HOTTES; SHAPIRO; MCADAMS, 2005). GcrA é sintetizado na célula-talo e também está presente na célula pré-divisional. GcrA regula a expressão de fatores de replicação e de genes envolvidos na morfogênese polar e é responsável pela elongação da replicação do DNA (HOLTZENDORFF et al., 2004). A proteína CcrM é sintetizada em um pequeno intervalo de tempo perto do final da replicação do DNA e é a proteína responsável pela remetilação do genoma, sendo inativada logo após realizar a sua função (BERDIS et al., 1998).

INTRODUÇÃO

Figura 1 - Ciclo celular de *C. crescentus*.



O esquema mostra a progressão do ciclo celular da bactéria *C. crescentus*

FONTE: <http://microbewiki.kenyon.edu>.

Para entender a progressão do ciclo celular espacialmente e temporalmente em *Caulobacter*, várias ferramentas moleculares estão sendo utilizadas. A conclusão da caracterização do genoma permitiu o desenvolvimento e uso de microarranjos de DNA para estudar os padrões globais de expressão gênica durante o ciclo celular de *C. crescentus* (LAUB, et al., 2000; LAUB et al., 2002). No primeiro estudo de análise global de expressão gênica, microarranjos de DNA foram usados para analisar mudanças no perfil de expressão durante o ciclo celular. As células de *C. crescentus* foram sincronizadas na fase G1 (células móveis) para iniciar o ciclo e a partir deste momento foram coletados RNAs a cada 15 minutos e analisados por microarranjos de DNA. O perfil de expressão revelou um conjunto de 553 genes (mais de 15% do genoma), que são transcritos durante o ciclo de forma independente (LAUB et al., 2000).

A classificação funcional dos genes regulados durante o ciclo mostrou que a expressão de grupos de genes acontece com extraordinária precisão, sendo que estes genes cujos produtos estão envolvidos em eventos específicos têm um pico de expressão imediatamente

INTRODUÇÃO

antes, ou durante o evento. Por exemplo, a transcrição dos genes que estão envolvidos no metabolismo e replicação do DNA, atingem um nível máximo da transcrição na transição da fase G1 para fase S, enquanto que a transcrição dos genes que estão envolvidos na segregação cromossômica é alta no final da fase S. Esta transcrição temporal se aplica a quase todos os genes envolvidos no ciclo celular. (SKERKER; LAUB, 2004).

C. crescentus CB15 possui um genoma de 4.016.642 pares de bases em um único cromossomo circular, codificando 3.767 genes e foi a primeira Proteobactéria da subdivisão α de vida livre a ter o seu genoma sequenciado (NIERMAN et al., 2001). De fato, muitos mecanismos descobertos em *C. crescentus* são evolutivamente conservados entre outros membros da subdivisão α das proteobactérias (SKERKER; LAUB, 2004). A análise do genoma de *C. crescentus* revelou um grande número de proteínas sinalizadoras (105), múltiplas cópias de *clusters* de genes contendo proteínas essenciais para sobrevivência em ambientes pobres em nutrientes, proteínas para degradação de anéis aromáticos, genes de quimiotaxia, fatores sigmas de funções extracitoplasmática (ECF) e uma grande quantidade de proteínas de membrana (NIERMAN et al., 2001).

1.2 Proteínas de Choque Frio

Temperatura é um dos fatores mais críticos para o crescimento bacteriano, pois pode causar severos danos à célula, afetando diretamente a estrutura celular, e desta maneira causando alterações nas propriedades e componentes funcionais das células. O estudo da resposta ao choque frio e a adaptação celular a este tipo de estresse é importante para entendermos como os microorganismos são capazes de viver em baixas temperaturas (BAYLES; ANNOUS; POTIER, 1996; PHADTARE; YAMANAKA; INOUE, 2000).

Após um aumento brusco na temperatura, a bactéria responde expressando um conjunto de genes, onde são expressas chaperones e proteases que são designadas principalmente para enfrentar alterações na conformação das proteínas por desnaturação ou dobramento incorreto. Estas proteínas são controladas por um fator sigma alternativo (σ^{32}), que age como um regulador global que direciona a RNA polimerase para transcrever promotores de choque de calor. Da mesma maneira, bactérias em choque frio transcrevem um conjunto de genes específicos, codificando helicases, nucleases e proteínas associadas ao ribossomo, que diretamente ou indiretamente interagem com RNA ou DNA. Diferentemente do choque de calor, até o momento não se conhece um fator sigma específico de choque frio (WEBER; MARAHIEL, 2003).

INTRODUÇÃO

Em *E. coli*, a resposta a choque frio é exercida quando uma cultura cresce exponencialmente a 37 °C e essa temperatura cai bruscamente para 15 °C. Após essa queda de temperatura, há um período denominado fase de aclimação, em que a maior parte da síntese proteica é inibida, com exceção de um grupo específico de proteínas, denominadas proteínas de choque frio. Proteínas de choque frio ajudam as células a combater diferentes alterações celulares prejudiciais causadas pela queda brusca na temperatura. Após a indução dessas proteínas, o crescimento celular é reestabelecido com a restauração da síntese normal de proteínas e diminuição na taxa de síntese de proteínas de choque frio. Algumas das proteínas induzidas em choque frio são: chaperonas de RNA, como CspA e seus homólogos (GOLDSTEIN; POLLITT; INOUE, 1990), CspB (LEE et al., 1994), CspG (NAKASHIMA et al., 1996) e CspI (WANG; YAMANAKA; INOUE., 1999), a RNA helicase CsdA (TOONE; RUDD; FRIESEN, 1991), DNA girase (JONES et al., 1992), histona H-NS (DERSCH; KNEIP; BREMER, 1994) fator de iniciação IF2, (GUALERZI; PON, 1990), fator de transcrição NusA, (FRIEDMAN et al., 1984), polinucleotídeo fosforilase (DONOVAN, KUSHNER, 1986), fatores ribossomais RbfA e RecA (DAMMEL; NOLLER, 1995; WALKER, 1984).

A resposta a baixa temperatura envolve uma mudança na composição da membrana lipídica da célula, com um aumento na proporção de ácidos graxos insaturados, que acontece para manter a fluidez da membrana em baixas temperaturas (SINENSKY, 1974). Os ribossomos também são adaptados a essa queda de temperatura para traduzir mRNAs específicos de choque frio pela incorporação de fatores ribossomais, que mudam suas propriedades funcionais, desta maneira possibilitando a tradução de mRNAs que não são de choque frio (JONES; INOUE, 1996). A estrutura e a topologia do DNA cromossomal também é afetada, e esse efeito do frio envolve a indução de proteínas que estão associadas ao nucleóide, como a proteína H-NS (DERSCH; KNEIP; BREMER, 1994).

O efeito mais drástico causado pela queda brusca de temperatura em bactérias é a estabilização de estruturas secundárias de ácidos nucleicos, em especial mRNAs, pois estas impedem a ligação do ribossomo ao sítio específico, assim impossibilitando a tradução. Do mesmo modo, se houver formação de estrutura secundária no meio do mRNA, pode-se impedir a elongação do peptídeo nascente (GOLDSTEIN; POLLITT; INOUE, 1990).

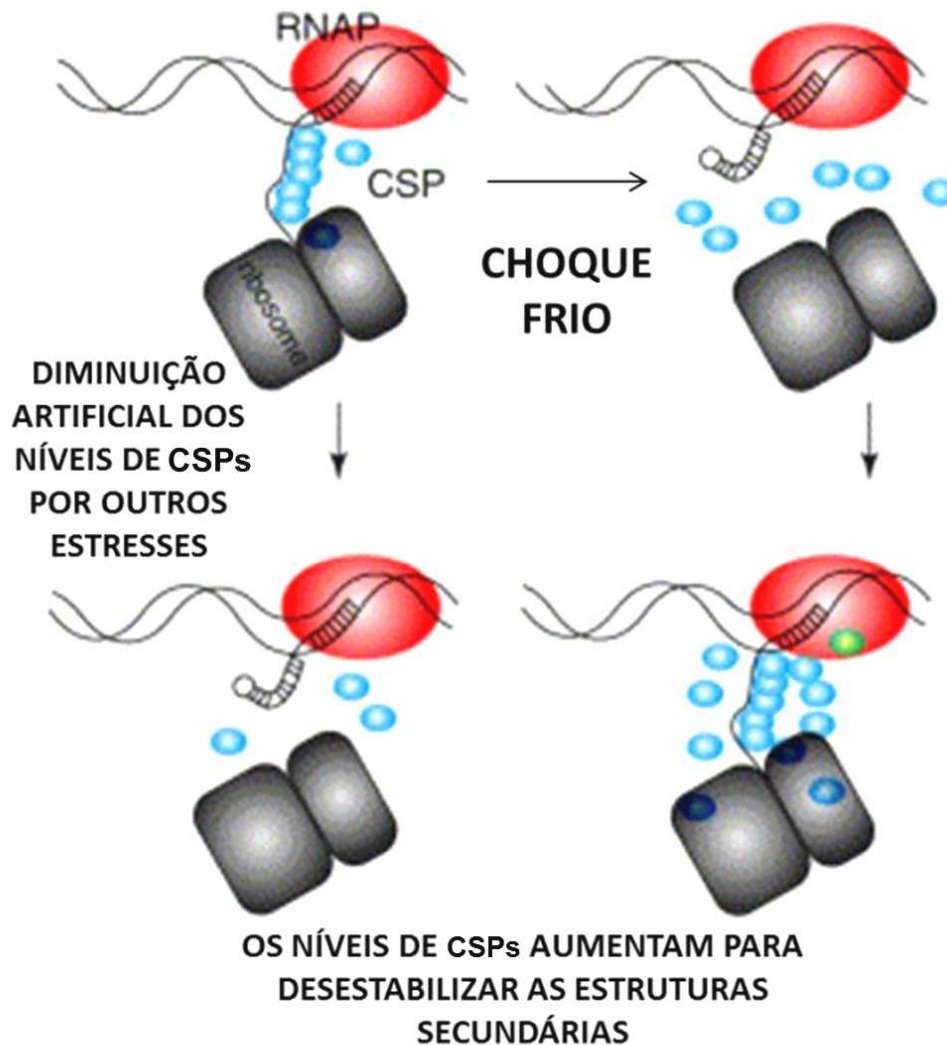
A primeira proteína de choque frio descrita foi CspA de *E. coli* (GOLDSTEIN; POLLITT; INOUE, 1990), uma chaperone de RNA que ajuda a desestabilizar estruturas secundárias de mRNA, desta maneira deixando livre o sítio de ligação ao ribossomo para que a tradução possa acontecer (Figura 2) (JIANG; HOU; INOUE, 1997). Ortólogos de CspA

INTRODUÇÃO

não foram achados no genoma de arqueas, e entre as eubactérias elas estão presentes na maioria das proteobactérias, mas não em espiroquetas e cianobactérias, sendo que estas últimas possuem proteínas induzidas em choque frio que possuem o domínio de ligação ao RNA similares os encontrados em eucariotos (SATO, 1995). O papel de CspA é aumentar a tradução de mRNAs e torna-los mais suscetíveis à degradação por RNase, e além disso, CspA também possui propriedades de ativador transcricional (BRANDI et al., 1996, JIANG; HOU; INOUE, 1997, BRANDI; PON; GUALERZI, 1994, GRAUMANN; MARAHIEL, 1998). CspA é uma das proteínas mais abundantes no início da fase de exponencial, e sua expressão é significativamente aumentada durante o choque frio, onde os níveis alcançam 2% do total de proteínas sintetizadas durante o estresse (BRANDI et al. 1999). *E. coli* possui 8 proteínas homólogas a CspA (CspB a CspI), e foi mostrado que CspA, CspE e CspC são antiterminadores transcricionais (BAE et al., 2000) e CspD uma proteína inibidora de replicação de DNA (YAMANAKA et al., 2001).

INTRODUÇÃO

Figura 2 - Modelo do funcionamento das proteínas de choque frio.



As proteínas de choque frio atuam como chaperones de RNA. Durante o crescimento a 37 °C, CSPs se ligam ao RNA nascente, mantendo-o linearizado. Os ribossomos deslocam essas proteínas, que se ligam com baixa afinidade ao RNA, e inicia a tradução. Após o choque frio, há um aumento na concentração de CSPs com a finalidade de desestabilizar estruturas secundárias no mRNA .

FONTE: Modificado de Graumann e Marahiel (1998).

Estas pequenas proteínas de eubactérias possuem um domínio conservado chamado “cold shock domain” (CSD) que é composto por dois motivos de ligação a ácido nucléico RNP-1 e RNP-2, que se ligam exclusivamente a DNA fita simples ou RNA (SCHRODER et al., 1995). O domínio de choque frio também foi achado em proteínas de eucariotos, envolvidas no acoplamento da transcrição e tradução de mRNAs específicos e em alguns casos agindo como fatores de transcrição (BOUVET; WOLFFE, 1994; WOLFFE, 1999).

As bactérias possuem em geral várias cópias de genes *csp* nos seus genomas, apresentando uma grande variação de expressão. *E. coli* possui nove genes *csp*, sendo que as

INTRODUÇÃO

proteínas CspA, CspB, CspG e CspI são induzidas no choque frio, CspC e CspE são expressas constitutivamente, CspD é induzida durante a fase estacionária e carência de nutrientes e CspF e CspH ainda não foram caracterizadas (YAMANAKA et al., 1994; YAMANAKA, INOUE, 1997; YAMANAKA; FANG; INOUE, 1998). *Bacillus subtilis* possui três proteínas de choque frio (CspB, CspC, CspD) que são induzidas no frio, sendo que CspB e CspC também são induzidas na fase estacionária (WEBER; MARAHIEL, 2002). *Lactobacillus plantarum* também possui três genes *csp* mas somente *cspL* é altamente induzido em choque frio e fase estacionária, *cspP* e *cspC* são expressos constitutivamente (DERZELLE et al., 2000).

A bactéria gram-positiva *Listeria monocytogenes* também possui três CSPs (CspA, CspB e CspD). Estudos com mutantes simples, duplo e triplo foram feitos para definir o papel destas proteínas na célula em relação a estresses como frio e estresse osmótico. A hierarquia de importância funcional difere dependendo da condição de crescimento. Em choque frio CspA é a mais importante, em seguida CspD e depois CspB; já em estresse osmótico CspD é a mais importante em relação a CspA/CspB (SCHMID et al., 2009).

C. crescentus é uma bactéria oligotrófica que é encontrada em amostras de solos úmidos (POINDEXTER, 1981), conseguindo se adaptar em ambientes com baixo teor nutricional. Também foi visto que esta bactéria consegue crescer em águas congeladas (MÄNNISTÖ; PUHAKKA, 2001), indicando que *C. crescentus* é adaptada a crescer em baixa temperatura. O catabolismo e as propriedades genéticas desta bactéria têm sido motivo de estudo para o uso em biorremediação e como biosensores (MÄNNISTÖ et al., 1999; HILLSON et al., 2007).

Segundo Mazzon e colaboradores (2008), células de *C. crescentus* são extremamente resistentes ao congelamento a -80 °C sem adição de crioprotetores e as células permanecem 100% viáveis durante 120 dias nesta temperatura. Foi visto também que a viabilidade aumenta quando *C. crescentus* cresce em baixas temperaturas antes do congelamento a -20 °C, possuindo assim uma capacidade de adquirir criotolerância. Mutações nos genes que codificam DNA e RNA helicases tornam as células de *C. crescentus* mais sensíveis ao congelamento a -80 °C desta maneira corroborando o fato de que o envelhecimento dos ácidos nucleicos durante o choque frio é um dos principais problemas durante o crescimento das células em baixas temperaturas, impedindo a replicação, transcrição e tradução.

A família de genes *csp* de *C. crescentus* foi detalhadamente estudada na resposta a variações de temperatura. Observou-se que *cspA* e *cspB* são ativados em redução de temperaturas de 30 °C para 10 °C, alcançando um alto nível de expressão, mas *cspC* e *cspD*

INTRODUÇÃO

não são induzidos nestas condições. Os genes *cspC* e *cspD*, no entanto, são ativados na fase estacionária, indicando que suas funções biológicas são importantes na adaptação a longos períodos sem crescimento (LANG; MARQUES 2004).

1.3 Fase estacionária

Durante a fase estacionária, a taxa de crescimento diminui como resultado do esgotamento de nutrientes e acúmulo de produtos tóxicos. Nesta fase as bactérias começam a esgotar os recursos que estão disponíveis no meio e a taxa bacteriana de crescimento e morte é constante. Bactérias têm desenvolvido diferentes estratégias para manterem-se viáveis durante longos períodos em fase estacionária. Algumas espécies de bactérias Gram positivas produzem esporos em resposta à carência nutricional; em contraste, muitas bactérias Gram negativas desenvolvem resistência, mas não ficam no estado de dormência. Em ambos os casos, se os nutrientes se tornam disponíveis novamente as células vão retomar o seu crescimento até a exaustão total de nutrientes, entrando novamente na fase estacionária (LLORENS; TORMO; MARTINEZ-GARCIA, 2010).

Em bactérias, a fase estacionária é um dos melhores exemplos de regulação global de genes, onde vários fatores regulatórios se mobilizam para definir novos padrões de expressão gênica. As proteínas sintetizadas pelas células durante a entrada na fase estacionária estão envolvidas principalmente na sua manutenção em longos períodos de carência nutricional (ALBERTSON; NYSTRON; KJELLEBERG, 1990). Assim como existem um grupo de proteínas que são expressas nas primeiras horas da fase estacionária existe outro grupo que diminui e aumenta sua expressão durante muitos dias sob carência nutricional. O total de proteínas sintetizadas é por volta de 20% do observado em crescimento exponencial em meio mínimo, e esta porcentagem decresce para 0,5% após o período de 11 dias em fase estacionária em *E. coli* (ALBERTSON; NYSTRON; KJELLEBERG, 1990; KOLTER; SIEGELE; TORMO, 1993).

Células carentes de nutrientes respondem rapidamente à adição de novos nutrientes. A rapidez do início do processo de recuperação é semelhante ao observado em esporos germinando (FOSTER; JOHNSTONE, 1989). Após o reinício da síntese do RNA e síntese protéica, ocorre aumento na massa celular, no nível de síntese do DNA e no número de células. Depois de certo crescimento, as células perdem o aumento na resistência, adquirido na fase estacionária devido às várias mudanças ambientais (ALBERTSON; NYSTRON; KJELLEBERG, 1990, AMY; PAULING; MORITA, 1983).

INTRODUÇÃO

E. coli pode sobreviver por longos períodos em carência de nutrientes em meio rico aerado (LB) e cessa o seu crescimento devido à limitação de fontes de carbono. Durante os primeiros dias de carência de fontes de carbono, a população perde 90 a 99% de suas células viáveis (ZAMBRANO et al., 1993). Entretanto, a população remanescente pode sobreviver por vários meses neste LB aerado a 37 °C, sem a adição de nova fonte de carbono (FINKEL; KOLTER, 1999). Como as culturas consomem carbono exógeno durante o crescimento exponencial, a biomassa é a fonte de carbono mais provável durante a sobrevivência a prolongados períodos de incubação, a qual fica disponível quando as células morrem. Enquanto a população total de *E. coli* na fase estacionária é considerada estacionada, pois não há um aumento em sua biomassa, existem subpopulações que não estão estacionadas, pois elas são capazes de crescer como subculturas e tomar conta da população (FINKEL et al., 1997; ZAMBRANO; KOLTER, 1993; ZAMBRANO et al., 1993). Estas subpopulações consistem em mutantes que apresentam maior aptidão durante prolongados períodos de incubação. Esta habilidade de crescer durante o período de carência nutricional foi denominado como fenótipo GASP (“growth advantage in stationary phase”) (ZAMBRANO; KOLTER, 1993). Estudos com culturas em carência nutricional por prolongados períodos demonstraram que este fenômeno GASP é contínuo: múltiplas séries que assumem a população ocorrem durante o período de incubação (FINKEL; KOLTER, 1999; ZAMBRANO et al., 1993). À medida que as culturas vão envelhecendo, elas aumentam sua diversidade e várias subpopulações geneticamente distintas coexistem (FINKEL, KOLTER, 1999).

Bactérias Gram negativas, quando estão em privação nutricional, adquirem maior resistência a choque frio, estresse oxidativo e variações osmóticas (KOLTER; SIEGELE; TORMO, 1993). Algumas proteínas induzidas após entrada em fase estacionária podem ser induzidas por estresses específicos como alta osmolaridade, alta temperatura e pH ácido (HENGGE - ARONIS, 1993; NYSTROM, 2004).

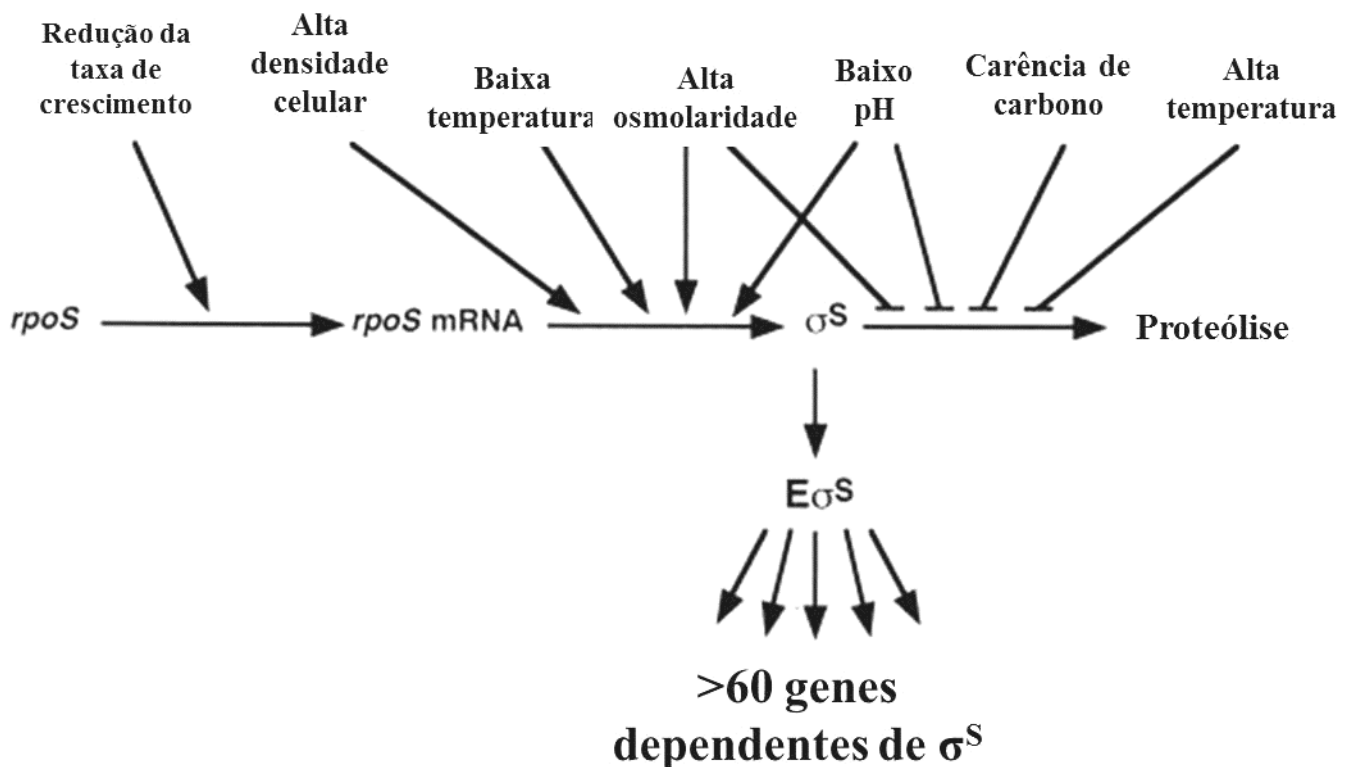
Para garantir a sobrevivência sob condições de mudança, as bactérias desenvolveram cascatas de sinalização para regular a expressão de um grupo diferente de genes, adequando-se a nova situação (CASES; DE LORENZO; OUZOUNIS, 2003). A resposta adaptativa inclui uma série de circuitos genéticos que controlam muitas mudanças metabólicas. Em resposta a estresse o fator σ^S de *E. coli* tem papel de regulador global, controlando mais de 10% todos os genes normalmente expressos em condições de estresses em geral e carência nutricional (carência de carbono, nitrogênio, fosforo ou aminoácidos) (Figura 3) (HENGGE-ARONIS, 2002). Normalmente os genes que pertencem ao regulon de σ^S estão envolvidos

INTRODUÇÃO

com mudanças morfológicas, resistências a estresses secundários, processos metabólicos, virulência e fenótipo GASP (HENGGE-ARONIS, 2002). Em *E. coli*, as proteínas CspC e CspE pertencem à família de proteínas de choque frio, todavia elas são induzidas a 37 °C e não pela queda de temperatura (PHADTARE; YAMANAKA; INOUE, 2000). Foi visto que a superprodução destas duas proteínas estabilizam o mRNA de *rpoS*, desta maneira aumentando os níveis de σ^S , mas até o momento não se sabe se esse efeito é direto ou indireto (PHADTARE; INOUE, 2001). Os fatores sigma de choque de calor e os reguladores de resposta a estresse oxidativo OxyR e SoxRS trabalham em conjunto com σ^S , na expressão de genes específicos de estresses (NYSTRÖM, 2004).

Outros exemplos de reguladores globais em bactérias Gram positivas, é o σ^B , codificado em resposta a estresse geral (PRICE, 2000) e o regulador Spo0A, responsável pelo início da esporulação em *Bacillus subtilis* (SONENSHEIN, 2000).

Figura 3 - Níveis da regulação de σ^S



Os diferentes níveis da regulação de σ^S são afetados por várias condições de estresses. Um aumento dos níveis de σ^S na célula podem ser obtidos através das transcrição de *rpoS* e da tradução do mRNA de *rpoS* ou inibindo a proteólise de σ^S (em condições normais σ^S é rapidamente degradado).

FONTE: Modificado de Hengge-Aronis (2002).

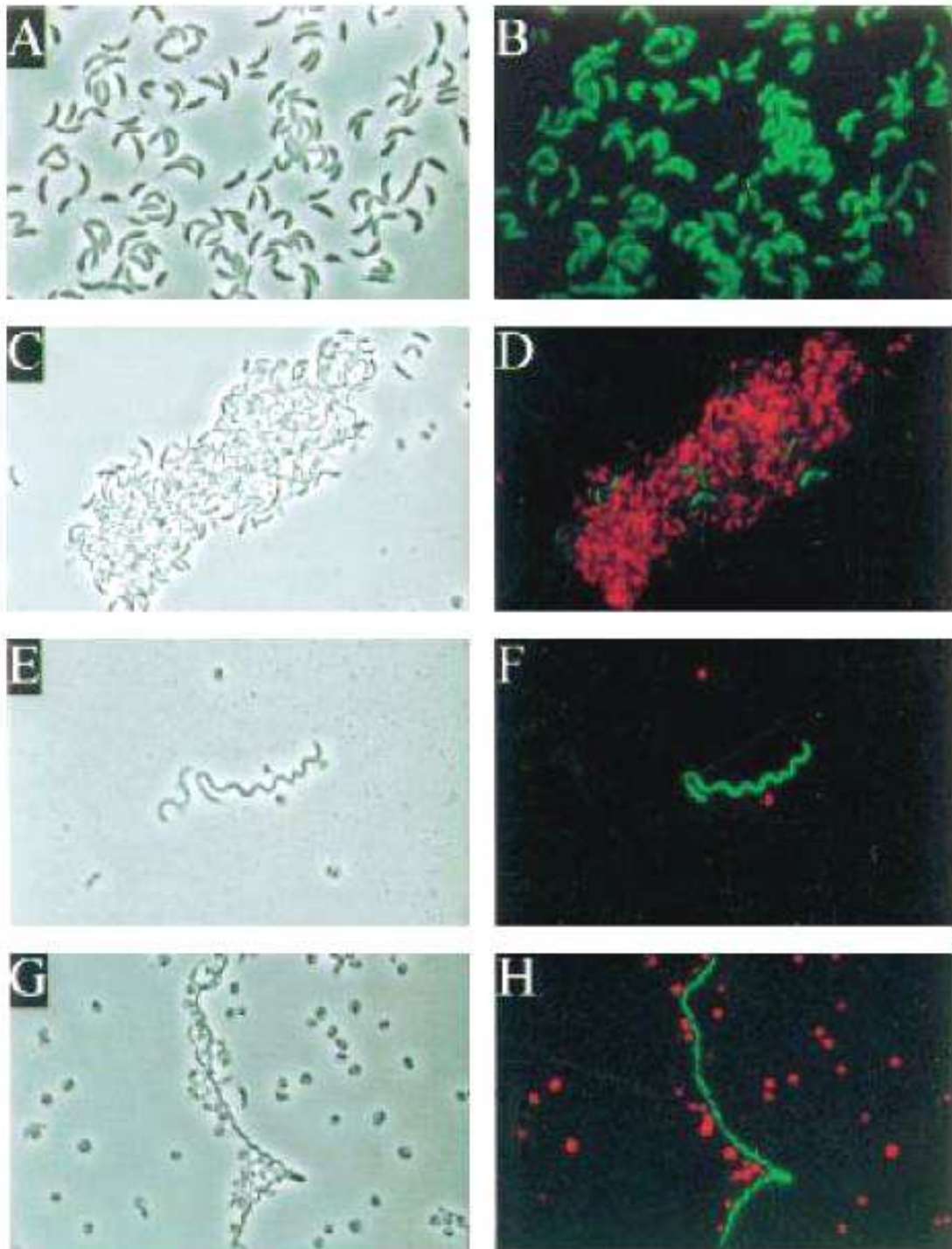
INTRODUÇÃO

As células de *C. crescentus* sofrem mudanças drásticas na morfologia quando cultivadas em fase estacionária por um período muito extenso e aumentam sua resistência a estresses ambientais como: peróxido de hidrogênio, calor, pH alcalino e pH ácido (WORTINGER; QUARDOKUS; BRUN, 1998). Depois que as culturas entram na fase estacionária, a maioria das células fica no estágio pré-divisional. Durante a fase estacionária, as células gradualmente adquirem uma morfologia helicoidal e alongada, com tamanho de 30 μm , e exibem um aumento de resistência a estresses quando comparados com as células que crescem exponencialmente (Figura 4). Quando ressuspendidas em meio fresco, as células helicoidais alongadas dividem-se e retornam ao tamanho e morfologia normais nas primeiras 12 horas (WORTINGER; QUARDOKUS; BRUN, 1998).

Depois de uma diminuição na viabilidade celular observada após os primeiros dias de incubação, há um aumento nesta viabilidade, indicando que as células são capazes de se dividirem. Após 6 a 9 dias de incubação ocorre um novo aumento na viabilidade, provavelmente devido à capacidade das células que sobreviveram de utilizar os nutrientes liberados pelas células que morreram (WORTINGER; QUARDOKUS; BRUN, 1998).

INTRODUÇÃO

Figura 4 - Morfologia e viabilidade de *C. crescentus* na fase estacionária



Morfologia e viabilidade em diferentes estágios durante o crescimento prolongado em meio PYE. A, C, E e G, micrografias de contraste em fase das células em diferentes estágios da cultura. B, D, F e H micrografias fluorescente em ensaio de viabilidade com coloração LIVE-DEAD nos mesmos campos da micrografia de contraste. Células coradas em verde estão vivas e células coradas em vermelho estão mortas. A e B culturas cultivadas durante a noite; C e D culturas cultivadas durante uma semana; E e F culturas cultivadas durante duas semanas; G e H culturas cultivadas durante 4 semanas.

FONTE: Obtido de Wortinger; Quardokus e Brun (1998).

INTRODUÇÃO

A adaptação de *C. crescentus* para sobreviver em condições oligotróficas inclui a habilidade de crescer bem devagar em condições com baixos nutrientes e paralisar a progressão do ciclo celular em carência de carbono e nitrogênio (GORBATYUK; MARCZYNSKI, 2005). *C. crescentus* são equipadas com sensores ambientais, transportadores e vias metabólicas adequadas para explorar baixas concentrações de metabólitos, utilizando material orgânico como fonte de alimento (BLANVILLAIN et al., 2007).

Em *E. coli* e *Bacillus subtilis*, os fatores sigmas RpoS (σ^S) e Sig B (σ^B) são reguladores globais de estresse geral e carência nutricional (LANGE; HENGEE-ARONIS, 1991; VOLKER; MAUL; HECKER, 1999). *C. crescentus* não possui um ortólogo dos genes *rpoS* e *sigB*, o que ocorre em todas as α -proteobactérias (CHIANG; SCHELLHORN, 2010; HECKER; PANE-FARRE; VOLKER, 2007). Entretanto, foi observado que o fator σ^T (fator sigma de função extracitoplasmática) é essencial para as respostas ao estresse osmótico e oxidativo, causados pela entrada na fase estacionária em *C. crescentus*, regulando mais de 40 genes, incluindo σ^U . Desta maneira, σ^T é um importante regulador de resposta ao estresse geral em *C. crescentus* (ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2007).

Em condições normais de crescimento, o fator σ^T é seqüestrado por seu anti-sigma NepR, já em condições distintas (estresse hiperosmótico, exposição ao cromo, crescimento em meio mínimo e durante a entrada de na fase estacionária), o regulador de resposta PhyR é fosforilado por PhyK e liga-se a NepR. Esta ligação libera σ^T , que se associa ao cerne da RNA polimerase e a transcrição de genes dependentes de σ^T ocorre. A maioria destes genes estão envolvidos com a integridade do envelope celular, resposta a estresse e regulação de expressão gênica. Um desses genes codifica o fator sigma ECF σ^U , contribuindo para a expressão de apenas um pequeno subconjunto de genes de resposta a estresse geral (LOURENÇO, KOHLER, GOMES, 2011). É importante salientar que este mecanismo de controle de resposta geral a estresses só foi observado nas α -proteobactérias.

Recentemente foram identificados dois fatores envolvidos na adaptação de *C. crescentus* à carência de carbono: a molécula ppGpp, a qual contribui para a regulação da estabilidade da proteína DnaA e também regula o início da replicação do DNA sob carência de carbono (LESLEY; SHAPIRO, 2008) e o pequeno RNA CrfA que controla a estabilidade dos mRNAs de 27 transcritos (LANDT et al., 2010).

Pequenos RNAs não codificantes (sRNAs) foram identificados como um grupo de moléculas regulatórias que permitem que as bactérias se adaptem ao estresse ambiental (MAJDALANI; VANDERPOOL; GOTTESMAN, 2005, VOGEL et al., 2004). Estas

INTRODUÇÃO

moléculas regulam a expressão hibridizando em sequências alvos de mRNAs nas regiões 5' não traduzidas (5'-UTRs) e ativando ou reprimindo a tradução e/ou estabilidade do mRNA (FROHLICH; VOGEL 2009). Uma busca global por sRNAs no genoma de *C. crescentus* identificou e validou 31 pequenos RNAs, dos quais quatro (tmRNA, 6S RNA, 4.5S, e RNaseP) possuem funções altamente conservadas em um amplo espectro de bactérias. Outros dez sRNAs foram diferencialmente expressos sob várias condições ambientais ou nutricionais, e quatro são controlados durante o ciclo celular de *C. crescentus* (LANDT et al., 2008).

O pequeno RNA CrfA de *C. crescentus* está relacionado com estresse geral e carência de carbono. A expressão deste RNA é rapidamente induzida por carência de carbono e rapidamente reprimida quando a fonte de carbono é reestabelecida, sendo que a superexpressão do mesmo é tóxica para a célula. Através de uma análise por microarranjos de DNA 27 genes mostram-se regulados tanto positivamente como negativamente por CfrA, e desta maneira CfrA atua como um importante regulador em carência de carbono (LANDT et al., 2010).

1.4 Resposta severa

Células de *E. coli* em carência de aminoácidos respondem com uma regulação negativa da biossíntese de rRNA e produção de ribossomos, sendo esta resposta conhecida como resposta severa (SANDS; ROBERTS, 1952; STENT; BRENNER, 1961).

A molécula efetora que modula a resposta severa é um pequeno nucleotídeo, a guanosina tetrafosfato ou ppGpp. Esta molécula é produzida em resposta a diferentes tipos de limitações nutricionais e circunstâncias que causem a parada do crescimento celular (MAGNUSSON; FAREWELL; NYSTRÖM, 2005). Em *E. coli* dois genes são responsáveis pela produção de ppGpp: *relA* e *spoT*. A proteína RelA é associada ao ribossomo e produz ppGpp (inicialmente pppGpp é produzido e depois convertido a ppGpp através de uma reação entre GTP/GDP e ATP), em resposta a um tRNA descarregado no sítio A do ribossomo, durante carência de aminoácidos (CASHEL et al., 1996). SpoT é responsável pela acumulação de ppGpp em resposta a maioria dos estresses e carência nutricional em geral. SpoT é bifuncional: além de responsável pela síntese, também é responsável pela hidrólise de ppGpp. ppGpp se liga nas subunidades β e β' do cerne da RNA polimerase, desestabilizando a ligação da enzima a promotores fortes e assim deixando livre o cerne de RNA polimerase para transcrever genes de estresse (Figura 5) (MAGNUSSON; FAREWELL; NYSTRÖM,

INTRODUÇÃO

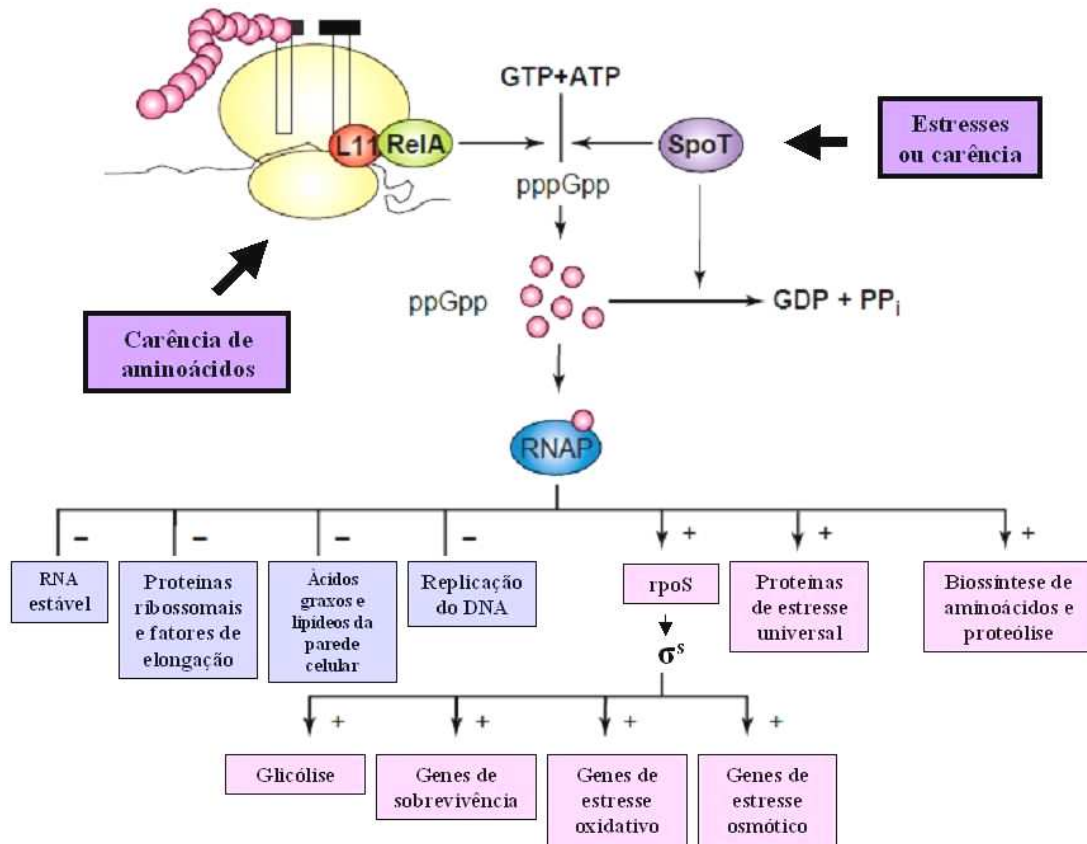
2005; CHATTERJI; FUJITA; ISHIHAMA, 1998; TOULOKHONOV; SHULGINA; HERNANDEZ, 2001; ARTSIMOVITCH et al., 2004; SRIVATSAN; WANG, 2008).

Em alfaproteobactérias como *C. crescentus*, tanto a produção como a hidrólise de ppGpp é realizada somente pelo produto do gene *spoT* (LESLEY; SHAPIRO, 2008). Estudos recentes mostraram que a molécula ppGpp em carência de carbono é responsável pela indução da expressão de uma protease que hidrolisa DnaA (responsável pelo início da replicação do DNA), desta maneira impedindo que células móveis iniciem a replicação do DNA. Assim, em carência de carbono ppGpp regula a estabilidade da proteína DnaA e o início da replicação em *C. crescentus* (LESLEY; SHAPIRO, 2008).

Em *C. crescentus* ppGpp é sintetizado em resposta a carência de glicose e amônia, mas não por carência de fosfato ou aminoácidos. A proteína SpoT de *C. crescentus* é fisicamente associada ao ribossomo e regula positivamente genes relacionados com catabolismo e processos de degradação, desta maneira ativando a quebra de componentes celulares durante a carência nutricional, provavelmente para obtenção de energia (BOUTTE; SEAN, 2011). Notou-se também que os genes relacionados com motilidade e quimiotaxia são em grande parte regulados positivamente por SpoT, implicando desta maneira que a resposta severa em *C. crescentus* aumenta a capacidade da célula para obtenção de fontes nutricionais (BOUTTE; SEAN, 2011). Assim, esta seria uma resposta adaptativa da célula a ambiente oligotróficos (POINDEXTER, 1981), diferentemente de *E. coli*, que quando estão sob carência de aminoácidos, tem os genes de flagelo e quimiotaxia reprimidos (DURFEE et al., 2008; LEMKE; DURFEE; GOURSE, 2009).

INTRODUÇÃO

Figura 5 – Resposta severa



pppGpp é produzido a partir de GTP e ATP por dois caminhos: por resposta a carência e por estresse, e é subsequentemente convertido a ppGpp. ppGpp se liga à RNA polimerase e redireciona a transcrição para genes envolvidos em resistência e sobrevivência a estresse. SpoT também é responsável pela hidrólise de ppGpp.

FONTE: Modificado de Magnusson et al. (2005).

1.5 A Proteína CspD

Uma análise do genoma de *C. crescentus* NA1000 demonstrou a presença de quatro genes que codificam proteínas de choque frio (*cspA*, *cspB*, *cspC*, *cspD*) (NIERMAN, et al. 2001), apresentando um alto grau de similaridade entre si e com CspA de *E. coli*. CspA e CspB possuem um domínio de choque frio (CSD), constituído por dois motivos de ligação ao RNA (RNP-1 e RNP-2), enquanto CspC e CspD possuem dois CSDs (BALHESTEROS, et al. 2010; LANG; MARQUES 2004;. YAMANAKA; FANG; INOUE, 1998).

A proteína CspC possui 18.3 kDa e CspD 21.5 kDa, e apresentam uma duplicação do domínio CSD, que só ocorre em Alfa proteobactérias (BALHESTEROS et al., 2010; LANG; MARQUES 2004). Apesar do fato de ambas as proteínas apresentarem dois domínios CSDs, suas estruturas primárias são bem diferentes, com poucas sequências de aminoácidos

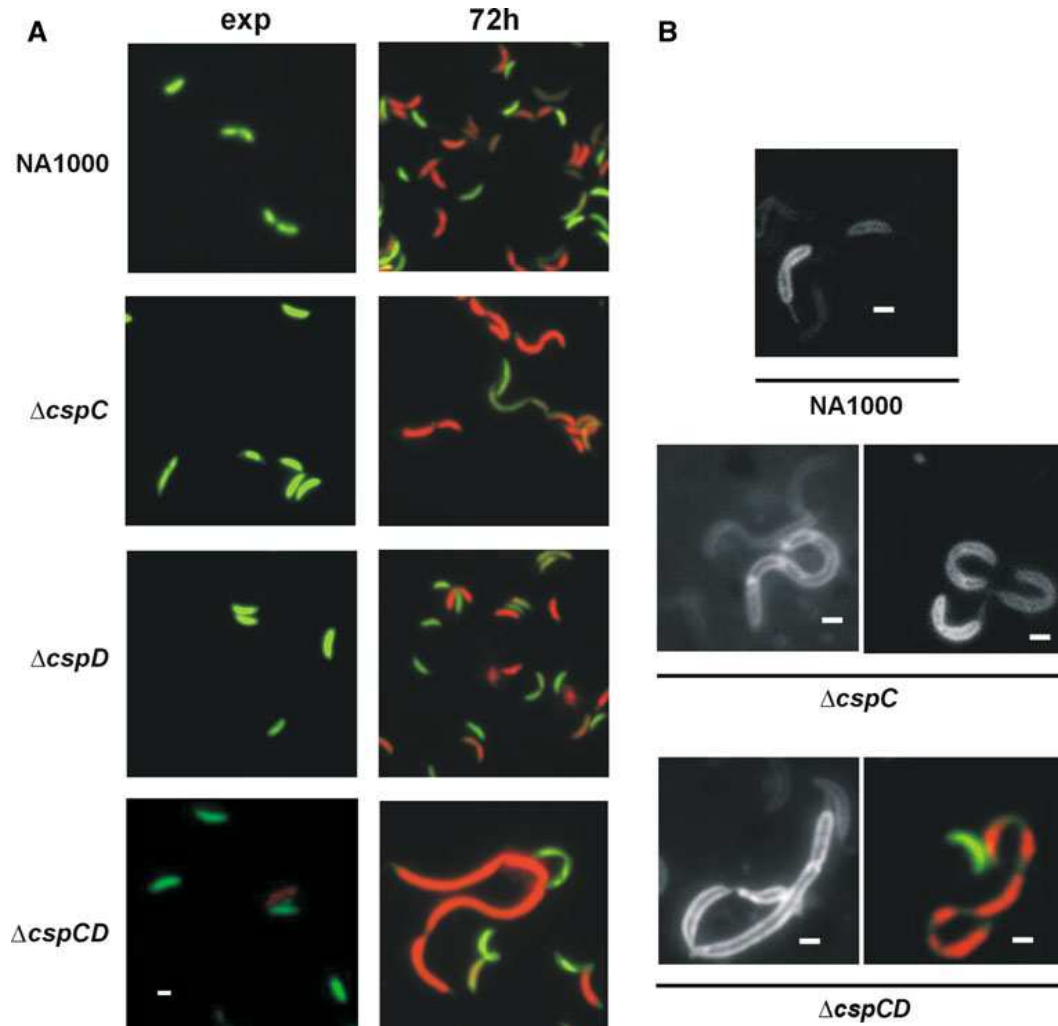
INTRODUÇÃO

similares fora da região de ligação ao RNA (RNP), sugerindo que possuem funções diferentes.

O estudo de linhagens mutantes demonstrou que os genes *cspA* e *cspD* não são essenciais a 30 °C, e embora o gene *cspD* de *C. crescentus* seja induzido na fase estacionária, ele não é essencial para a viabilidade celular. O mutante duplo *cspA/cspD* é mais sensível a frio que o mutante *cspA*, sugerindo que *cspD* também possa auxiliar na resposta a este estresse (LANG; MARQUES, 2004). Já as análises dos fenótipos dos mutantes nulos de *cspC*, *cspD* e do duplo *cspCD*, mostraram que há uma queda brusca da viabilidade dos mutantes *cspC* e *cspCD*, quando entram na fase estacionária (BALHESTEROS, et al., 2010) (Figura 6A). A morfologia celular do mutante *cspC* também é muito afetada na fase estacionária e este fenótipo é mais forte quando os dois genes são deletados, sugerindo que pode ocorrer um possível efeito compensatório pela presença do gene *cspD*, que também é induzido em fase estacionária (BALHESTEROS et al., 2010) (Figura 6B).

INTRODUÇÃO

Figura 6 - Morfologia e viabilidade $\Delta cspC$, $\Delta cspD$ e $\Delta cspCD$ na fase estacionária.



(A) Culturas das linhagens NA1000, $\Delta cspC$, $\Delta cspD$ e $\Delta cspCD$ foram cultivadas em meio PYE a 30 °C durante 72 h. A viabilidade celular foi medida por microscopia de fluorescência. As células em verde são células viáveis e em vermelho as células não viáveis. (B) Morfologia celular das linhagens NA1000, $\Delta cspC$ e $\Delta cspCD$. As culturas foram cultivadas em meio PYE a 30 °C durante 72 h, a morfologia celular foi analisada por microscopia.
 FONTE: Balhesteros et al.(2010).

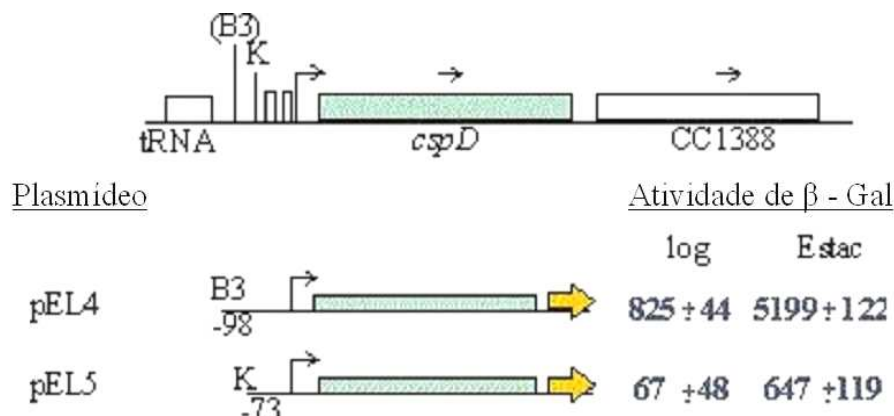
Os inícios de transcrição dos genes *cspC* e *cspD* foram determinados por ensaios de extensão de oligonucleotídeos. As regiões -35 (TTGACGG) e -10 (GCGAGAAC) do promotor de *cspD* seguem o consenso proposto para regiões promotoras de genes “housekeeping” de *C. crescentus* cujas sequências são TTGaCgs para a região -35 e GCtANAWC, para a região -10 (Figura 7). Foi visto também que as regiões 5’ não traduzidas dos genes *cspC* e *cspD* são menores (*cspC*, 64 nucleotídeos, e *cspD*, 45 nucleotídeos) em comparação aos genes induzidos pelo frio, (*cspA* 127 nucleotídeos *cspB*, 143, nucleotídeos respectivamente) (LANG; MARQUES, 2004).

INTRODUÇÃO

Os níveis de CspD em *E. coli* são regulados por proteólise. A proteólise de proteínas contendo o domínio de choque frio não é incomum: a proteólise de CspC de *E. coli* é dependente de temperatura, por uma protease até o momento desconhecida, e os níveis de CspC diminuem sob choque térmico, diminuindo a estabilidade de mRNAs de genes de choque térmico (SHENHAR et al., 2009). A concentração da proteína CspD de *Bacillus subtilis* também é ajustada por proteólise (GERTH et al., 2008). Através de ensaios *in vivo* e *in vitro* foi comprovado que em *E. coli* CspD é substrato da protease Lon, e sua degradação é coordenada em resposta à taxa e à fase de crescimento; a proteólise é lenta quando as células estão em fase estacionária, tornando CspD disponível no momento necessário, e é degradada rapidamente quando a cultura está na fase logarítmica, onde a inibição da replicação do DNA não é apropriada (LANGKLOTZ; NARBERHAUS, 2011).

Em *C. crescentus* o gene *cspD* é regulado em nível transcricional, uma vez que a presença de uma região regulatória é necessária para os máximos níveis de expressão (Figura 8). A região regulatória do gene *cspD* foi analisada pela fusão transcricional ao gene *lacZ* em um plasmídeo repórter, de diversos fragmentos da região promotora. A análise da região promotora mostrou que o fragmento compreendendo a região regulatória (pEL4) exibe os valores máximos de atividade de β -Galactosidase na fase estacionária (≈ 5000 unidades Miller). Entretanto a atividade de pEL5, que não possui a região ativadora, foi muito menor (≈ 640 unidades Miller) que pEL4, embora a região promotora esteja presente nessa construção (LANG; MARQUES, 2004).

Figura 8 - Mapeamento da região promotora do gene *cspD*.



A seta curva indica o início de transcrição e em amarelo o gene *lacZ*. Os plasmídeos carregando as construções foram introduzidos na linhagem NA1000 de *C. crescentus* e a atividade promotora foi medida por ensaios de β -galactosidase na fase exponencial (log) e fase estacionária de crescimento (estac). Os resultados estão apresentados em unidades Miller.

FONTE: Modificado de Lang e Marques (2004).

INTRODUÇÃO

A regulação do gene *cspD* e os sistemas de regulação gênica da fase estacionária ainda não são bem conhecidos. A ausência de um fator sigma ortólogo a sigma S de *E. coli* em *C. crescentus* e a presença de uma região regulatória a montante do promotor sugerem que vários fatores estão regulando sua expressão. Como o gene *cspD* de *C. crescentus* é induzido na fase estacionária, e ppGpp exerce uma regulação positiva sobre genes importantes para esta fase, é interessante verificar se esta molécula atua regulando a expressão de *cspD*.

OBJETIVOS

2 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho é identificar os sinais celulares e os fatores de transcrição que regulam a expressão do gene *cspD* de *C. crescentus*. As estratégias utilizadas para alcançar os objetivos propostos foram:

- a) Varredura de uma biblioteca de mutantes para identificar genes envolvidos na regulação de *cspD*;
- b) Avaliação da expressão de *cspD* sob diferentes condições nutricionais;
- c) Construção de um mutante nulo $\Delta spoT$, e avaliação do papel de ppGpp na expressão de *cspD*;
- d) Mapeamento mais detalhado da região promotora de *cspD*;
- e) Estudo do papel do gene CC0247 sobre a expressão do gene *cspD* na fase estacionária;
- f) Caracterização do papel da proteína CspD em *Caulobacter crescentus*.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Meios Utilizados e Condições de Crescimento

As linhagens de *E. coli* cresceram em temperatura de 37 °C, em meio LB. Quando necessário, os meios foram suplementados com o antibiótico ampicilina 100 µg/mL, canamicina 50 µg/mL, tetraciclina 12,5 µg/mL ou cloranfenicol 50 µg/mL.

As linhagens de *C. crescentus* NA1000 (EVINGER; AGABIAN, 1977) e derivadas foram cultivadas a 30 °C em meio rico PYE (peptona 2 g/l; extrato de levedura 1g/l; MgSO₄ 0,2 g/l; CaCl₂ 0,5 mM) ou meio mínimo M2 (Na₂PO₄ 0,5 g/l; KH₂PO₄ 1,74 g/l; NH₄Cl 1,06 g/l; pH 6,9; Fe₂SO₄ 1 mM; glicose 0,2%; MgSO₄ 1 mM; CaCl₂ 0,5 mM) (ELY, 1991) contendo ou não glicose, NH₄Cl ou peptona 0,2% (ver Tabela 4). Quando necessário, foram suplementados com canamicina 5 µg/mL, tetraciclina 1 µg/mL, ou ácido nalidíxico 20 µg/mL ou cloranfenicol 50 µg/mL. Os meios para placas continham 1,5% de Agar

3.2 Linhagens e plasmídeos

As linhagens de *Caulobacter crescentus* e *Escherichia coli* e os plasmídeos utilizados no trabalho estão listados nas Tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 - Linhagens utilizadas.

	Linhagens	Genótipo e/ou Fenótipo	Referência
<i>Caulobacter crescentus</i>	NA1000	Linhagem sincronizável utilizada como padrão	EVINGER; AGABIAN, 1977
	SP2528	NA1000 (CC2528::Tn5)	Este trabalho
	SP3167	NA1000 (CC3167::Tn5)	Este trabalho
	SP2587	NA1000 (CC2587::Tn5)	Este trabalho
	SP2027	NA1000 (CC2027::Tn5)	Este trabalho
	SP0247	NA1000 (<i>spdR</i> ::Tn5)	Este trabalho
	SP2103	NA1000 (CC2103::Tn5)	Este trabalho
	SP0200	NA1000 (Δ <i>spoT</i>)	Este trabalho
	SP2710	NA1000 (Δ <i>spdR</i>)	Este trabalho
	SP0210	NA1000 (Δ <i>spoT</i> Δ <i>spdR</i>)	Este trabalho
<i>Escherichia coli</i>	DH5 α	<i>supE44 lacU169</i> (80 <i>lacZ</i> M15) <i>hsdR</i> 17 <i>recA</i> 1 <i>endA</i> 11 <i>gyrA</i> 96 <i>thi-1</i> <i>relA</i> 1	HANAHAN, 1983
	S17-1	294::RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)	SIMON;PRIEFER; PÜHLER; 1983

MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 2 - Plasmídeos utilizados

	Descrição	Referência
pEL4	Vetor de fusão de transcrição pRKlacZ290 contendo a região promotora e a região ativadora do gene <i>cspD</i>	LANG; MARQUES, 2004
pEL5	Vetor de fusão de transcrição pRKlacZ290 contendo a região promotora do gene <i>cspD</i> mas sem a região ativadora	LANG; MARQUES, 2004
pCA1	Vetor de fusão de transcrição pRKlacZ290 contendo somente a região promotora (a partir do -35) do gene <i>cspD</i>	Este trabalho
pBC KS	Vetor de clonagem, replicon ColE1, Cl ^r	Stratagene
pGEM-T Easy	Vetor de clonagem, Ap ^r	Promega
pNPTS138	Replicon ColE1, oriT, <i>npt</i> (Km ^r) <i>sacB</i> , derivado do pNPTS129	D. Alley
pSUP2021	Plasmídeo contendo o transposon Tn5	SIMON; PRIEFER; PÜHLER; 1983
pRKlacZ290	Vetor de fusão de transcrição lacZ, TC ^r , replicon IncP1, oriT	GOBER; SHAPIRO, 1992
pCA38	pUJ142 contendo o gene <i>spoT</i>	Este trabalho
pCA39	pUJ142 contendo o gene <i>spdR</i>	Este trabalho
pCA40	pUJ142 contendo o gene <i>spdR</i> (D64A)	Este trabalho
pCA401	pPROEX-HTa contendo o gene <i>spdR</i> (D64A)	Este trabalho
pPROEX-HTa	Vetor de expressão, (amp ^R)	Invitrogen
pUJ142	Vetor utilizado para as complementações contendo promotor induzido por xilose, (chlor ^R)	MASCARENHAS; WEBER; GRAUMANN, 2001
Trx-His CC0247	Vetor de expressão com a região codificante do gene <i>spdR</i>	SKERKER, et al. 2005
Trx-His CC0248	Vetor de expressão com a região codificante do gene <i>spdS</i>	SKERKER et al., 2005
Cosmid1G4	pLAFR5 contendo nt 1710345-1739376 do genoma de <i>C. crescentus</i>	ALLEY et al., 1991
pCA50	pUJ142 contendo o gene <i>cspD</i>	Este trabalho

3.3 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados nesta etapa do trabalho estão listados na Tabela 3.

MATERIAIS E MÉTODOS**Tabela 3** - Oligonucleotídeos utilizados

Nome	Sequência (5' → 3')*
M13 Forward (-20)	GTAAAACGACGGCCAG
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
R3	ATGTGACCTCCTAACATGGT
L7	CCATCTCATCAGAGGGTAGT
CAP-2	<u>GGATCC</u> GCATTGACGGCTCTCCTCAC
CSPD-B	ATAGAATTCTGGTGACGATCTCGACC
LacZup	TGACGGCTACCATCA
CSPD-E	AAACTGCAGATTCGTCCCGAGATGATTCC
RELA-1	<u>GGGGCCC</u> GCGTATCTGAACG
RELA-2	<u>GGGATCC</u> GCTTCGGTCACAGCGGACG
RELA-3	<u>GGGATCC</u> CAAGCACCTGACCAACATC
RELA-4	CCCTGCGGCGCGGAATTCGTCG
RELA-5	GAGGCCTTGTTGGAAGCCGCC
CSP2-A	ATTGGATCCATATAACGGCTATGTTCC
CAROL-1	AAGCTTCAAATTCGTAACCAGACATCCC
REG-1	CGAATTCATGGCGGATATCGGAGAACT
REG-2	CTTCGAAGCGAGGGAGCAACTTAAAGC
RR-1	CGGGCCCCCAACTCCAATCTGCTGTGG
RR-2	TGGATCCTCCGCCATAAAAGTCAGCGC
RR-3	CGGATCCAGAAGCGTTTAAAGTTGCTCCCTC
RR-4	AGAATTCGTTTGAATTATAATCGGGAGGA
MutDA1	CATGCTGTTCTGGCCATGCGGCTGGAG
MutDA2	CTCCAGCCGCATGGCCAGAACAGCATG
CSPD-R1	AAAGAATTCATGTCTGGTTACGATTTTGAGG
CSPD-R2	AAAAGCTCGCCTGTGGATCATCACTTCG
RT-2A	TGGTTACGATTTTGAGGACG
RT-2B	GTTGAACCATTTCACCTTGG

- Nucleotídeos sublinhados indicam sítios de restrição incorporados aos oligonucleotídeos.

3.4 Transformação de DH5 α por eletroporação

Células competentes foram preparadas a partir de uma cultura de 500 ml de DH5 α . Esta cultura foi incubada a 37 °C até atingir uma D.O. _{600 nm} de 0,5 - 0,6, sendo resfriada em banho com de H₂O com gelo por 15 minutos, transferida para tubos de centrifuga pré-resfriados e centrifugada a 4 °C por 10 minutos a 5000 x g. O meio de cultura foi desprezado e as células ressuspensas em 100 ml de H₂O MilliQ estéril gelada, centrifugando-se a 4 °C por 40 minutos a 5000 x g. Desprezado o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 40 ml de H₂O, e centrifugadas a 4 °C por 10 minutos a 5000 x g. As células foram ressuspensas em 5 ml de glicerol 10% gelado, centrifugadas a 4 °C por 10 minutos a 5000 x g e ressuspensas em 500 μ l de glicerol 10% gelado. As células foram distribuídas em tubos Eppendorf (alíquotas de 40 μ l), congeladas em gelo seco e guardadas a -70 °C.

MATERIAIS E MÉTODOS

Na transformação foram utilizados 40 µl de *E. coli* DH5α e 1 µl da reação de ligação. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação gelada e então, as células foram eletroporadas a 200 Ω, 25 µF e 1,8 KV. As células foram incubadas em meio LB por 1 hora a 37°C e depois semeadas em placas de LB e incubadas a 37 °C por 16 horas.

3.5 Conjugação

A linhagem *E. coli* S17-1 foi utilizada como doadora de plasmídeos para a linhagem parental NA1000 de *C. crescentus*. Os plasmídeos foram introduzidos na linhagem *E. coli* S17-1 por eletroporação. A linhagem receptora NA1000 de *C. crescentus* e a doadora *E. coli* (portadora de plasmídeo com *oriT*) foram misturadas com o auxílio de uma alça de platina em PYE sólido e incubadas por 16 horas a temperatura ambiente para permitir a conjugação. Em seguida, a seleção foi feita em placas de PYE contendo ácido nalidíxico, pois *E. coli* S17-1 é sensível e *C. crescentus* é resistente, mais o antibiótico cuja marca de resistência era codificada pelo plasmídeo.

3.6 Construção da biblioteca de mutantes

A inserção do transposon foi realizada através da conjugação da linhagem NA1000 de *C. crescentus* com uma *E. coli* S17-1 doadora, carregando o plasmídeo suicida pSUP2021 que contém o transposon Tn5.

As duas linhagens foram cultivadas durante uma noite e a conjugação foi feita com 5 ml de uma cultura de NA1000 e 1 ml de uma cultura de *E. coli* S17-1 e em seguida 6 ml da mistura foram filtrados em membranas de 0,45 µm de poro. Estas membranas contendo as células foram colocadas em placas de PYE durante a noite na estufa a 30 °C para ocorrer a conjugação. A seguir, as células na membrana foram ressuspensas em 1 ml de meio PYE, diluídas 10 vezes e semeados 100 µl da diluição em placas contendo canamicina e ácido nalidíxico e incubadas durante 3 dias.

Através da seleção com o antibiótico canamicina, apenas as colônias contendo o transposon inserido no genoma sobreviveram. As colônias obtidas foram inoculadas em meio PYE contendo canamicina em placas de 96 poços. Após o crescimento a 30 °C durante a noite com agitação constante de 140 rpm, uma cópia da biblioteca foi estocada a -80 °C com DMSO 10% e outra cópia foi mantida em placa, para posterior isolamento de mutantes de interesse.

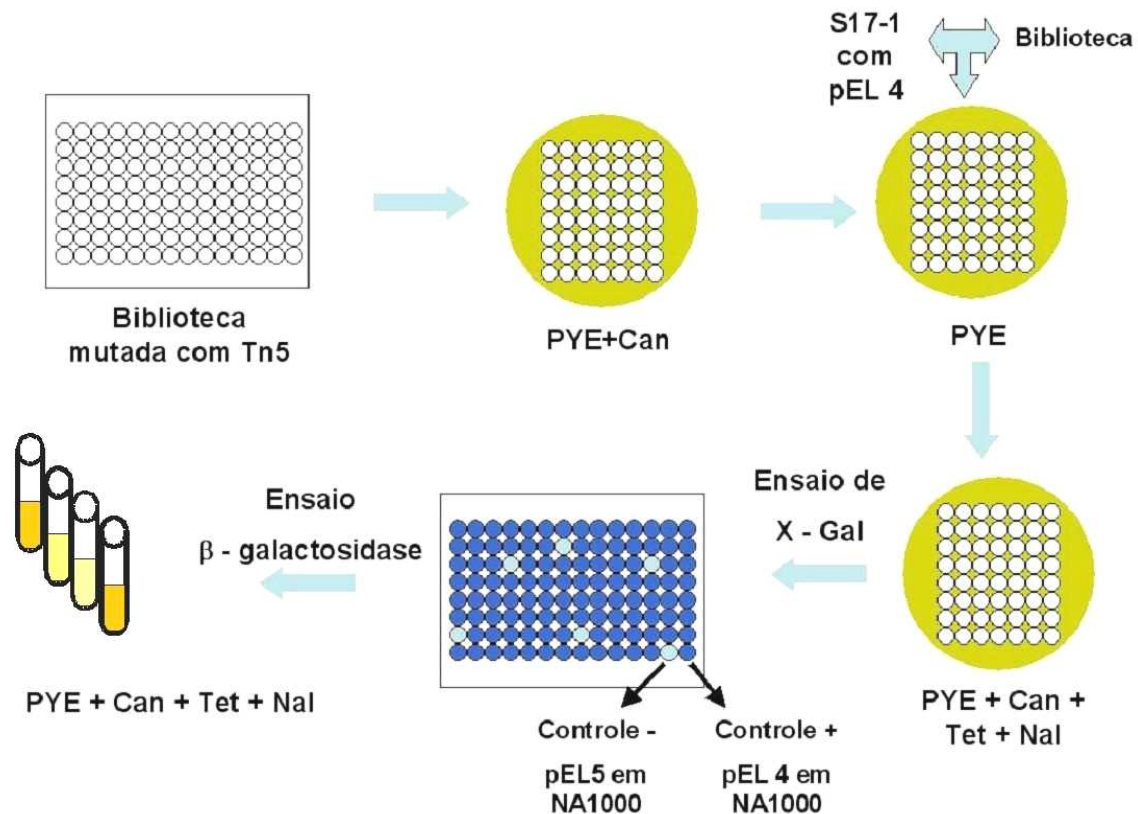
MATERIAIS E MÉTODOS

3.7 Varredura da biblioteca de mutantes

Uma biblioteca de mutantes de *C. crescentus* contendo 7500 clones foi gerada por mutação aleatória induzida pelo transposon Tn5 (ITALIANI, MARQUES, 2003 e este trabalho). Com o auxílio de um carimbo de metal para placas de Petri, todos os clones da biblioteca foram transferidos para placas de PYE com canamicina, onde cresceram durante dois dias. Células de *E. coli* S17-1 contendo o plasmídeo pEL 4 foram semeadas em placas de PYE com a ajuda da alça de Drigalski e incubadas a 37 °C durante quatro horas. Sobre essas células, foram carimbadas com o carimbo de metal as colônias de mutantes da biblioteca de *C. crescentus*. As placas foram deixadas a 30 °C durante uma noite para ocorrer a conjugação. Esses mutantes foram novamente carimbados em placas de PYE com canamicina (marca de resistência do transposon), tetraciclina (marca de resistência do plasmídeo pEL4) e ácido nalidíxico e deixadas a 30 °C por três dias. Posteriormente, foram transferidas para placas de 96 poços contendo 150 µl de meio líquido PYE com canamicina, tetraciclina e ácido nalidíxico e deixadas a 30 °C com agitação de 140 rpm durante dois dias. Essas células, depois de dois dias, estavam em fase estacionária, e foi realizado o ensaio com X-Gal (5-bromo-4cloro-3-indolil-D-gactopiranosídeo). Foram adicionados a cada poço 4 µl de uma solução 20 mg/ml de X-Gal e aguardou-se alguns minutos até que as colônias ficassem azuis. Esse ensaio foi realizado juntamente com os controles, positivo NA1000 (pEL4) e negativo NA1000 (pEL5). As colônias que ficassem azuis claras parecidas com o controle negativo eram selecionadas para ensaio de β-Galactosidase (Figura 9).

MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 9 - Esquema da varredura da biblioteca de mutantes.



Os clones da biblioteca mutados com Tn5 sofreram conjugação com células de *E. coli* S17-1 contendo o plasmídeo pEL 4. Através de ensaios com X-Gal foram selecionados alguns clones para ensaio de atividade de β -galactosidase.

FONTE: da SILVA, C. A. P. T

3.7.1 Ensaio de atividade de β -Galactosidase

Para quantificar a expressão de *cspD* nos mutantes foi realizado o ensaio de β -Galactosidade (MILLER, 1972). Os mutantes selecionados por X-Gal foram crescidos em meio líquido PYE com canamicina, tetraciclina e ácido nalidíxico durante dois dias. Em um tubo de vidro foram adicionados 0,8 ml de tampão Z ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 60 mM; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 40 mM; KCl 10 mM; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 mM; β -mercaptoetanol 50 mM), 0,1 a 0,2 ml das culturas em fase estacionária e 100 μl de clorofórmio, misturando brevemente e incubando por 5 minutos a 30 °C. A seguir, foram adicionados 0,2 ml de ONPG (4 mg/mL 0-nitrofenil-b-D-galactosídeo em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,0), misturando e incubando a 30 °C por 5 minutos, em seguida a reação foi parada com 0,4 ml de Na_2CO_3 1 M. A mistura foi transferida para um tubo e centrifugado por 5 minutos a 12000 rpm. A fase aquosa foi retirada e a leitura da absorbância foi feita a 420 nm e das células a 600 nm. As unidades de atividade de β -galactosidase foram calculadas da seguinte forma:

$$\text{Unidades} = 1000 \times [A420 / (T \times V \times A600)]$$

onde T= tempo em minutos e V= volume em ml

Este ensaio foi realizado juntamente com os controle positivo (*C. crescentus* NA1000 contendo pEL4) e negativo (*C. crescentus* NA1000 contendo pEL5).

3.7.2 Identificação dos genes interrompidos pelo Tn5 nos mutantes isolados

Para identificar o gene interrompido em cada linhagem mutante e determinar o sítio de inserção do Tn5 foi necessário utilizar duas estratégias: PCR reverso e clonagem direta no vetor pBC KS.

Clonagem no vetor pBC KS

3.7.3 Minipreparação de DNA cromossomal

O DNA cromossomal foi preparado como descrito por Chen e Kuo (1993). Os clones selecionados foram inoculados em 2 ml de meio PYE contendo canamicina e incubados a 30 °C durante a noite com agitação constante de 200 rpm. De cada cultura foram transferidos 1,5 ml para Eppendorfs e estes foram centrifugados por 1 minuto a 12000 rpm. As células foram ressuspendidas em 200 µl de tampão de lise (Tris–acetato 40 mM pH 7,8; Acetato de sódio 20 mM; EDTA 1 mM; SDS 1%) e pipetadas vigorosamente. Em seguida foram adicionados 66 µl de uma solução de NaCl 5 M, para remover proteínas e debris celulares, agitando até a mistura ficar viscosa. Esta mistura foi então centrifugada a 4 °C por 10 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado um volume igual de clorofórmio. Os tubos foram invertidos gentilmente, até a mistura ficar leitosa e sem apresentar separação de fases. Essa mistura foi centrifugada por 3 minutos a 12000 rpm e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Foi adicionado então, o dobro do volume de etanol e em seguida a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 12000 rpm. O DNA foi lavado com etanol 70% por duas vezes, seco e ressuspendido em 50 µl de TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0).

Da preparação de DNA cromossomal obtida acima, 5 µl foram digeridos com a enzima de restrição *ApaI* (Invitrogen) em volume final de 20 µl no tampão da enzima e

MATERIAIS E MÉTODOS

mantidos em banho-maria por 16 horas a 37 °C. Em seguida, a digestão foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão de corrida TBE 1X, sendo realizada a corrida a 100 V, utilizando como marcador de peso molecular 1 Kb plus (Invitrogen). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio 0,5 µg/ml e foi analisado sob luz UV.

3.7.4 Clonagem do fragmento contendo Tn5 no vetor pBC KS

Cerca de 300 ng do vetor foram digeridos com a enzima *ApaI* (Invitrogen) em 20 µl total durante 2 horas a 37 °C. Em seguida foi realizada a ligação do vetor ao DNA genômico extraído das linhagens mutantes isoladas da biblioteca previamente digeridos com *ApaI*. A ligação foi realizada com 200 ng de DNA genômico dos mutantes para 20 ng do vetor em volume final de 20 µl durante toda a noite à temperatura ambiente. Foi utilizado 1 µl da ligação na transformação por eletroporação em *E. coli* DH5α e os transformantes foram selecionados por crescimentos em placas de meio LB contendo canamicina e cloranfenicol.

3.7.5 Minipreparação de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi preparado pelo método de lise alcalina (AUSUBEL et al., 1995). Colônias brancas de *E. coli* DH5α, transformadas com o vetor pGEM contendo o fragmento com parte do DNA cromossomal de *C. crescentus* e do transposon Tn5, foram inoculadas em 2 ml de meio LB contendo ampicilina e incubadas a 37 °C durante a noite, com agitação constante de 200 rpm. Foi transferido 1,5 ml de cada cultura para tubos Eppendorf, centrifugando-se por 5 minutos a 12000 rpm. As células foram ressuspensas em 100 µl de solução I (glicose 50 mM; EDTA 10 mM; Tris-HCl 25 mM pH 8,0) gelada e em seguida foram adicionados 200 µl de solução II (NaOH 0,2 N; SDS 1%). Após homogeneização por inversão, adicionaram-se 150 µl de solução III (acetato de potássio 3 M; ácido acético glacial 11,5%) gelada e agitou-se por 10 segundos. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 4 °C e 13000 x g e os sobrenadantes, transferidos para outro tubo. Adicionou-se o mesmo volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), e centrifugou-se por 5 minutos a 4 °C e 13000 x g. A fase aquosa foi precipitada com 2 volumes de etanol gelado por 5 minutos e centrifugada por 5 minutos a 4 °C e 13000 x g. Os precipitados foram lavados com etanol 70%, secos e ressuspensos em 50 µl de TE contendo 20 µg/ml de RNase A. Para confirmar a clonagem dos fragmentos corretos, 500 ng da minipreparação do vetor pGEM-T Easy e digeridos com enzima *EcoRI*. A digestão foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% para confirmação da clonagem do fragmento no vetor pGEM.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.7.6 Sequenciamento dos clones positivos

O sequenciamento dos clones foi realizado utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). O DNA dos fragmentos clonados no vetor pBC KS foram seqüenciados em um sistema automatizado, utilizando o iniciador R3, o qual hibridiza a 3' da repetição invertida (IR) do transposon. Aproximadamente 0,5 µg da preparação plasmidial obtida através do kit “Wizard® Plus SV Minipreparações Kit” (Promega) foi transferida para um tubo contendo o iniciador na concentração de 3,2 pmol. Adicionou-se 3 µl do tampão e 1 µl da mistura “Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit”, e o volume foi completado com H₂O 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 as reações foram mantidas a 4 °C até a precipitação por isopropanol. Para a precipitação foram adicionados 100 µl de isopropanol 75% em 10 µl da PCR, misturados e deixados por 10 minutos em repouso. Os tubos foram centrifugados por 50 minutos a 4000 rpm a 20 °C, e em seguida foi feito um pulso com os tubos invertidos. Os precipitados foram lavados duas vezes com 150 µl de etanol 70% e foram centrifugados por 10 minutos a 4000 rpm a 20 °C. O DNA foi seco a 37 °C por 30 minutos e ressuspendido em 2,5 µl de Tampão de amostra. As amostras foram deixadas por 2 horas em temperatura ambiente ou durante a noite a 4°C e então foram desnaturadas por calor para serem aplicadas no aparelho de sequenciamento ABI-377-36 Autosequencer (Perkin-Elmer Biosystems Inc., Foster City, CA, E.U.A.). As sequências foram comparadas com o banco de dados de sequência de DNA (GenBank), usando o programa BLAST (ZHANG; MADDEN, 1997).

PCR reverso

Os DNAs genômicos das linhagens mutantes selecionadas foram extraídos (item 3.7.3) e cerca de 500 ng de DNA foram digeridos com a enzima *Pst*I (Invitrogen) no próprio tampão da enzima, durante 16 horas a 37 °C. Para que os fragmentos digeridos com *Pst*I circularizassem, foram realizadas ligações contendo 5 ng de DNA cromossomal digerido na presença de 5 U de T4 DNA ligase (Invitrogen), em um volume final de 100 µl. Cerca de 5 µl da ligação foram utilizados para a PCR, conforme ilustra a figura 10.

As PCRs foram realizadas com 5 µl da ligação acima; 50 pmol de cada oligonucleotídeo (R3 e L7) que hibridizam na IS do transposon; 0,2 mM de cada dNTP; 1,5

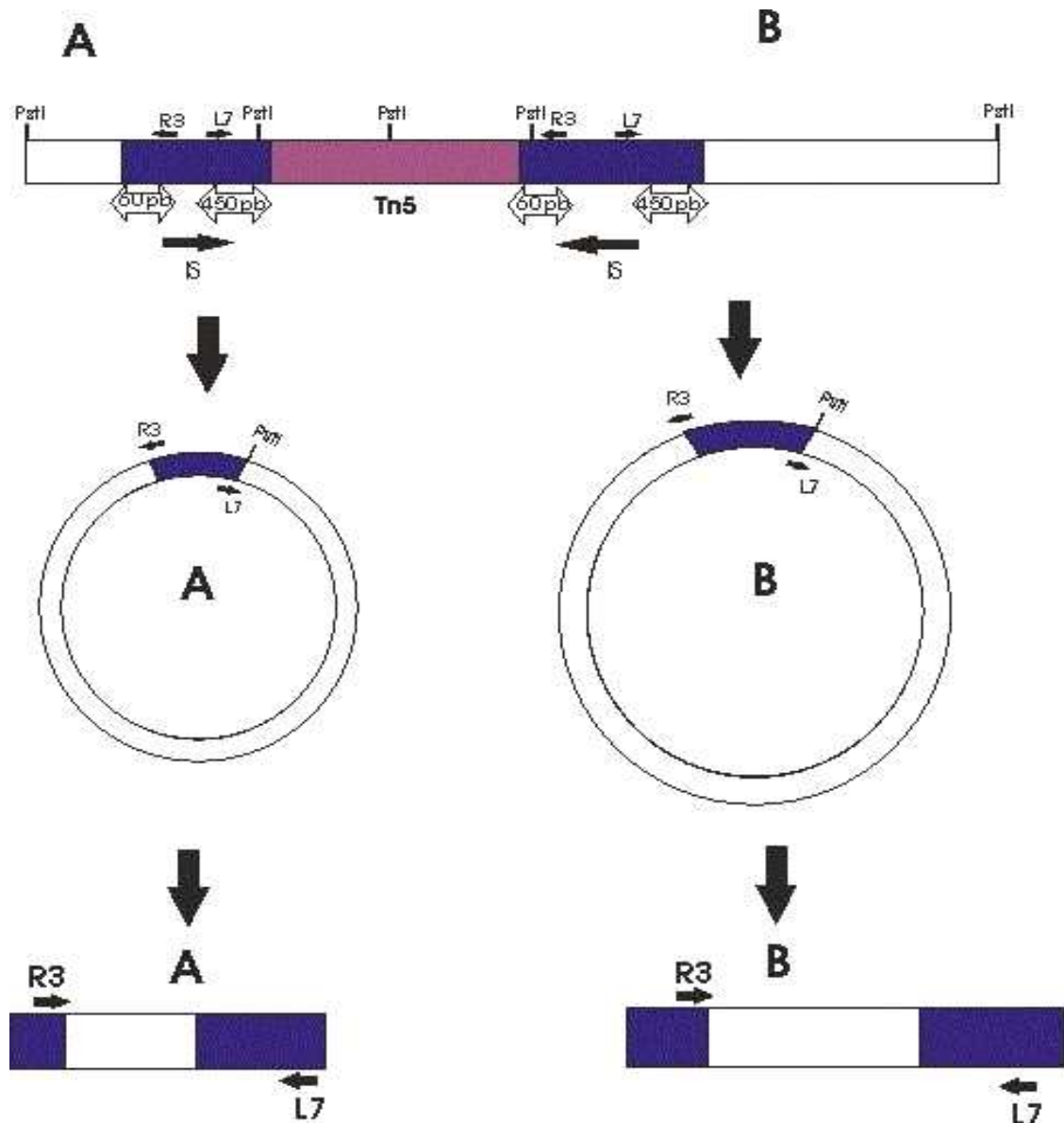
MATERIAIS E MÉTODOS

mM MgCl₂; 0,5 U de Taq DNA Polymerase Platinum (Invitrogen) e tampão fornecido pelo fabricante. As condições da PCR foram de 95 °C por 5 minutos, seguidos de 40 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 50 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto. Após os 40 ciclos a reação permaneceu a 72 °C por 7 minutos e em seguida a temperatura foi mantida a 4 °C. As reações foram visualizadas em gel de agarose 1%. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio e foi visualizado sob luz UV.

Para o isolamento de fragmentos, após a corrida um corte foi feito abaixo das bandas visualizadas, em seguida uma membrana DE-81 foi posicionada neste corte. O gel foi reposicionado na cuba e a eletroforese se reiniciou por cerca de dez minutos, de modo que o fragmento fosse transferido para a membrana. Em seguida a membrana foi embebida em 500 µl de solução de isolamento de DNA (1 M NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 8; 1 mM EDTA pH 8) e foram adicionados 10 µg de tRNA de levedura. Após 16 horas em temperatura ambiente, a solução foi submetida à limpeza pelo protocolo de fenol:clorofórmio (item 3.7.5) com a 2ª repetição da limpeza apenas com clorofórmio. O DNA foi precipitado com duas vezes o volume de etanol 100%, por uma hora a -80 °C, e centrifugado por 15 minutos a 12.000 rpm a 4 °C. Após a precipitação foram efetuadas duas lavagens com etanol 70% e então, as amostras foram secas e ressuspensas em TE. Os fragmentos purificados foram clonados no vetor pGEM-T Easy e inseridos por eletroporação em *E.coli* DH5α.

MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 10 - Esquema da reação de PCR reverso.



O cromossomo de *C. crescentus* está em branco e indicado pelas letras A e B, o azul representa as IS do Tn5 e o roxo genes internos do Tn5 (inclusive o gene de resistência a canamicina). O DNA genômico dos mutantes foi digerido com a enzima de restrição PstI. Os círculos representam os fragmentos PstI que contêm parte do DNA genômico e parte das IS do Tn5, ligados e circularizados. As siglas R3 e L7 representam os oligonucleotídeos utilizados no PCR. As regiões amplificadas foram seqüenciadas.

FONTE: da SILVA, C. A. P. T

3.8 Ensaios de expressão do gene *cspD* em diferentes meios

A expressão do gene *cspD* foi determinada por ensaio de atividade de β -Galactosidase nas diferentes linhagens. Para se avaliar a expressão do gene em diferentes meios de cultura, células de NA1000, SP0200, SP0210 e SP0247 contendo o plasmídeo pEL4 ou pEL5 foram inoculadas nos meios indicados na tabela 4, diluídas para uma DO_{600} de 0,1 e, ao chegar a

MATERIAIS E MÉTODOS

uma DO_{600} igual a 0,5, tiveram a expressão do gene *cspD* avaliada por ensaios de atividade de β -galactosidase em diferentes tempos da curva de crescimento (meio da fase exponencial, 24 h e 48 h). Para os ensaios de carência total de glicose ou amônia, culturas de NA1000 e SP0200 contendo o plasmídeo pEL4 ou pEL5 foram crescidas em meio M2G durante a noite, diluídas para uma DO_{600} de 0,1 e ao chegar a uma DO_{600} igual a 0,4 (meio da fase exponencial), foram submetidas à carência de amônia ou glicose. Para isso, as culturas foram centrifugadas e ressuspensas em meio M2G (controle), M2 sem glicose e M2 sem NH_4Cl e crescidas durante 24 horas. A atividade do promotor de *cspD* a montante do gene repórter *lacZ* foi determinada através de ensaios de β -galactosidase no momento da separação dos meios, com pontos a cada hora durante 5 horas e um ponto de 24 horas.

Tabela 4 - Composição dos meios M2

Meio de cultura	Glicose	NH_4Cl (0,05%)	Peptona (0,2%)	Xilose (0,3%)
M2G*	0,2%	+	-	
M2P	-	+	+	
M2G(-N)	0,2%	-	-	
M2G 0,02%	0,02%	+	-	
M2X	-	+	-	+

*Meio M2 Completo (Na_2PO_4 0,5 g/l; KH_2PO_4 1,74 g/l; NH_4Cl 1,06 g/l; pH 6,9; Fe_2SO_4 1 mM; glicose 0,2%; $MgSO_4$ 1 mM; $CaCl_2$ 0,5 mM).

3.9 Construção do mutante nulo $\Delta spoT$

3.9.1 Amplificação dos fragmentos para construção do mutante

As PCRs foram realizadas utilizando 1 μg de DNA genômico; 50 pmol de cada oligonucleotídeo (RelA-1/ReLA-2 e RelA-3/RelA-4); 2,5 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 0,2 mM de uma mistura de dNTP's; 5% de DMSO (dimetilsulfóxio); 1,5 mM de $MgCl_2$ e 1 X tampão PCR fornecido pelo fabricante. As condições do PCR foram de 94 °C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos e 68 °C por 1 minuto. A seguir as reações passaram por mais um ciclo de 68 °C por 5 minutos. Os fragmentos obtidos RelA-1/ReLA-2 (700 pb) e RelA-3/RelA-4 (950 pb) foram clonados no vetor pGEM (Promega) e seqüenciado conforme descrito no item só que utilizando os oligonucleotídeos: M13 Forward (-20) e M13 Reverse

MATERIAIS E MÉTODOS

3.9.2 Clonagem das regiões flanqueadoras do gene *spoT* deletado no plasmídeo pNPTS138

Depois de clonados no vetor pGEM e sequenciado, os fragmentos RelA-1/RelA-2 (700 pb) e RelA-3/RelA-4 (950 pb) foram digeridos com *EcoRI/BamHI* e *ApaI/BamHI*, respectivamente e purificados do gel com o Kit “NucleoSpin extract II (Machery-Nagel). Primeiramente, o fragmento RelA-3/RelA-4 (950 pb) foi clonado no vetor pNPTS138, em seguida foi verificada a clonagem, e posteriormente foi ligado o fragmento RelA-1/RelA-2 (700 pb) e verificada a clonagem.

As ligações foram feitas com aproximadamente 0,2 µg do pNPTS138 digerido com 1 µg do fragmento digerido com as mesmas enzimas que o vetor, 1 U de T4 DNA ligase (Invitrogen) em tampão fornecido pelo fabricante e em um volume final de 20 µL. As reações ocorreram a 19 °C por 5 horas. Esta ligação foi inserida em *E. coli* S17-1, por eletroporação e semeadas em placas de LB contendo 50 µg/ml de canamicina (item 3.4). As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas. As colônias obtidas tiveram o DNA plasmidial isolado e digerido para verificar a presença do inserto de 1650 Kb e assim selecionar o clone positivo.

3.9.3 Obtenção da linhagem recombinante de *Caulobacter crescentus*

O plasmídeo recombinante positivo obtido no item anterior foi transferido para a linhagem NA1000 de *C. crescentus* por conjugação (item 3.5). A mistura de células foi semeada em placas PYE contendo 5 µg/ml de canamicina e 20 µg/ml de ácido nalidíxico e estas foram incubadas em estufa a 30 °C. Por ser incapaz de replicar em *C. crescentus*, o plasmídeo se integra por recombinação homóloga, na cópia do gene cromossomal correspondente. Essa etapa foi selecionada pela resistência dos recombinantes a canamicina, já que o pNPTS138 apresenta marca de resistência a esse antibiótico. Para confirmar e mapear o local da integração do pNPTS138 recombinante no cromossomo de *C. crescentus*, os DNAs genômicos de algumas das colônias, obtidas na conjugação, foram isolados e analisados por PCR (item 3.9.1) utilizando os oligonucleotídeos Rel1/Rel4 .

Posteriormente, colônias obtidas da primeira recombinação foram incubadas a 30 °C sob agitação em PYE sem adição de antibióticos por 48 horas para permitir o segundo evento de recombinação homóloga, onde há a saída do plasmídeo da célula juntamente com uma cópia do gene alvo. Estas culturas foram então, semeadas em placas contendo 3% de sacarose. A sacarose é convertida em um metabólito tóxico pelo produto do gene *sacB* presente no pNPTS138. Sendo assim, apenas linhagens que perderam o plasmídeo são capazes de sobreviver neste meio de cultura, permitindo a seleção das células que sofreram a segunda

MATERIAIS E MÉTODOS

recombinação. Das colônias obtidas, cerca de 150 foram repicadas simultaneamente no mesmo meio, contendo ou não canamicina, para selecionar aquelas que fossem sensíveis a canamicina e que crescessem no meio sem este antibiótico. Os recombinantes sensíveis a canamicina tiveram seu DNA genômico extraído e analisado por PCR conforme descrito no item 3.9.1, mas utilizando os oligonucleotídeos RelA-4 e RelA-5, e as condições da PCR foram de 95 °C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 67 °C por 30 segundos e 72 °C por 4 minutos.

3.10 Construção do plasmídeo pCA1

O DNA cromossômico foi preparado como descrito no item 3.7.2, e foi realizado um PCR a partir do DNA cromossômico de *C. crescentus* utilizando os oligonucleotídeos CAP-2 e CSPD-B com a temperatura de anelamento de 60 °C. A PCR foi realizada como descrito no item 3.9.1.

O fragmento amplificado de 850 pb foi ligado no vetor pGEM, e inserido por eletroporação em *E. coli* DH5- α . As células foram semeadas em meio LB contendo 25 μ l de X-Gal (20 mg/ml), 25 μ l de IPTG (mM) e 100 μ g/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas. As colônias brancas obtidas tiveram o DNA plasmidial extraído e digerido com a enzima *EcoRI* para confirmar a clonagem. Confirmada a clonagem, o DNA plasmidial foi isolado e sequenciado.

O DNA plasmidial foi digerido com as enzimas *BamHI* e *PstI*, gerando um fragmento de 650 pb. Esse fragmento foi clonado no vetor pRKlacZ290 previamente digerido com as mesmas enzimas. Essa construção foi introduzida na linhagem S17-1 de *E. coli* por eletroporação e os transformantes foram selecionados por crescimento em placas de meio LB contendo tetraciclina.

Para detectar a inserção do fragmento foi realizada uma PCR com os iniciadores, Lac290up e M13 forward-20, que amplificam o sítio múltiplo de clonagem do vetor pRKlacZ290. Quando não há fragmento clonado, o resultado da PCR é um fragmento de 150 pb. Quando há inserto clonado, o resultado da reação é um fragmento de 150 pb mais o tamanho do inserto. Os DNAs plasmidiais de 10 colônias foram extraídos e utilizados como molde na PCR como descrito no item 3.9.1, com temperatura de anelamento de 55 °C por 1 minuto. Os fragmentos que apresentaram o tamanho esperado tiveram suas colônias originais semeadas em placas LB com tetraciclina para serem submetidas à conjugação com a linhagem NA1000.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.11 Complementação e vetores de expressão

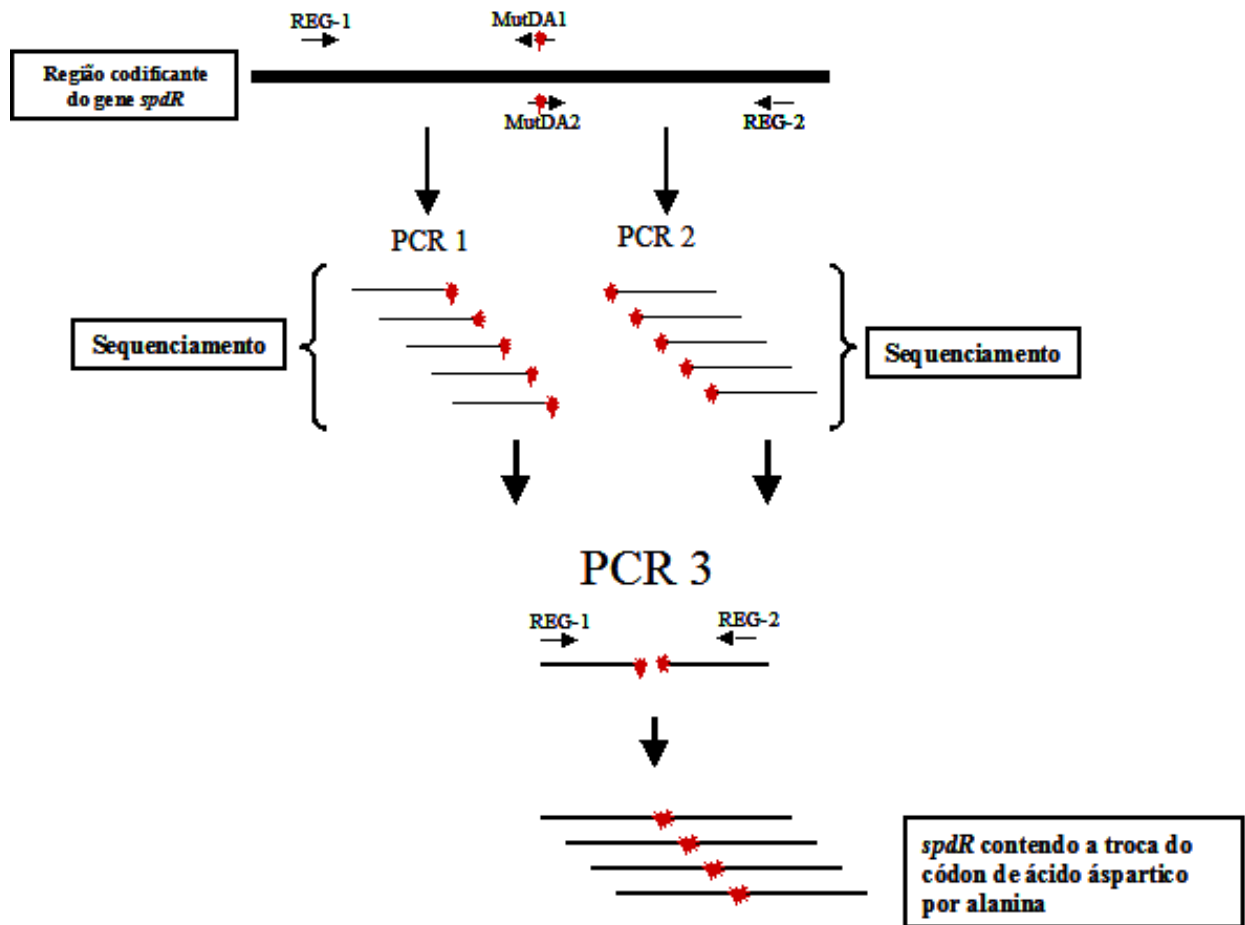
Para a construção do plasmídeo para a complementação do mutante $\Delta spoT$, foi retirado do cosmídeo 1G4 (ALLEY et al., 1991) um fragmento de 3.8 kb com a enzima *Apa I*, contendo o gene *spoT* e sua região promotora. Este fragmento foi clonado no vetor pUJ142 previamente digerido com a enzima *ApaI*, gerando o plasmídeo pCA38 que expressa a proteína SpoT pelo próprio promotor do gene.

A região codificante do gene *spdR* foi amplificada por PCR utilizando os oligonucleotídeos REG-1 E REG-2. Posteriormente o fragmento foi clonado no vetor pUJ142, gerando o plasmídeo pCA39 que expressa a proteína SpdR pelo promotor do vetor que é induzido por xilose. Todas as reações de PCR foram realizadas utilizando a enzima de alta fidelidade (FideliTaq™ DNA Polymerase, USB Co., Cleveland, OH, E.U.A.) e usando como molde a região codificante do gene *spdR*. Para gerar o gene *spdR* modificado, foram realizadas subsequentes reações de PCR utilizando dois oligonucleotídeos complementares mutados (MutDA1 e MutDA2), combinados com oligonucleotídeos externos (REG-1 e REG-2), desta maneira amplificando o fragmento contendo a substituição do códon do ácido aspártico pelo códon de alanina na posição 64 da proteína.

O fragmento mutado foi sequenciado para confirmar a mutação na posição correta e se não havia ocorrido mutação secundária durante as amplificações (Figura 11). O fragmento contendo o gene *spdR(D64A)* foi subsequentemente clonado em fase no vetor pUJ142, gerando o plasmídeo pCA40. O mesmo fragmento foi clonado no vetor pPROEX-Hta, gerando o plasmídeo pCA401.

MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 11 - Esquema da mutação sítio-específica.



Mutação sítio-específica no códon do ácido aspártico na posição 64 do regulador de resposta (CC0247).

FONTE: da SILVA, C. A. P. T

3.12 Construção da linhagem mutante *C. crescentus* $\Delta spoT \Delta spdR$

O mutante duplo $\Delta spoT \Delta spdR$ foi construído sobre a linhagem SP0200. As regiões flangeadoras do gene *spdR* foram amplificadas por PCR utilizando os oligonucleotídeos RR1/RR2 e RR3/RR4 com temperatura de anelamento de 55 °C, gerando ampliações de 950 pb e 970 pb, respectivamente. As duas regiões foram primeiramente clonadas no vetor suicida para *C. crescentus* pNPTS138 e após a clonagem o mesmo foi introduzido na linhagem *C. crescentus* SP0200 para gerar a deleção do gene *spdR* por dupla recombinação. Desta maneira, obtivemos a linhagem mutante $\Delta spoT \Delta spdR$, nomeada de SP0210.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.13 Expressão de SpdR e SpdS

Os plasmídeos Trx-His CC0247 e Trx-His CC0248, contendo respectivamente a região codificadora do regulador de resposta (SpdR=Stationary phase *cspD* Regulator) e parte da histina quinase (SpdS=Stationary phase *cspD* Sensor), fusionados com cauda de histidina foram gentilmente cedidos pelo Dr. Michael Laub (MIT) (SKERKER, et al. 2005). Estas construções foram utilizadas para expressar as proteínas correspondentes em *E. coli*. O plasmídeo pCA401 foi utilizado para expressar a proteína mutada SpdR(D64A). As proteínas foram expressas em *E. coli* DH5- α a 37 °C e induzidas com 300 μ M de IPTG. A purificação foi realizada usando uma coluna de cromatografia de afinidade por Ni (Quiagen).

3.14 Fosforilação *in vitro*

O ensaio de fosforilação foi realizado como descrito (SKERKER, et al. 2005). Neste ensaio utilizou-se 5 μ M de SpdS para a autofosforilação em tampão de estoque suplementado com 5 μ Ci [γ -³²P]ATP a 30 °C durante 15 minutos. Após a autofosforilação foi adicionado na reação 5 μ M de SpdR purificado. As reações de fosfotransferência foram realizadas em diferentes tempos (30 s, 2 min, 10 min e 30 min). Como controle do ensaio, foi realizada uma reação de fosforilação somente com a histidina quinase. As reações foram paradas com a adição de 3,5 μ l de tampão de parada 4X (500 mM Tris-HCl [pH 6.8], 8% SDS, 40% glicerol e 400 mM de β -mercaptoetanol). As amostras foram aplicadas em gel 10% SDS-PAGE e o gel foi seco e exposto a filme de raio-X.

3.15 Ensaio de mobilidade em gel (EMSA)

A região promotora do gene *cspD* foi amplificada por PCR usando os oligonucleotídeos CSP2-A e CAROL-1 com temperatura de anelamento de 55 °C. O ensaio foi realizado como descrito em (da SILVA NETO et al. 2009). As sondas foram marcadas com 20 μ Ci [γ -³²P]ATP utilizando a enzima T4 polinucleotídeo quinase (Invitrogen) e a reação de ligação ao DNA foi realizada em 30 μ l total contendo 0,05; 0,1; 0,25; 0,5 e 1 mM de proteína SpdS purificada. As proteínas purificadas SpdR e/ou SpdR(D64A) foram inicialmente incubadas com SpdS na presença de 0,5 mM de ATP nas condições descritas em (SKERKER et al. 2005). No ensaio de competição, foi utilizado um excesso de 30 x do fragmento específico (competidor específico) não marcado juntamente com o fragmento específico marcado, em outra reação foi utilizado um em excesso de 30 x do fragmento não marcado da região codificante do gene CCNA01712 (competidor não específico) com o fragmento específico marcado, ambas as reações foram realizadas com 0.5 μ M de SpdR

MATERIAIS E MÉTODOS

purificada. Depois da incubação a 30 °C durante 30 minutos, as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida 5%. A corrida foi realizada em tampão 0,5x Tris-Borato (TB) durante 2 horas a 40 mA. Após a corrida o gel foi seco e exposto em filme de raio-X.

3.16 Ensaio de “*DNase I Footprinting*”

O ensaio de “*DNase I footprinting*” foi realizado como descrito em (DA SILVA NETO et al. 2009). Os mesmos oligonucleotídeos e as mesmas condições usadas para amplificar a região promotora de *cspD* no ensaio EMSA foram utilizados na reação de PCR para amplificar o fragmento utilizado no *footprinting*, com exceção que neste caso a marcação foi realizada previamente nos oligonucleotídeos gerando fragmentos marcados em apenas uma das fitas de DNA de cada vez. As amostras foram incubadas com a proteína purificada His-SpdR em diferentes concentrações (0,1; 0,25 e 0,5 µM). O DNA foi digerido com 0.05U de DNase I RQ1 sem RNase (Promega) durante 1 min. As sequências de cada um dos fragmentos foram obtidas por reações de sequenciamento com o ‘kit’ ThermoSequenase Cycle Sequencing (USB), segundo instruções do fabricante, utilizando os mesmos oligonucleotídeos e plasmídeo contendo o fragmento da região promotora de *cspD* clonado para ser utilizado como molde. As amostras foram aplicadas em gel de sequenciamento 6% poliacrilamida-uréia.

3.17 Construção do plasmídeo pCA50

Foi realizada uma PCR a partir do DNA cromossômico de *C. crescentus* utilizando os oligonucleotídeos CSPD-R1 e CSPD-R2 com a temperatura de anelamento de 55 °C.

O fragmento amplificado de 700 pb foi ligado no vetor pGEM, e inserido por eletroporação em *E. coli* DH5- α . As células foram semeadas em meio LB/ampicilina contendo 25 µl de X-Gal (20 mg/ml). As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas. As colônias brancas obtidas com esta transformação tiveram o DNA plasmidial extraído e digerido com a enzima *EcoRI* para confirmar a clonagem. Confirmada a clonagem, o DNA plasmidial foi isolado e sequenciado.

O DNA plasmidial foi digerido com as enzimas *EcoRI* e *HindIII*, gerando um fragmento de 700 pb. Esse fragmento foi clonado no vetor pUJ142 previamente digerido com as mesmas enzimas. Essa construção foi introduzida na linhagem S17-1 de *E. coli* por eletroporação e os transformantes foram selecionados por crescimento em placas de meio LB contendo cloranfenicol.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para detectar o inserto no vetor pUJ142 foi realizada uma PCR, sendo os oligonucleotídeos utilizados, CSPD-R1 e CSPD-R2. Os DNAs plasmidiais de 10 colônias foram extraídos e utilizados como molde na PCR como descrito acima, com temperatura de anelamento de 55 °C por 1 minuto. Um clone contendo o fragmento de tamanho esperado foi semeado em placa LB com cloranfenicol para posterior conjugação com a linhagem NA1000.

3.18 Western Blot

As culturas (NA1000 contendo pUJ142 ou pCA50) foram incubadas a 30 °C em meio PYE/cloranfenicol. Todas as culturas foram diluídas para uma $DO_{600} = 0,05$, e tiveram as proteínas totais extraídas após 0, 4 e 24 horas de indução da proteína CspD com 0,3% de xilose. As alíquotas retiradas (1 ml) foram centrifugadas por 5 minutos para baixar as células, e estas foram ressuspensas em solução O 2x (Tris base 0,62 mM; SDS 10%; DTT 0,01 mM; glicerol 0,2%; azul de bromofenol 0,01%; pH 6,8). O volume de solução O 2X foi 30 µl para o ponto inicial e, para os demais pontos de indução, o volume foi calculado com base na densidade óptica que as culturas atingiram no ponto considerado.

As amostras acima foram fervidas por 3 minutos para desnaturação das proteínas e centrifugadas por 5 minutos para separação das impurezas. Do sobrenadante, foram retirados 20 µl para aplicação em gel de SDS-poliacrilamida 15%, utilizando o padrão de peso molecular Page Ruler Prestained Protein Ladder (Fermentas). A eletroforese ocorreu a 200 V, por 50 minutos em tampão de corrida 10% SDS. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para filtros de nitrocelulose em tampão de transferência (Tris-Base 0,33%; Glicina 1,4%; Metanol 20% e completar com H₂O destilada para 1 litro de solução) por 1 hora a 4°C, com uma corrente de 250 mA.

O procedimento de *Western blot* foi realizado como descrito por TOWBIN; STAEHELIN; GORDON (1979). Os filtros de nitrocelulose foram corados por 10 minutos com solução de Ponceau (Ponceau S 0,1% em ácido acético 10%) e incubados sob agitação suave por uma hora em TBS (Tris-HCl pH 8,0 10 mM; NaCl 150 mM) contendo 5% de leite desnatado para saturar possíveis ligações inespecíficas. Os filtros foram então incubados por aproximadamente 16 horas com o anti-soro diluído (1:50 para anti-CspD) em TBSTT (Tris-HCl pH 8,0 10 mM; NaCl 150 mM; Tween 20 0,03%; Triton X-100 0,02%), sem adição de leite. Em seguida, foram lavados por 30 minutos, trocando-se a solução a cada 5 minutos. As quatro primeiras lavagens foram feitas em TBST (Tris-HCl pH 8,0 10 mM; NaCl 150 mM; Tween 20 0,05%) e a última em TBS. Os filtros foram então incubados por 2 horas à temperatura ambiente com o anticorpo anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina

MATERIAIS E MÉTODOS

(Sigma), com diluição de 1:5000 em TBS contendo 5% de leite, e os filtros foram lavados como acima. A revelação foi feita utilizando NBT 0,5 mg/ml e BCIP 0,15 mg/ml em tampão de fosfatase alcalina (Tris-HCl pH 9,5 100 mM; MgCl₂ 5 mM; NaCl 100 mM), e a reação foi interrompida com a adição de TE.

3.19 Construção do mutante nulo Δ *spdR*

As PCRs foram realizadas utilizando 1 µg de DNA genômico; 50 pmol de cada oligonucleotídeo (RR1/RR2 e RR3/RR4); 2,5 U de Taq DNA polimerase, 0,2 mM de uma mistura de dNTP's; 5% de DMSO (dimetilsulfóxio); 1,5 mM de MgCl₂ e 1 X tampão PCR fornecido pelo fabricante. As condições do PCR foram de 94°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos e 68 °C por 1 minuto. A seguir as reações passaram por mais um ciclo de 68 °C por 5 minutos. Os fragmentos obtidos RR1/RR2 (±900 pb) e RR3/RR4 (±950 pb) foram clonados no vetor pGEM (Promega) e sequenciados, utilizando os oligonucleotídeos: M13 forward e M13 reverse.

Depois de clonados no vetor pGEM e sequenciado, os fragmentos RR1/RR2 (900 pb) e RR3/RR4 (950 pb) foram digeridos com *ApaI/BamHI* e *BamHI/EcoRI*, respectivamente e purificados do gel com o Kit “NucleoSpin extract II (Machery-Nagel). Primeiramente, o fragmento RR3/RR4 (950 pb) foi clonado no vetor pNPTS138, em seguida verificada a clonagem correta; posteriormente foi ligado o fragmento RR1/RR2 (900 pb) e verificada a clonagem.

As ligações foram feitas com aproximadamente 0,2 µg do pNPTS138 digerido com 1 µg do fragmento digerido com as mesmas enzimas que o vetor, 1 U de T4 DNA ligase (Invitrogen) em tampão fornecido pelo fabricante e em um volume final de 20 µL. As reações ocorreram a 19 °C por 5 horas. Esta ligação foi transformada em *E. coli* S17-1, em placas de LB contendo 50 µg/ml de canamicina. As placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas. As colônias obtidas com esta transformação tiveram o DNA plasmidial isolado e digerido com as enzimas *ApaI* e *EcoRI* e para verificar a presença do inserto de 1,850 Kb e assim selecionar o clone positivo.

O plasmídeo recombinante positivo obtido foi transferido para a linhagem NA1000 de *C. crescentus* por conjugação. A mistura de células foi semeada em placas PYE contendo 5 µg/ml de canamicina e 20 µg/ml de ácido nalidíxico e incubada em estufa a 30 °C. Por ser incapaz de replicar em *C. crescentus*, o plasmídeo se integra por recombinação homóloga, na cópia do gene cromossomal correspondente. Essa etapa foi selecionada pela resistência dos

MATERIAIS E MÉTODOS

recombinantes a canamicina, já que o pNPTS138 apresenta marca de resistência a esse antibiótico. Para confirmar e mapear o local da integração do pNPTS138 recombinante no cromossomo de *C. crescentus*, os DNAs genômicos de algumas das colônias, obtidas na conjugação, foram isolados e analisados por PCR utilizando os oligonucleotídeos RR1 e RR4.

Posteriormente, colônias obtidas da primeira recombinação foram incubadas a 30 °C sob agitação em PYE sem adição de antibióticos por 48 horas para permitir o segundo evento de recombinação homóloga, onde há a saída do plasmídeo da célula juntamente com uma cópia do gene alvo. Estas culturas foram então, semeadas em placas contendo 3% de sacarose. A sacarose é convertida em um metabólito tóxico pelo produto do gene *sacB* presente no pNPTS138. Sendo assim, apenas linhagens que perderam o plasmídeo são capazes de sobreviver neste meio de cultura, permitindo a seleção das células que sofreram a segunda recombinação. Das colônias obtidas, cerca de 150 foram repicadas simultaneamente em dois meios, contendo ou não canamicina, para selecionar aquelas que fossem sensíveis a canamicina e que crescessem no meio sem este antibiótico. Os recombinantes sensíveis a canamicina foram usados em uma reação de PCR de colônia, utilizando os oligonucleotídeos RR1 e RR4, e as condições da PCR foram de 94 °C por 6 minutos, seguidos de 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 58°C por 30 segundos e 72° por 2 minutos e 50 segundos. A seguir as reações passaram por mais um ciclo de 72 °C por 7 minutos.

3.20 Teste de viabilidade e curva de crescimento

Para determinar a sobrevivência na fase estacionária, culturas de NA1000 e da linhagem mutante SP2710 foram cultivadas a 30° C em meio PYE durante 24 horas, após o crescimento as culturas foram diluídas ($D.O_{600}=0,1$) e cresceram durante 48 horas. As UFCs de cada cultura foram determinadas no meio da fase exponencial ($D.O_{600}=0,5$), 24 e 48 horas de crescimento em meio PYE. A determinação do efeito da superexpressão da proteína CspD no crescimento e na sobrevivência de *C. crescentus* foi realizada com a linhagem selvagem NA1000 contendo o plasmídeo pUJ142 ou pCA50. As células foram crescidas a 30°C, sob agitação, em meio PYE. Após 24 horas de crescimento, as células foram diluídas para uma $D.O_{600}=0,05$ e no momento em que as células chegaram na $D.O_{600}=0,3$ as culturas foram divididas em 2 frascos (PYE/Cloranfenicol e PYE/Cloranfenicol com 0,3% de xilose). Após 4 horas de crescimento alíquotas foram retiradas de cada uma das culturas para contagem de UFCs (unidades formadoras de colônias). Para a determinação de UFCs, alíquotas das culturas passaram por diluições seriadas (10^{-1} a 10^{-8}), as quais foram plaqueadas em meio PYE-ágar com Cloranfenicol. As colônias de *C. crescentus* crescidas após incubação por 72

MATERIAIS E MÉTODOS

horas a 30 °C foram contadas. A sobrevivência relativa foi determinada como a razão do número de UFCs em relação ao número de UFCs inicial.

Para as curvas de crescimento, a linhagem selvagem NA1000 e a linhagem mutante SP2710 foram inoculadas em meio PYE e M2 durante 24 horas. Após o crescimento as culturas foram diluídas ($D.O_{600}=0,1$) nos respectivos meios e alíquotas foram tiradas de 2 em 2 horas durante 12 horas e um ponto depois de 24 horas de crescimento. Já com a linhagem selvagem NA100 contendo o plasmídeo pUJ142 ou pCA50, as culturas foram inoculadas em meio PYE contendo cloranfenicol, após 24 horas de crescimento as culturas foram diluídas ($DO_{600} =0,05$) e alíquotas foram tiradas de 2 em 2 horas até chegar na $DO_{600}=0,3$, onde as culturas foram divididas em 2 frascos (PYE/Cloranfenicol e PYE/Cloranfenicol com 0,3% de xilose) e novamente tirados pontos de 2 em 2 horas até 12 horas de crescimento e depois um ponto de 24 horas de crescimento do início da diluição.

3.21 Ensaio de sensibilidade a H_2O_2

As linhagens NA1000 e SP2710 foram crescidas durante a noite em meio PYE ou a 30 °C sob agitação constante. A seguir, as culturas foram diluídas ($DO_{600}=0,1$) e ao atingirem uma $DO_{600}=0,5$, 500 µl das células com mais 500 µl de meio PYE líquido foram espalhados em placas de meio PYE. Após as placas secarem, foi inserido um disco estéril de papel em cada placa e adicionado ao disco 10 µl de H_2O_2 (3%), e a seguir, as placas foram incubadas a 30 °C. As células diluídas inicialmente continuaram a crescer nas mesmas condições e foram utilizadas para realização deste mesmo ensaio no tempo de 24 e 48 horas de crescimento. No caso da linhagem NA1000 contendo pUJ142 e pCA50 as células foram diluídas ($D.O_{600}=0,05$) e no momento em que as células chegaram na $D.O_{600}=0,3$ as culturas foram divididas em 2 frascos (PYE/Cloranfenicol e PYE/Cloranfenicol/0,3% xilose). Após 4 e 24 horas de crescimento alíquotas foram retiradas de cada cultura e foram utilizadas para realização deste mesmo ensaio. A inibição do crescimento foi avaliada pela medida do diâmetro do halo de inibição.

3.22 Ensaio de Microscopia

As culturas (4 µl de cada cultura) observadas ao microscópio foram colocados entre lamínula e um tapete de agarose 1% 1X PBS. As lâminas foram visualizadas e fotografadas em Microscópio Nikon E800 com objetivas de aumento de 100X. As imagens foram visualizadas e analisadas pelo Software NIS Elements 3.1.

MATERIAIS E MÉTODOS

3.23 Análise *in silico* de prováveis sítios de ligação da proteína SpdR

Utilizando as ferramentas disponíveis no web site Regulatory Sequence Analysis Tools (RSAT) (THOMAS-CHOLLIER et al., 2008) foi realizada uma busca de prováveis sítios de ligação de SpdR.

Essa busca foi feita utilizando a sequência identificada de ligação da proteína SpdR, na região promotora de *cspD*; CTGCGACnnnnnGTCGCGG.

3.24 Extração de RNA total

Culturas das linhagens NA1000 e do mutante SP2710 foram incubadas durante 24 horas a 30°C em meio PYE. Após o crescimento as culturas foram diluídas para uma D.O₆₀₀= 0,1 em 50 ml de meio PYE, quando as culturas chegaram na D.O₆₀₀= 0,5 foi retirado o 1º ponto (fase exponencial), e o 2º ponto após 24 horas (fase estacionária). Alíquotas de 10 ml de cultura de *C. crescentus* foram transferidas para tubos estéreis, centrifugadas a 10000 x g por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células foram lisadas imediatamente com 1 ml de Trizol (fase exponencial) ou 2 ml de Trizol (fase estacionária) (Invitrogen). O lisado foi incubado a 65 °C por 10 minutos e em seguida foi adicionado 0,2 ml de clorofórmio. A mistura foi homogeneizada invertendo os tubos por 15 segundos, em seguida incubada a temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugada a 12000 x g por 20 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em etanol 75%. O precipitado foi seco por 30-60 minutos a temperatura ambiente, solubilizado por 10 minutos a 60 °C em 50 µl de água MilliQ tratada com DEPC e armazenado a -70 °C. O rendimento foi de cerca de 100 µg de RNA para cada 10 ml de cultura.

A concentração foi estimada por medida da absorbância a 260 nm e sua integridade foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,2% em tampão desnaturante (MOPS 1X, formaldeído 6,5%). As amostras foram preparadas adicionando-se 6 µl de tampão de amostra (66,6% de formamida; 23,3% de formaldeído; 6,6% de MOPS 10%) e 3 µl de RNA. A mistura foi incubada por 5 minutos a 65°C, colocada no gelo e foi adicionado 2 µl de tampão de carregamento (50% de glicerol; 1 mM EDTA; 0,4% de Bromofenol) para RNA e 1 µl de brometo de etídio 1 mg/ml. As amostras foram aplicadas no gel e a corrida foi feita em MOPS 1 X a 100 V por 1 hora.

3.25 RT-PCR semi-quantitativo

Análise do mRNA de NA1000 e SP2710 foi feita por RT-PCR com o RNA total, extraído das células em fase logarítmica e estacionárias de crescimento. Cada amostra de

MATERIAIS E MÉTODOS

RNA (50 µg) foram tratados com 25 U de DNase I (Invitrogen) para eliminar a presença de DNA. Os oligonucleotídeos utilizados foram RT-2A e RT-2B, 10 pmol de cada. As reações foram feitas com o 'kit' SuperScript One-Step RT-PCR (Invitrogen) em tampão fornecido, de acordo com as instruções do fabricante. As condições para as reações de RT-PCR foram as seguintes: 30 minutos a 55 °C e 2 minutos a 94 °C, seguidos de 35 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 1 minuto a 48 °C e 1 minuto a 72 °C, com um ciclo final de 7 minutos a 72 °C.

A quantificação relativa aproximada da abundância do transcrito foi feita através da comparação da intensidade das bandas obtidas em gel, resultantes do produto de uma PCR de 35 ciclos.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

A identificação de um regulador de transcrição de fase estacionária em *C. crescentus* é muito importante, tendo em vista que a regulação gênica de Alfabroteobactérias nesta fase ainda é muito pouco conhecida.

Sendo assim, definimos uma estratégia inicial para atingir o nosso objetivo de identificar os sinais celulares e os fatores de transcrição que regulam a expressão do gene *cspD* de *C. crescentus*. Para tanto, foi realizada uma varredura em biblioteca genômica de *Caulobacter crescentus*, gerada por mutação aleatória induzida pelo transposon Tn5. Desta biblioteca foram isoladas linhagens mutantes que não mostram indução de *cspD* na fase estacionária, e os respectivos genes interrompidos foram identificados e analisados.

4.1 Varredura da primeira biblioteca de mutantes

Foi realizada uma varredura em uma biblioteca de 5000 mutantes pela inserção do transposon Tn5, construída anteriormente pela Dra Valéria Cristina da Silva Italiani (ITALIANI, MARQUES, 2003). A varredura da biblioteca está esquematizada na figura 9 (Materiais e Métodos). Os 5000 mutantes receberam por conjugação o plasmídeo pEL4 (pRK*lacZ*290 contendo a região promotora e a região ativadora do gene *cspD* a 5' do gene *lacZ*) (Figura 8) e foram incubados em meio líquido PYE por 48 horas. A seguir foram adicionados 4 µl de uma solução 20 mg/ml de X-Gal e aguardou-se alguns minutos. O X-Gal é um substrato análogo à lactose que é clivado pela β-galactosidase, formando um produto de coloração azul. O controle positivo (*C. crescentus* NA1000 contendo pEL4), apresenta neste ensaio a coloração azul escuro, pois o gene repórter *lacZ* é expresso pelo promotor do gene *cspD*, que está ativo em níveis máximos. O controle negativo *C. crescentus* NA1000 contendo pEL5 (pRK*lacZ*290 contendo a região promotora, mas sem a região ativadora do gene *cspD* clonada a 5' do gene *lacZ*) (Figura 8) tem uma coloração azul clara pois está expressando menos o gene *lacZ*. Portanto, as culturas que ficaram com coloração parecida ao controle negativo por avaliação visual foram selecionadas para ensaios de β-Galactosidase. Nesta fase foram selecionados 241 mutantes que tiveram coloração mais parecida ao controle negativo.

Para o ensaio de β-Galactosidase os 241 mutantes selecionados em ensaio de X-Gal foram incubados durante dois dias em meio líquido PYE com canamicina e tetraciclina, para que as células estivessem em fase estacionária. Doze mutantes demonstraram uma menor atividade enzimática com relação ao controle positivo, mas ainda maior que o esperado quando comparado ao controle negativo (Tabela 5). Estes foram inculados em placas PYE,

RESULTADOS

contendo canamicina e tetraciclina, para que houvesse um volume maior de células para realizar os próximos ensaios. Após o crescimento das células em placas eles foram incubados em meio líquido por 48 horas e foi realizado um novo ensaio de atividade enzimática.

Neste último ensaio de β -Galactosidase foram selecionados seis mutantes que mostraram as mais baixas unidades Miller e foram preparados para identificação dos genes interrompidos (Tabela 5).

Tabela 5 - Atividade de β -Galactosidase nos mutantes selecionados.

Mutantes (placa/posição)	Unidades Miller*	Mutantes (placa/posição)	Unidades Miller
Controle positivo	4000	Controle Negativo	750
44/11H*	1095	47/4C	1727
7/9B	1973	30/3C*	1261
4/2C*	891	22/7H	1857
3/3H*	1420	3/4D	1827
30/9C	1839	46/2A*	1462
2/6F*	1416	22/8D	1938

Unidades Miller: Unidades de atividade enzimática da β -Galactosidase

* Mutantes selecionados para sequenciamento.

4.2 Identificação do sítio de inserção do transposon Tn5

A identificação do sítio de inserção do Tn5 foi determinado por dois métodos: clonagem direta no vetor pBC KS e PCR reverso.

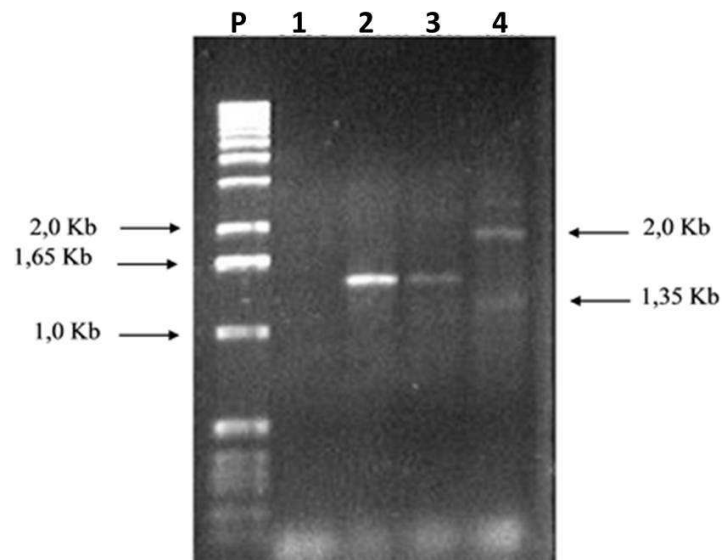
No método de clonagem direta, o DNA cromossomal de cada mutante foi extraído e digerido com a enzima SalI, que corta dentro do transposon Tn5, liberando um fragmento contendo parte do DNA de *C. crescentus*, uma das IS e o gene de resistência a canamicina do transposon. Os fragmentos foram clonados no vetor pBC KS, e os transformantes foram selecionados em placas de LB contendo canamicina e cloranfenicol (que selecionava o vetor pBC KS), assim, só cresceriam colônias que carregassem o gene de resistência a canamicina do transposon. Neste método houve uma grande dificuldade de clonagem devido ao tamanho do fragmento a ser clonado, que era de no mínimo 2690 pb. Através desta abordagem só conseguimos identificar dois clones: 4/2C e 2/6F (Tabela 6).

A outra estratégia de identificação foi o método de PCR descrito por BRUN, SHAPIRO em 1992 (Figura 8). O DNA cromossomal de cada clone selecionado foi digerido com a enzima PstI, que possui 3 sítios de restrição no Tn5 e sítios frequentes no genoma de *C. crescentus*. Destes 3 sítios, um se encontra na parte central do transposon e os outros estão um em cada IS. Após a digestão, estes fragmentos foram ligados em reações contendo uma

RESULTADOS

concentração baixa de DNA, para que os fragmentos pudessem circularizar. Estas moléculas circulares foram usadas como molde para a PCR, utilizando os oligonucleotídeos R3 e L7 (que hibridizam nas IS), com o objetivo de amplificar parte do gene onde o transposon foi inserido. O oligonucleotídeo R3 encontra-se a 80 pb do final das IS e o L7 fica a 450 pb do sítio de *Pst*I das IS. Portanto o tamanho das bandas amplificadas não poderia ser menor que 530 pb. As bandas amplificadas nas PCR estão apresentadas na figura 12. Os produtos de PCRs foram purificados e clonados no vetor pGEM. Através deste método, foi possível a identificação do gene interrompido pelo Tn5 somente no mutante 46/2A (Tabela 6). No mutante 3/3H o fragmento clonado de 1,2 Kb não possuía similaridade com o DNA de *C. crescentus*, devendo ser uma banda inespecífica mesmo com os oligonucleotídeos do Tn5. No mutante 30/3C não houve amplificação, sendo que este ensaio foi realizado três vezes modificando as concentrações do DNA e condições da PCR e em nenhuma houve o aparecimento de banda. Já no mutante 44/11H o fragmento clonado no vetor pGEM possuía similaridade com o genoma de *C. crescentus*, mas não foi possível verificar o exato sítio de inserção do transposon uma vez que não foram encontradas as IS no fragmento.

Figura 12 - Visualização da reação de PCR reverso (1^a biblioteca).



(P) Padrão de peso molecular 1Kb plus; (1) o mutante 30/3C sem nenhum fragmento; (2) o mutante 44/11H com um fragmento de aproximadamente 1.5Kb; (3) o mutante 3/3H com um fragmento de aproximadamente 1,5Kb; (4) o mutante 46/2A com 2 fragmentos um com tamanho de aproximadamente 1,35 Kb e outro com aproximadamente 2 Kb.

FONTE: da Silva, C. A P. T.

RESULTADOS

Tabela 6 - Identificação dos genes interrompidos nos mutantes da primeira biblioteca

Linagem	Gene	Proteína (características)
4/2C	CC2518	Proteína hipotética conservada
46/2A	CC3167	Proteína da família Glicoquinase
2/6F	CC2587	Transportador do tipo ABC

Nesta tabela está indicando o número da linhagem mutante de acordo com a sua posição na placa estoque, o correspondente gene interrompido e a proteína por ele codificada.

Mutante 4/2C

No mutante 4/2C o gene interrompido pelo Tn5 foi o gene CC2518, que codifica para uma proteína hipotética conservada. Esta proteína é de função desconhecida e possui dois domínios DUF (domain of unknown function). Esta proteína apresenta uma região conservada com cerca de 445 resíduos, apresentando uma pequena porção transmembrana entre os resíduos do número 24 a 40, e de acordo com o banco de dados PSORT, esta proteína é de membrana interna.

Uma análise *in silico* feita com o auxílio do programa STRING revelou que o gene CC2518 possui um alto “score” para co-ocorrência com o CC1452, que codifica uma proteína hipotética com um domínio conservado Usp (Universal stress protein), presente na proteína UspA. UspA é uma pequena proteína citoplasmática bacteriana cuja expressão é aumentada quando a célula é exposta a situações de estresse. UspA aumenta a taxa de sobrevivência celular durante exposição prolongada a estas condições, e pode fornecer de uma forma geral atividade de resistência a estresses (ZAREMBINSKI et al., 1998). Neste sentido é possível que haja alguma associação funcional dos produtos dos genes CC2518 e CC1452. A ausência de CC2518 diminui a expressão do gene *cspD*, que é mais expresso em fase estacionária, na qual a célula passa por diversos estresses. A proteína codificada por CC1452 poderia estar também envolvida na adaptação à fase estacionária, onde um conjunto de genes expressos nesta fase possui papel de proteger a célula de estresses externos como temperatura, agentes oxidantes, mudanças osmóticas e exposição a substâncias tóxicas, a fim de adaptar-se ao novo meio que é carente em nutrientes (NYSTRÖM, 2004).

Mutante 46/2A

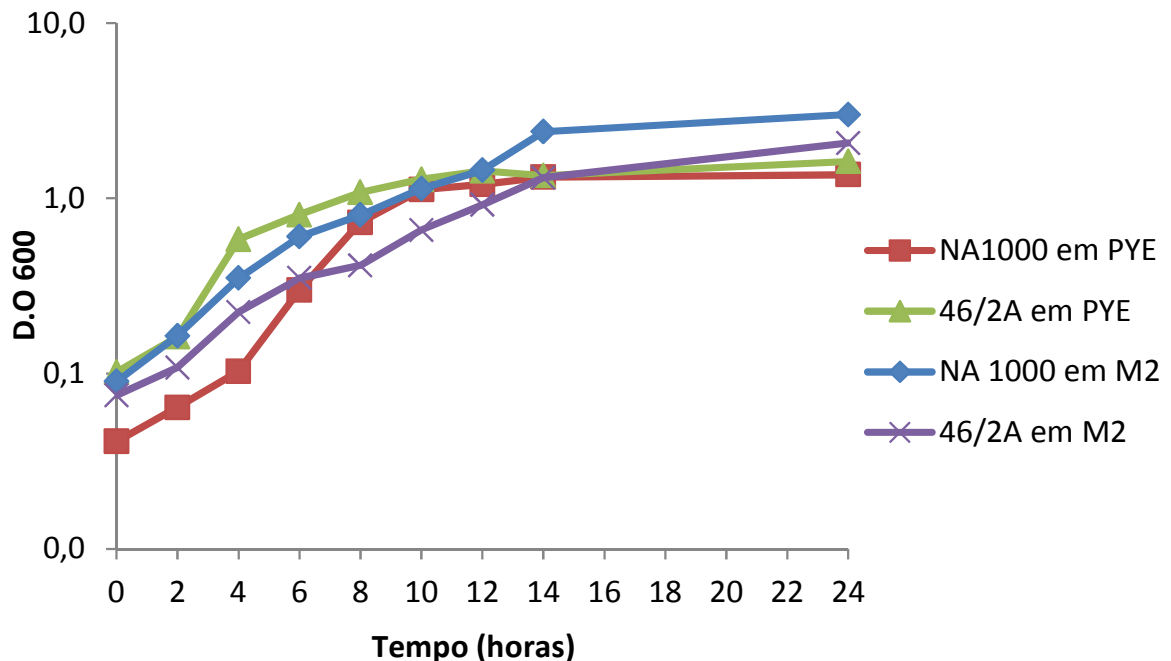
O gene interrompido pelo Tn5 no mutante 46/2A foi o gene CC3167, que codifica uma proteína de 315 aminoácidos da família das Glicoquinases. Glicoquinases são enzimas encontradas em invertebrados e microorganismos e estão envolvidas no metabolismo de

RESULTADOS

carboidratos, onde fosforilam glicose utilizando ATP originando glicose-6-fosfato e ADP (MEYER et al., 1997).

A curva de crescimento do mutante 46/2A foi analisada em meio PYE e meio M2G, para observar o padrão de crescimento deste mutante em meio com glicose em relação à linhagem NA1000 (linhagem selvagem) (Figura 13)

Figura 13 - Curva de crescimento de NA1000 e mutante 46/2A.



As curvas de crescimento da linhagem *C. crescentus* NA1000 e linhagem mutada no gene CC3167 foram realizadas em meios M2G e PYE, onde foram tirados pontos de 2 em 2 horas até 14 horas e um ponto de 24 horas. A absorbância foi lida a 600 nm

FONTE: da Silva, C. A P. T.

A curva de crescimento mostra um crescimento mais lento da linhagem mutada em meio M2 contendo glicose em relação à linhagem NA1000. Isso pode ser um resultado da deficiência na fosforilação da glicose (única fonte de carbono neste meio), que na linhagem selvagem possivelmente é parcialmente realizada pela glicoquinase ausente em 46/2A. No meio PYE a fonte de carbono é a peptona, possuindo todos os aminoácidos necessários para o crescimento desta bactéria, sendo, portanto, desnecessária a realização da via Entner Doudoroff, o que poderia explicar a ausência de diferenças nas taxas de crescimento.

C. crescentus é uma bactéria oligotrófica, sendo capaz de colonizar ambientes com escassez de nutrientes. Durante o crescimento em meio M2 com glicose, *C. crescentus* expressa vários genes codificantes de componentes das vias de biossíntese de aminoácidos

RESULTADOS

como leucina, isoleucina, valina, serina, treonina, cisteína, metionina, glutamina e glutamato, e, além disso, sintetiza também várias enzimas da via Entner Doudoroff (uma via alternativa à via glicolítica) para o catabolismo da glicose (HOTTES et al., 2004). A glicoquinase codificada por CC3167 possui dois pequenos domínios transmembrana, sendo uma proteína de membrana interna, que pode estar envolvida no processo de catabolismo de glicose, deixando deficiente o crescimento do mutante em meio rico em glicose. Através de busca em banco de dados KEGG, foi visto que o gene CC3167 é um parálogo ao CC2054, que também codifica uma glicoquinase, que participa ativamente na via metabólica da glicose em *C. crescentus*. Com base em estudos de microarranjos de DNA, mostrou-se que CC2054 tem sua expressão aumentada em M2G em relação a M2 contendo xilose (2.73 vezes) e PYE (3.27 vezes) (HOTTES et al., 2004). Logo, pode ser que a proteína codificada pelo gene CC3167 seja uma glicoquinase alternativa, com função semelhante à da proteína codificada pelo gene CC2054, mas apresentando participação no metabolismo de glicose de *C. crescentus*. Contudo, essa participação pode ser menor, pois a célula continua viável apesar do crescimento lento em meio contendo glicose, como visto na figura 13.

Mutante 2/6F

O mutante 2/6F tem o transposon Tn5 inserido no gene CC2587, que codifica para um transportador do tipo ABC. Transportadores do tipo ABC são uma grande família de proteínas, responsáveis pelo transporte de uma variedade de componentes que atravessam a membrana interna, e em sua maioria são compostas por duas cópias do domínio ABC transportador e dois domínios transmembrana. Essa grande família de proteínas utiliza-se da hidrólise de ATP para realizar a exportação e importação de uma grande variedade de substratos, de pequenos íons a macromoléculas. (HIGGINS et al., 1990).

Em geral, transportadores do tipo ABC não variam sua expressão durante o crescimento no meio com xilose e somente um foi induzido por glicose em *C. crescentus*. Foi verificado que o gene CC2587 não apresenta mudança significativa de expressão entre os meios utilizados: M2G, PYE e M2X (HOTTES et al., 2004). Uma vez que a mutação no gene CC2587 diminui significativamente a expressão de *cspD* é possível imaginar que o transportador do tipo ABC codificado por este gene seja responsável pelo transporte de uma substância que de alguma maneira module a expressão de *cspD*.

RESULTADOS

4.3 Construção e varredura de nova biblioteca de mutantes por inserção do transposon Tn5

Devido à dificuldade em achar o ativador transcricional do gene *cspD*, uma nova biblioteca por inserção do transposon foi construída. Essa biblioteca foi obtida pela inserção do transposon Tn5 (que contém uma marca de resistência a canamicina) no genoma de *C. crescentus* NA1000 por conjugação com *E. coli* S17-1 contendo o plasmídeo pSUP2021. Após a conjugação, foram obtidas aproximadamente 2500 colônias.

A varredura desta biblioteca foi realizada da mesma maneira que a biblioteca anterior de 5000 clones. No ensaio de X-Gal foram selecionados 213 mutantes em fase estacionária para posterior ensaio de β -Galactosidase. O ensaio de β -Galactosidase mostrou 26 mutantes com expressão reduzida, dos quais 7 foram selecionados para identificação (Tabela 7).

Tabela 7 - Atividade de β -Galactosidase nos mutantes selecionados.

Mutantes (placa/posição)	Unidades Miller ^a	Mutantes (placa/posição)	Unidades Miller ^a
Controle positivo	4.100	Controle negativo	600
1/6G*	512	7/11B	2310
1/2C	1420	7/5F	1421
4/2G	1218	9/5G	1451
4/5G	1282	9/6D	2673
5/6G	1647	9/8D	2357
5/3G*	907	9/2E	1753
5/3A*	1099	9/6G	3234
5/4A	1202	9/2E	1557
5/1H*	665	9/7F	2085
5/4E*	1101	9/9D	2185
5/3H	1208	10/5F	1630
6/3A	2269	24/5E*	1072
6/12D	1696	23/11C*	482

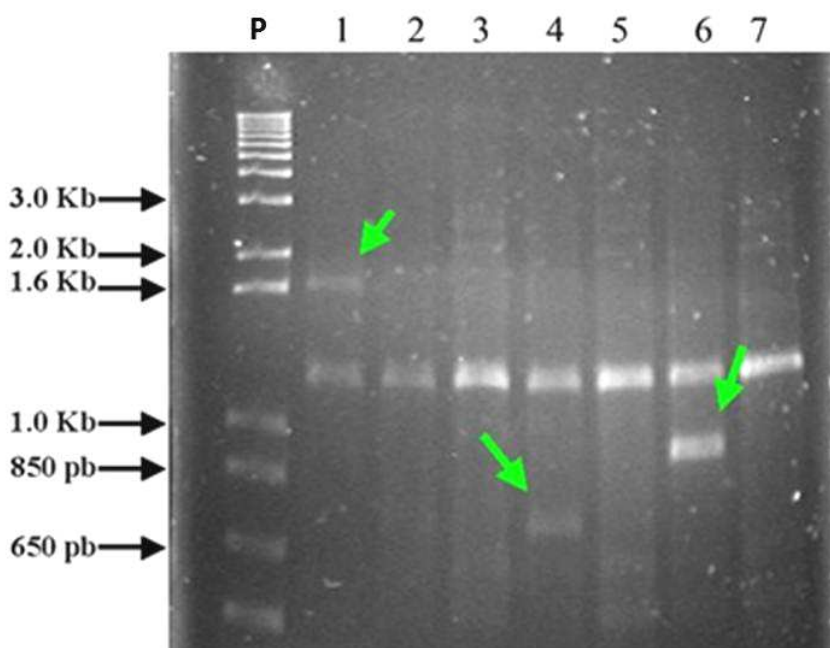
^aUnidades Miller: Unidades de atividade enzimática.

* mutantes selecionados para sequenciamento.

A identificação de alguns mutantes foi realizada através do método de PCR reverso descrito no item 3.7.2. As bandas amplificadas na PCR estão apresentadas na figura 14. A banda de aproximadamente 1,6 Kb do mutante 24/5E, a banda de 700 pb do mutante 23/11C e a banda de 900 pb do fragmento 1/6G foram recuperadas do gel, purificadas e clonadas no vetor pGEM. As bandas de 1,2 Kb não foram recuperadas, pois aparecem em todos os mutantes e deve-se tratar de uma banda inespecífica. Através deste método, foi possível a identificação do gene interrompido pelo Tn5 nos mutantes 1/6G, 23/11C e 24/5E (Tabela 8).

RESULTADOS

Figura 14 - Visualização da reação de PCR reverso (2ª biblioteca).



(P) padrão de peso molecular 1 Kb plus; (1) o mutante 24/5E com o fragmento de em torno de 1,6 Kb; (2) o mutante 5/3A; (3) o mutante 5/3G; (4) o mutante 23/11C com o fragmento com 700 pb; (5) o mutante 5/1H; (6) o mutante 1/6G com o fragmento com 900 pb; (7) o mutante 5/4E.

FONTE: da Silva, C. A P. T.

Tabela 8 - Identificação dos genes interrompidos nos mutantes da segunda biblioteca.

Linagem	Gene	Proteína (características)
1/6G	CC2027	Proteína hipotética
23/11C	CC0247	Regulador de resposta
24/5E	CC2103	Proteína hipotética

Nesta tabela está indicando o número da linhagem mutante de acordo com a sua posição na placa estoque, o correspondente gene interrompido e a proteína por ele codificada.

Mutante 1/6G

O mutante 1/6G possui o transposon inserido no gene CC2027, que codifica um possível receptor dependente de TonB que possui um domínio Plug. O domínio Plug atua como uma porta, bloqueando o poro de entrada de substâncias externas do sistema receptor dependente de TonB (OKE et al., 2004)

Os receptores dependentes de TonB são responsáveis pelo transporte de moléculas, como a vitamina B12 e sideróforos, através da membrana externa (MOECK; COULTON, 1998). A proteína TonB sempre está associada às proteínas de membrana ExbB e ExbD, para formar o complexo energizador, que vai interagir com a proteína receptora na membrana externa. Os receptores dependentes de TonB possuem o domínio Plug que atua como um bloqueio do canal do sistema protéico. O mesmo recebe um sinal externo que é transmitido

RESULTADOS

através da membrana, até a proteína TonB, que por sua vez se liga ao domínio Plug causando uma mudança conformacional no sistema protéico, desbloqueando o canal e possibilitando o transporte de substâncias externas para dentro da célula (USHER et al., 2001).

Mesmo sendo uma proteína hipotética conservada, é muito provável que o gene CC2027 esteja relacionado com o transporte de substâncias externas para dentro da célula, e afete indiretamente a expressão de *cspD*.

Mutante 24/5E

No mutante 24/5E foi identificada a inserção do Tn5 no gene CC2103 que codifica uma proteína hipotética de 157 aminoácidos. Essa proteína possui um domínio 4HBT (cuja identificação no PFAM é PF03061) presente na grande família das proteínas tioesterases, onde o sítio ativo da enzima tem atividade catalítica.

Estas enzimas participam de muitos processos metabólicos, especialmente na biossíntese de ácidos graxos. Devido à amplitude de possibilidades, não fica claro seu papel quanto à regulação de *cspD*.

Mutante 23/11C

No mutante 23/11C foi identificada a inserção do transposon no gene CC0247, que codifica para uma proteína de 185 aminoácidos anotada como um regulador de resposta de sistema de dois componentes. Na figura 15 estão representados os domínios da proteína, um domínio de regulador de resposta tipo Che-Y e um domínio HTH de ligação ao DNA. Na região do genoma onde está posicionado o gene CC0247 existe a montante do mesmo o gene CC0248, que codifica uma histidina-quinase, formando um provável operon (Figura 16).

Figura 15 - Domínios da proteína codificada pelo gene CC0247

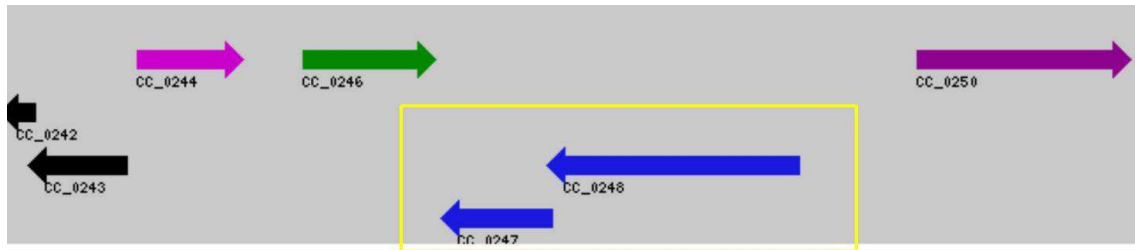


Em verde está demonstrado o domínio de regulador de resposta e em vermelho o domínio HTH de ligação ao DNA.

FONTE: Obtido do site <http://pfam.sanger.ac.uk>

RESULTADOS

Figura 16 - Posição dos genes CC0248 e CC0247 na região do genoma de *C. crescentus*

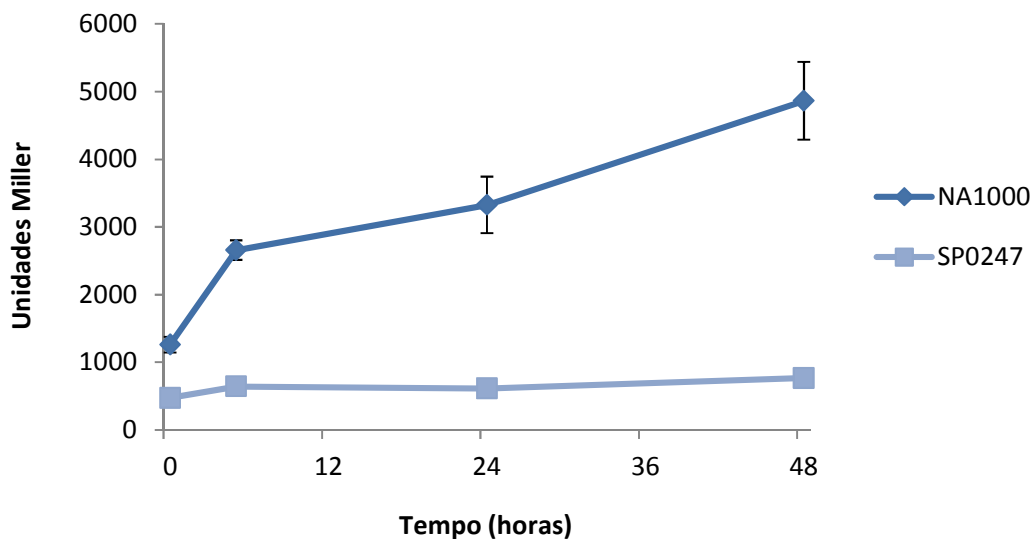


A figura mostra a localização do gene CC0247 e a montante o gene CC0248 que codifica uma proteína histidina quinase.

FONTE: Obtido do site <http://cmr.jcvi.org/cgi>

No ensaio de β -Galactosidade o mutante para CC0247 (chamada linhagem SP0247) não apresentou indução dos níveis de expressão em fase estacionária (Figura 17). Os níveis de expressão foram semelhante aos da linhagem NA1000 contendo a construção pEL5, que não possui a provável região que se liga a proteína ativadora. Assim, é muito provável que este regulador de resposta seja o regulador direto de transcrição do gene *cspD*, que se liga na região -98 a -73 . Como um regulador de resposta de dois componentes, é muito provável que ele seja fosforilado pelo produto do gene CC0248, que codifica uma proteína sensora histidina-quinase. Essa histidina-quinase possui um domínio sensor transmembrana, e este deve identificar um sinal externo, que pode ao final regular a transcrição de *cspD*.

Figura 17 - Expressão de *cspD* no mutante SP0247.



A linhagem mutante SP0247 (NA1000 *spdR*::Tn5) contendo o plasmídeo pEL4 e a linhagem selvagem NA1000 contendo pEL4 cresceram em meio PYE. Gráfico de atividade de β -Galactosidase onde foi analisada expressão em fase exponencial (ponto 0) e fase estacionária (pontos 6, 12, 24 e 48 horas).

FONTE: da Silva, C. A. P. T.

RESULTADOS

4.4 Estudo da expressão do gene *cspD* em carência de glicose ou nitrogênio

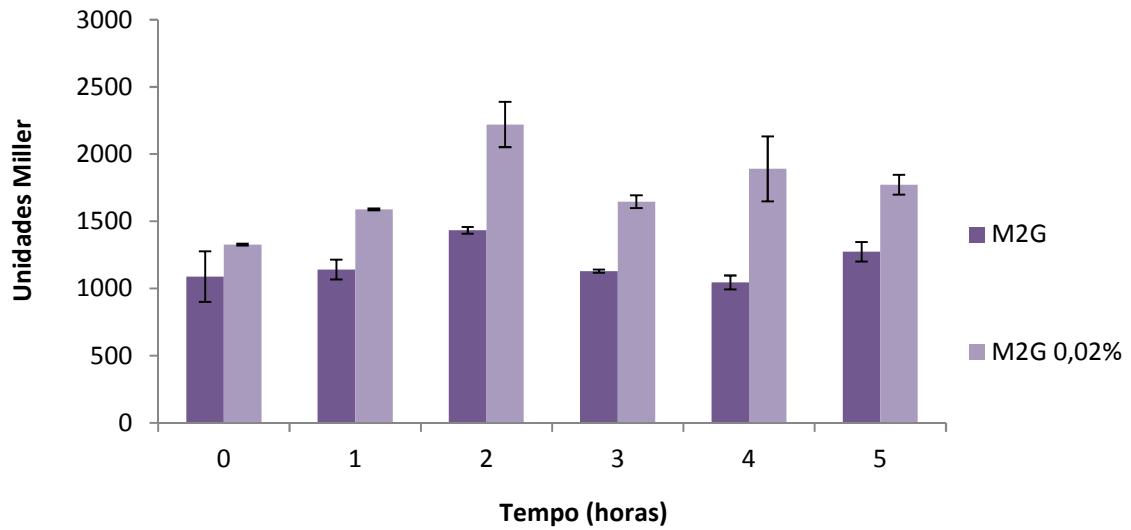
Estudos da expressão do gene *cspD* de *E.coli* demonstram que CspD é induzida em fase estacionária por carência de carbono, consistente com o fato de que em carência de nutrientes ocorre inibição da replicação do DNA (YAMANAKA; INOUE, 1997). Em vista destes estudos, foram realizados ensaios para avaliar a expressão do gene *cspD* de *C. crescentus* em diferentes condições nutricionais. Culturas de NA1000 contendo o plasmídeo pEL4 ou pEL5 foram incubadas em meios com diferentes composições e através de ensaios de β -galactosidase foi medida a atividade do promotor de *cspD* na fase exponencial. Na figura 18 o ensaio foi realizado com a linhagem NA1000 (pEL4), demonstrando um aumento de atividade do promotor de *cspD* em meio M2 contendo 0,02% de glicose na fase exponencial (em torno de 35% em relação ao meio M2G). A figura 19 mostra um ensaio de NA1000 com o plasmídeo pEL5, que não contém a região ativadora do gene, demonstrando uma indução similar à indução na figura 18, porém com níveis menores de expressão. No ponto de 5 horas a expressão em meio M2G chega a 60% da expressão em meio M2G 0,02%.

Evidencia-se, assim, que a região ativadora do gene *cspD* não é necessária para a indução por carência de carbono, pois o aumento de expressão ocorre em pEL4 e em pEL5. Demonstra também que o meio em que a célula cresce tem efeito sobre a expressão deste gene e que a atividade do promotor pode estar sofrendo uma repressão pela glicose.

Visto que a expressão do gene *cspD* é regulada em função da fase de crescimento, pode-se supor que certas condições nutricionais aumentem a expressão do gene, já que um dos fatores que caracterizam a fase estacionária é a carência nutricional (NYSTRÖM, 2004). Foi realizado também um ensaio de carência de nitrogênio (Figura 20), e neste ensaio foi demonstrado que a expressão *cspD* não é afetada por carência de nitrogênio.

RESULTADOS

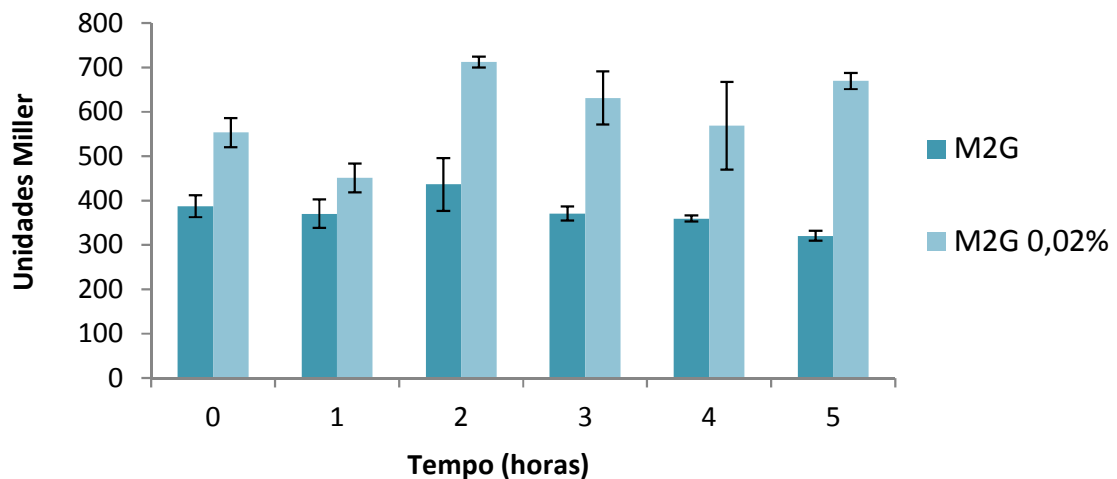
Figura 18 - Expressão dirigida por pEL4 em carência de glicose.



A atividade do promotor foi medida na fase exponencial e no momento em que as células entram em carência de glicose por ensaio de atividade de atividade de β -Galactosidase. A linhagem NA1000 contendo o plasmídeo pEL4 cresceu em meio M2G ou em meio M2G 0,02%.

FONTE: da Silva, C. A P. T.

Figura 19 - Expressão dirigida por pEL5 em carência de glicose.

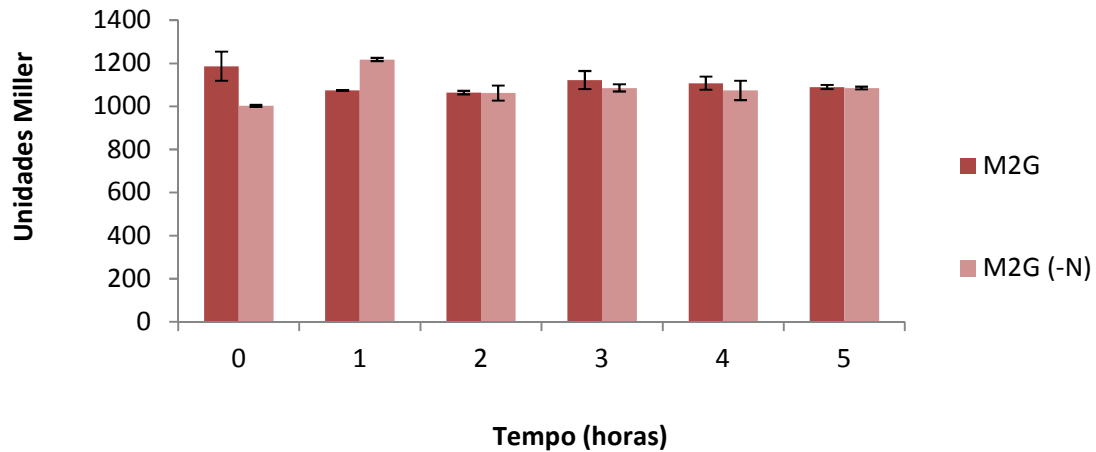


A atividade do promotor foi medida na fase exponencial e no momento em que as células entram em carência de glicose por ensaio de atividade de atividade de β -Galactosidase. A linhagem NA1000 contendo o plasmídeo pEL5 cresceu em meio M2G ou em meio M2G sem 0,02%.

FONTE: da Silva, C. A P. T.

RESULTADOS

Figura 20 - Expressão dirigida por pEL4 em carência de amônia.



A linhagem NA1000 contendo o plasmídeo pEL4 foi cultivada em meio M2 contendo 0,2% de glicose e em meio M2 contendo 0,2% glicose e sem amônia. Gráfico de atividade de β -Galactosidase onde foi analisada expressão em fase exponencial e em ausência de amônia.

FONTE: da Silva, C. A P. T.

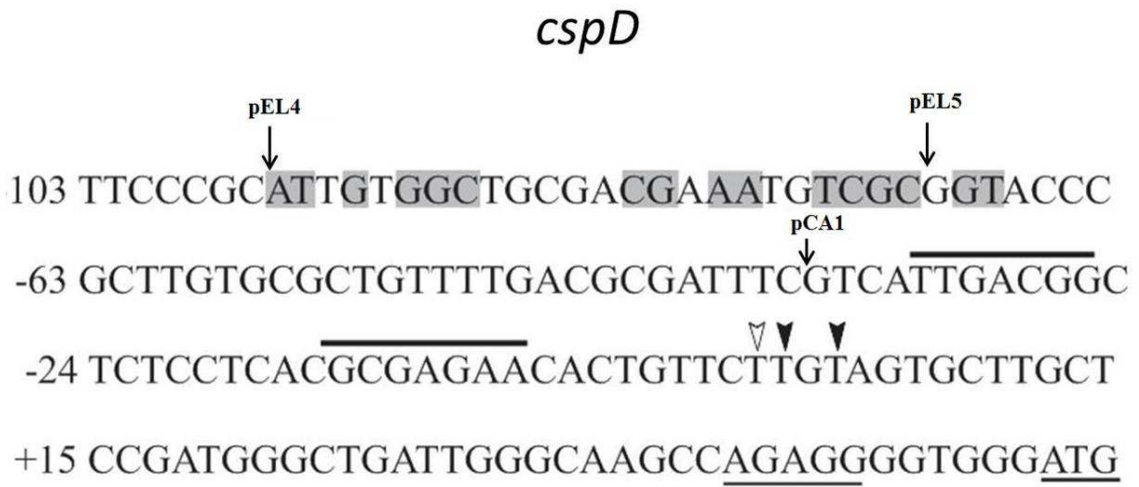
4.5 Mapeamento da região regulatória do promotor de *cspD*

Nos ensaios de expressão, nota-se que a construção pEL5 possui níveis de expressão 10 vezes menores que a construção pEL4. Entretanto, mesmo não contendo a região de possível ligação da proteína regulatória, nestes ensaios verifica-se um aumento de expressão de fase exponencial para fase estacionária e na situação de carência de carbono. A região -73 a -35 poderia ter algum papel na regulação do gene *cspD*, talvez na indução na fase estacionária.

Deste modo foi construído o plasmídeo pCA1 que possui somente a região promotora do gene *cspD* (Figura 21), a fim verificar se esta região influencia a expressão do mesmo .

RESULTADOS

Figura 21 - Posição da extremidade 5' do inserto no plasmídeo pCA1.



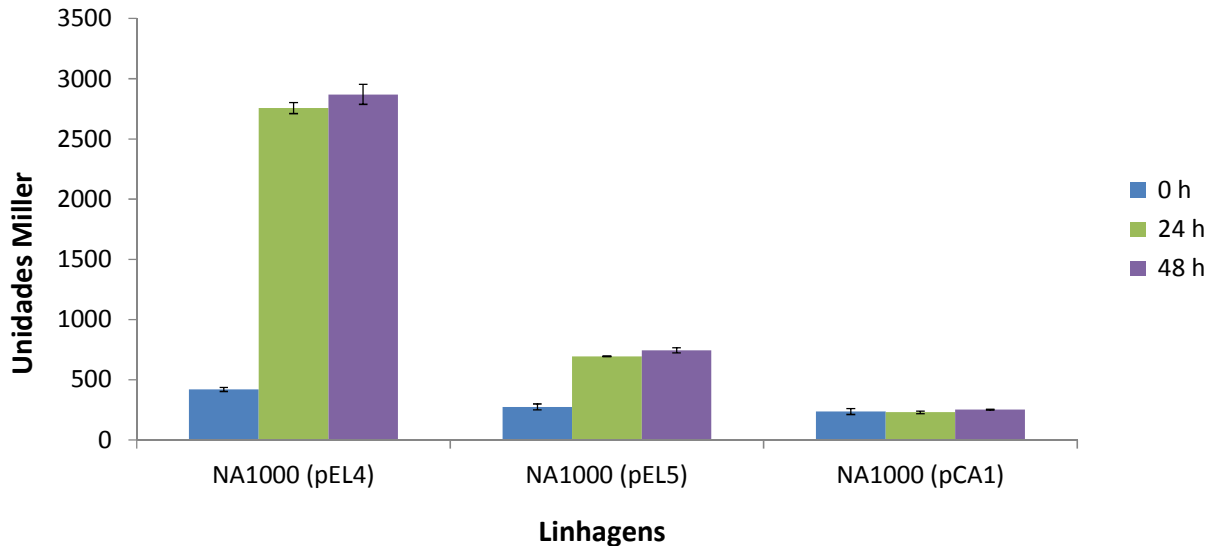
Região regulatória do gene *cspD*. As setas verticais indicam a posição exata da extremidade 5' das construções utilizadas neste trabalho. O início de transcrição está indicado por ponta de seta, e as sequências -35 e -10 estão destacadas por uma linha acima da sequência. O códon de início de tradução está sublinhado e o sítio de ligação ao ribossomo indicado por duplo sublinhado. As setas indicam duas repetições diretas imperfeitas e os oligonucleotídeos sombreados indicam a sequência conservada entre o gene *cspC* e *cspD*.

FONTE: Modificado de Lang e Marques (2004).

Primeiramente foi realizada uma PCR para amplificar a região promotora do gene *cspD* (850 pb) que foi clonado no vetor de clonagem pGEM. O fragmento foi clonado frente ao gene *lacZ* em um plasmídeo repórter (pRK*lacZ*290), previamente digerido com as mesmas enzimas do fragmento (pCA1). O plasmídeo pCA1 foi introduzido na linhagem NA1000 e a atividade promotora foi medida por ensaio de β -galactosidase, tanto na fase exponencial como estacionária de crescimento (Figura 22). O resultado mostra uma expressão mínima em ambas as fases de crescimento o que sugere que a região -73 a -35 também é importante para a expressão de *cspD*.

RESULTADOS

Figura 22 - Expressão dirigida por diferentes construções da região regulatória do gene *cspD*.



As linhagens NA1000 (pEL4), NA1000 (pEL5) e NA1000 (pCA1), foram incubadas em PYE. A expressão foi analisada por ensaio de β -Galactosidase na fase exponencial (tempo 0) e na fase estacionária (tempos 24, 48 horas).

FONTE: da Silva, C. A P. T.

4.6 Ensaio de expressão de *cspD* no mutante nulo $\Delta spoT$ e em diferentes condições nutricionais

Estudos demonstram que a expressão de genes induzidos em fase estacionária geralmente está ligada à carência nutricional (NYSTRÖM, 2004). Após a entrada na fase estacionária ou após a carência de aminoácidos os níveis de ppGpp na célula são aumentados e talvez *cspD* possa ser regulado também por ppGpp.

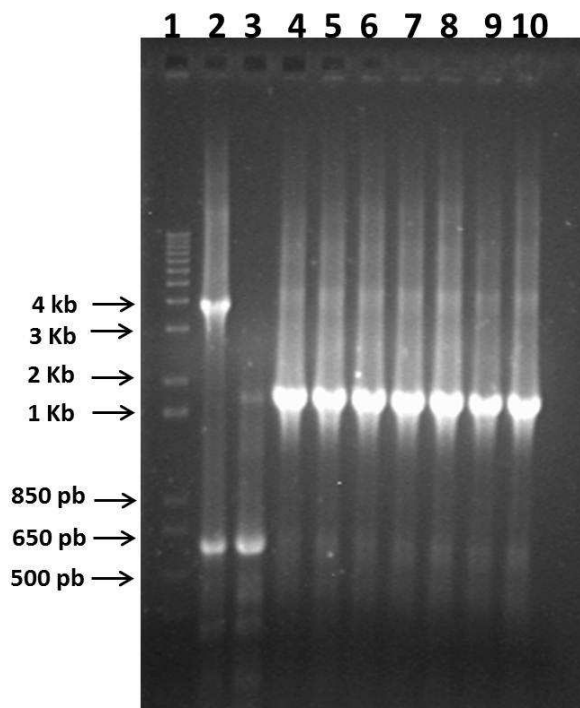
Para estudar o papel de ppGpp na expressão de *cspD*, foi construído um mutante nulo do gene CC1553 que codifica a proteína SpoT. A fim de obter um mutante nulo para o gene *spoT* (CC1553) os fragmentos flanqueadores a jusante e a montante do gene foram amplificados e clonados no vetor pNPTS138, que não é replicativo em *C. crescentus*.

O plasmídeo contendo os dois fragmentos clonados e unidos foi introduzido na linhagem NA1000 por conjugação. O pNPTS138 integra-se através de recombinação homóloga proporcionada pela similaridade entre sequências introduzidas no vetor e as presentes no genoma, conferindo resistência a canamicina aos recombinantes. As colônias que sofreram a segunda recombinação e perderam o plasmídeo foram selecionadas pela sua capacidade de formar colônias em meio contendo sacarose, que na presença do pNPTS138 é convertida através do produto do gene *sacB* em um metabólito tóxico matando a célula.

RESULTADOS

Sete colônias resultantes da segunda recombinação foram testadas por PCR para verificação da presença da deleção ou da reversão ao selvagem. A varredura realizada na detecção da mutação em *spoT* utilizou os oligonucleotídeos RelA-4 e RelA-5. Assim, os fragmentos obtidos por amplificação na PCR produziram bandas de 1,9 Kb (1,150 Kb a montante do gene + 750 pb a jusante do gene). Na linhagem NA1000 sem mutação deveria haver uma banda de 4,1 Kb e na linhagem NA1000 com 1º recombinação deve aparecer uma banda de 9,4 Kb (4,1 Kb + 5,3 Kb do pNPT138) (Figura 23).

Figura 23 - Confirmação da ocorrência de dupla recombinação do mutante $\Delta spoT$



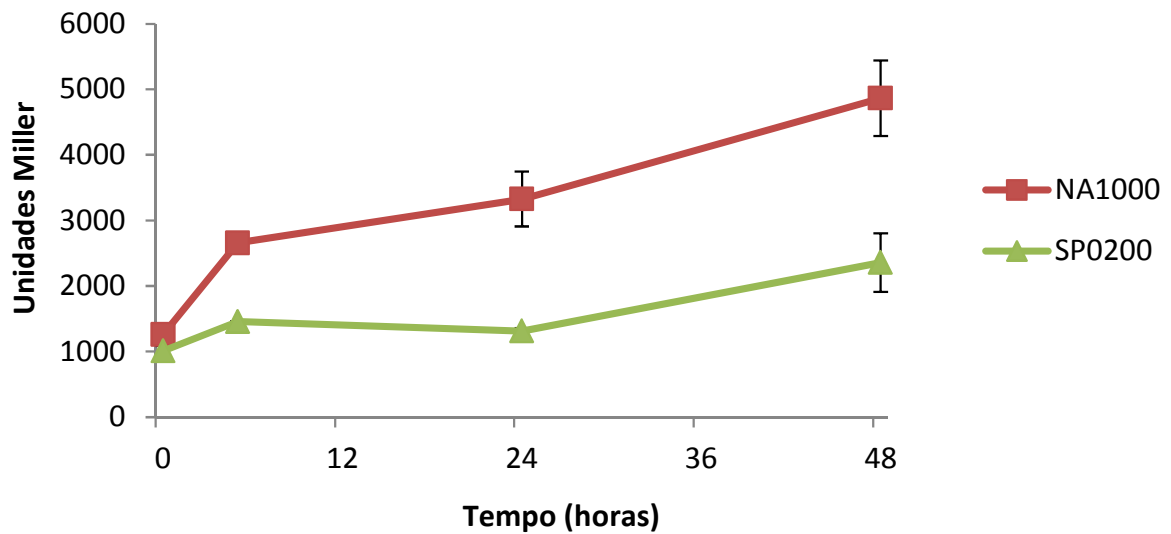
Gel de agarose com os fragmentos obtidos na PCR de confirmação da primeira e segunda recombinação. O mutante aparece com um fragmento esperado de 1,9 Kb (canaletas 4 a 10), a linhagem selvagem NA1000 com um fragmento de 4,1 Kb (canaleta 2), e o fragmento da 1º recombinação não aparece pois é muito grande e não foi amplificada (canaleta 3).

FONTE: da Silva, C. A P. T.

A expressão de *cspD* neste mutante (nomeado SP0200) foi analisada através de ensaio de atividade de β -Galactosidase, em fase exponencial e fase estacionária (Figura 24). Neste ensaio foi observada uma diminuição de 50% da expressão de *cspD* na fase estacionária em meio PYE no mutante *spoT* quando comparado à NA1000. Como ppGpp atua positivamente na regulação de genes de estresse, aumentando os níveis de expressão do gene *cspD* de *E. coli* (YAMANAKA; INOUE, 1997), nossos resultados indicam que esta molécula também está agindo positivamente sobre regulação de *cspD* de *C. crescentus*.

RESULTADOS

Figura 24 - Avaliação da expressão de *cspD* na linhagem selvagem NA1000 e no mutante SP0200.



As linhagens NA1000 ou SP0200 carregando o plasmídeo pEL4 foram incubadas em meio PYE a 30 °C e utilizadas para determinação da atividade de β -galactosidase em fase exponencial (ponto 0) e fase estacionária (pontos 6, 12, 24 e 48 horas).

FONTE: da Silva, C. A P. T.

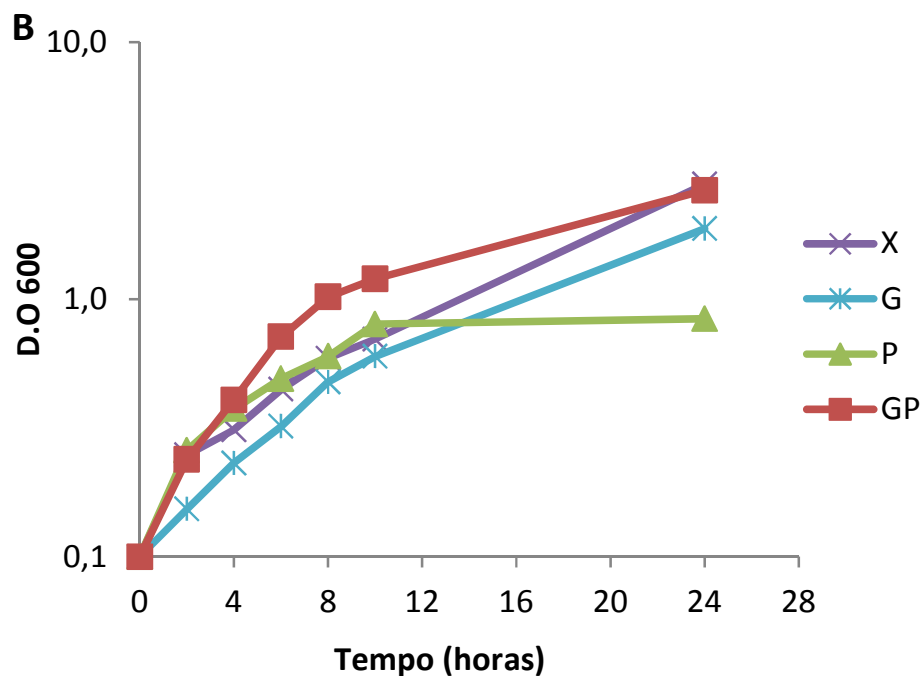
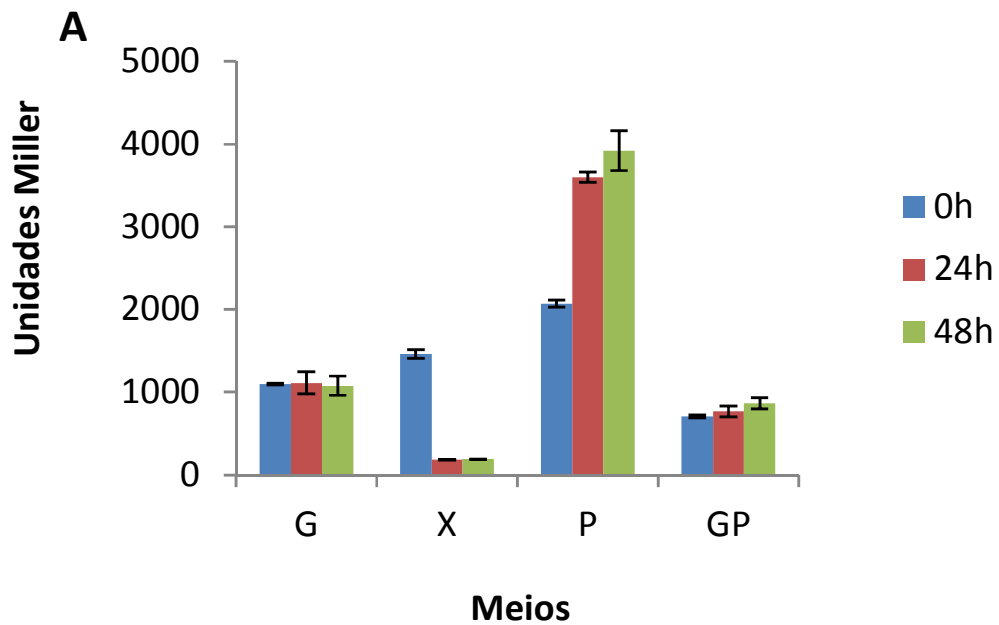
Novos ensaios de expressão foram realizados para determinar mais precisamente se diferentes fontes de carbono afetam a expressão do gene *cspD*. As células cresceram em cada um dos meios contendo diferentes fontes de carbono, e a expressão do gene *cspD* foi medida por ensaio de atividade de β -Galactosidase no meio da fase exponencial e na fase estacionária (24 h e 48 h). Como observado na figura 25, o gene *cspD* é altamente induzido em meio M2 contendo peptona, similar ao que foi observado em meio PYE (LANG; MARQUES, 2004), mas não em meio contendo açúcares (o gene não é induzido em meio M2G e é reprimido em M2X). Além disso, nos meios contendo glicose e peptona simultaneamente, há uma diminuição dos níveis máximos da expressão de *cspD*, sugerindo que a presença de glicose possa estar inibindo a expressão do promotor.

Analisando-se a curva de crescimento das culturas em cada meio, pode-se observar que o crescimento em meio contendo açúcares é maior do que o crescimento em meio contendo somente peptona (Figura 25B). De fato, aparentemente a expressão do gene é inversamente proporcional à taxa de crescimento e esse efeito pode ser independente da fonte de carbono utilizada.

RESULTADOS

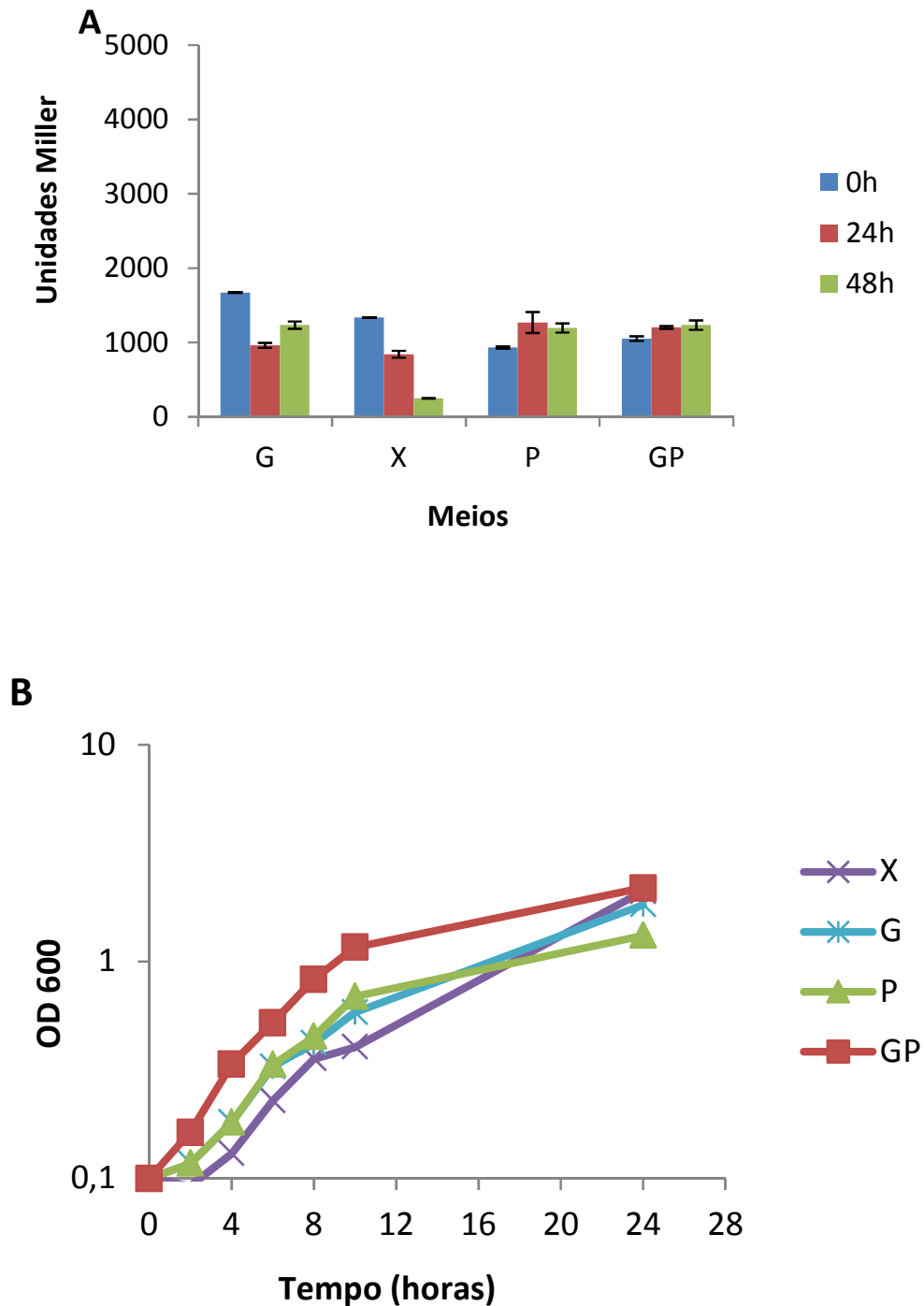
Esse resultado pode indicar que a indução do gene de alguma maneira está respondendo à taxa de crescimento ao invés da fonte de carbono utilizada no meio. Este mesmo efeito primeiramente foi observado em *E. coli*, onde a expressão de *cspD* também varia em diferentes fontes de carbono, e os resultados indicaram que a expressão de *cspD* é inversamente proporcional à taxa de crescimento (YAMANAKA; INOUE, 1997).

Para separar o efeito da fonte de carbono e taxa de crescimento, a expressão do gene *cspD* foi analisada no mutante nulo *spoT*. A linhagem SP0200 (NA1000 $\Delta spoT$) carregando o plasmídeo pEL4 cresceu nos mesmos meios que a linhagem selvagem NA1000. A expressão do gene foi medida por ensaio de β -Galactosidase e como mostra a figura 26A, a indução do promotor de *cspD* em M2 peptona na fase estacionária é perdida. Quando a curva de crescimento de cada meio foi analisada, pode-se notar que a taxa de crescimento das culturas são altas em todos os meios e que novamente a expressão de *cspD* apresenta-se inversamente proporcional a taxa de crescimento (Figura 26B). A indução de *cspD* em meio M2 peptona foi restabelecida quando a linhagem SP0200 foi complementada com o plasmídeo que continha o gene *spoT* (pCA38) (Figura 27A). Além disso, a indução observada em meio com baixa concentração de glicose não ocorreu na linhagem *spoT* (Figura 27B), diferentemente do observado na linhagem selvagem, indicando que a sinalização por carência de glicose é dependente da proteína SpoT.

RESULTADOS**Figura 25** - Expressão de *cspD* em diferentes meios na linhagem selvagem NA1000

(A) A linhagem selvagem NA1000 carregando o plasmídeo pEL4 foi inoculada a 30°C em diferentes meios: M2G, M2X, M2P e M2GP. A expressão do promotor de *cspD* foi medida através de ensaio de β -galactosidase no meio da fase exponencial e na fase estacionária. (B) Curva de crescimento da linhagem NA1000 carregando o plasmídeo pEL4 nos diferentes meios utilizados.

FONTE: da Silva, C. A P. T.

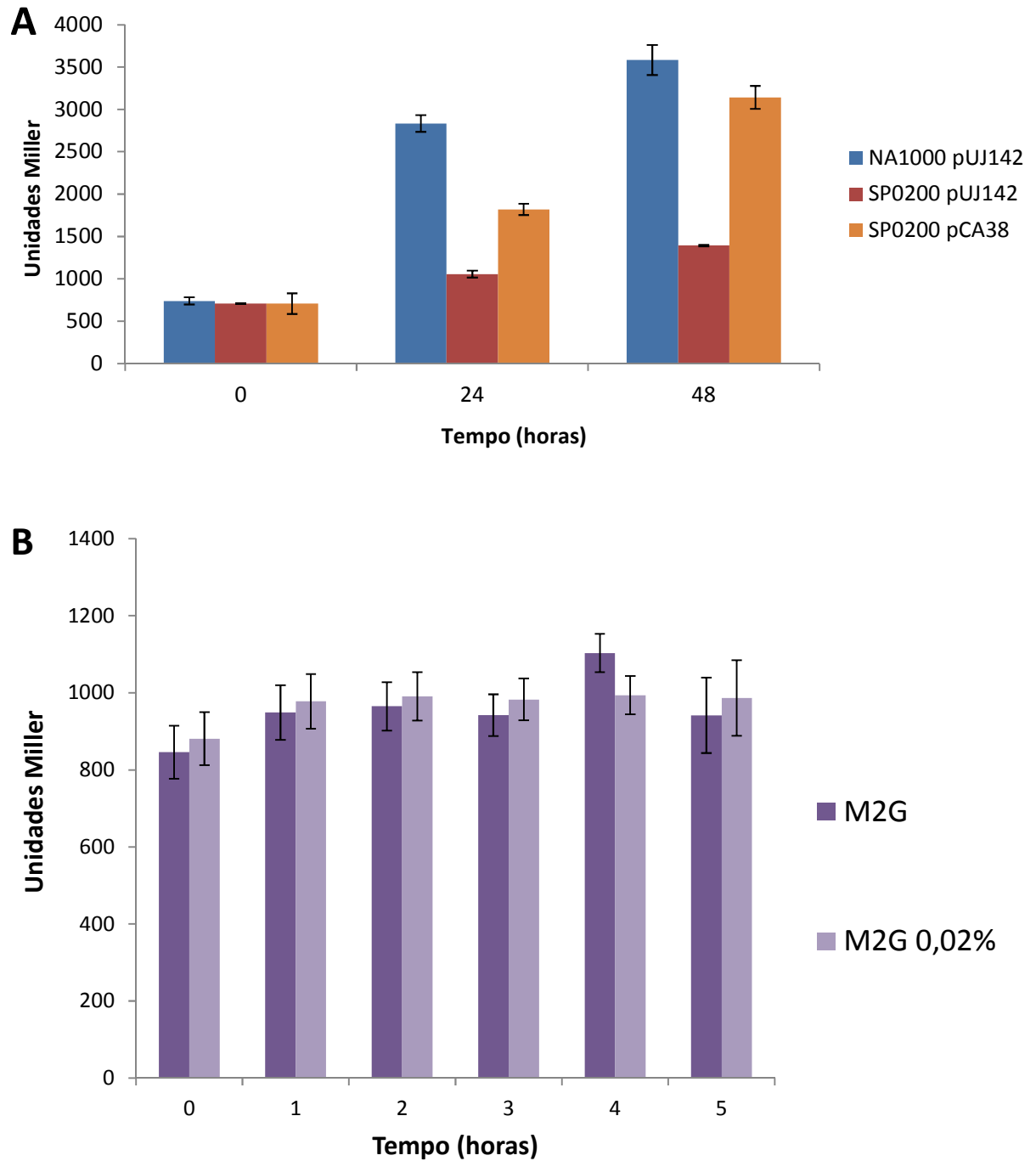
RESULTADOS**Figura 26** - Expressão de *cspD* em diferentes meios na linha mutante SP0200.

(A) A linhagem mutante SP0200 carregando o plasmídeo pEL4 foi inoculada a 30°C em diferentes meios: M2G, M2X, M2P e M2GP. A expressão dirigida pelo promotor de *cspD* foi medida através de ensaio de β -galactosidase no meio da fase exponencial e na fase estacionária. (B) Curva de crescimento da linhagem SP0200 carregando o plasmídeo pEL4 nos diferentes meios utilizados.

FONTE: da Silva, C. A P. T.

RESULTADOS

Figura 27 - Expressão de *cspD* na linhagem mutante SP0200



(A) Expressão de *cspD* foi medida por ensaio de β -Galactosidase em *C. crescentus* NA1000 contendo o pUJ142 (coluna azul), SP0200 contendo o pUJ142 (coluna vermelha) e SP0200 contendo o plasmídeo pCA38 (coluna laranja). Este ensaio foi realizado no meio da fase exponencial (tempo 0) e na fase estacionária (24 h e 48 h). (B) A expressão de *cspD* na linhagem SP0200 contendo pEL4 foi medido por ensaio de β -Galactosidase na fase exponencial em meio M2 contendo 0,2% de glicose e em meio M2 contendo 0,02% de glicose.

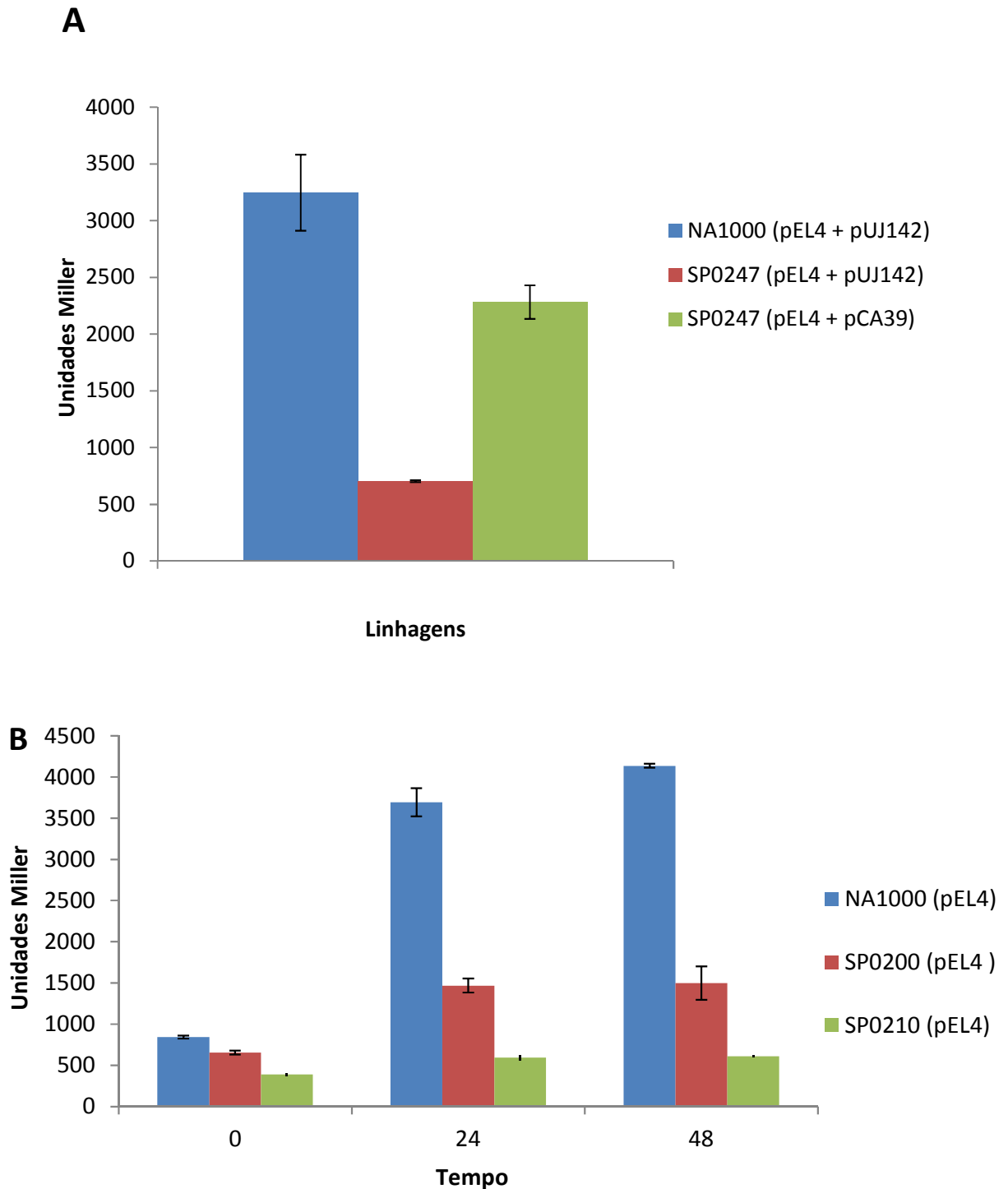
FONTE: da Silva, C. A P. T.

RESULTADOS

4.7 Papel de SpdR e SpdS na ativação da transcrição de *cspD*

A expressão do gene *cspD* no mutante do regulador de resposta (CC0247), foi muito baixa em comparação à linhagem selvagem NA1000, sendo este gene nomeado SpdR (Stationary Phase *cspD* Regulator). O mutante SpdR foi complementado com o plasmídeo contendo a região codificante do gene *spdR* (pCA39), e podemos notar na figura 28 A que a expressão de *cspD* foi parcialmente restabelecida na fase estacionária. Neste plasmídeo o gene *spdR* é controlado pelo promotor do próprio plasmídeo pUJ142 que é controlado por xilose. Como nos ensaios anteriores verificou-se uma forte repressão de *cspD* quando as células crescem em meio com xilose, nos ensaios de complementação não foi adicionada xilose para não haver um efeito de repressão sobre a expressão do gene, esperando-se apenas um vazamento natural da expressão de *spdR*.

Para avaliar como *spdR* e *spoT* estão regulando *cspD*, foi construído um mutante duplo *spdR/spoT*. Pode ser observado na figura 28 B que a atividade do promotor de *cspD* neste mutante foi menor que nos mutantes simples, sugerindo que estes dois reguladores têm importante papel na expressão da regulação do gene *cspD*. Enquanto a expressão de *cspD* no mutante *spoT* ainda aumenta de fase exponencial para fase estacionária em meio PYE, o mutante *spdR* e o duplo mutante não mostram esta indução específica de fase, sugerindo que SpdR é o regulador específico de fase estacionária. Com esses resultados podemos concluir que SpoT está envolvida na resposta por carência de carbono, enquanto SpdR está envolvida na sinalização de alguma mudança fisiológica que a célula sofre, quando entra em fase estacionária.

RESULTADOS**Figura 28** - Expressão de *cspD* na linhagem mutante SP0247 complementada e no mutante SP0210.

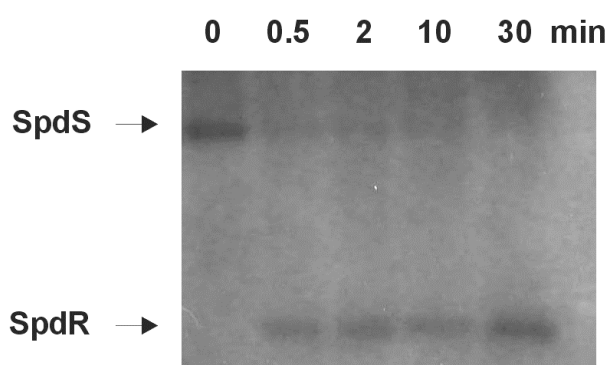
(A) As linhagens NA1000 e SP0247 carregando o plasmídeo pCA39 (contém o gene *spdR*) ou pUJØ foram inoculadas em meio PYE a 30°C. A expressão do gene *cspD* foi medida na fase estacionária (24 horas) por ensaio de β -Galactosidase (B) Ensaio de atividade de β -galactosidase onde a atividade do promotor de *cspD* foi medida em fase exponencial e na fase estacionária nas linhagens NA1000, SP0200 e SP0210 carregando o plasmídeo pEL4.

FONTE: da Silva, C. A. P. T.

RESULTADOS

A proteína SpdR possui um resíduo de ácido aspártico conservado na posição 64 da proteína (D64), que possivelmente recebe o grupo fosforil que vem de uma histidina quinase cognata. Para verificar se SpdS é capaz de se autofosforilar e transferir este fosfato para SpdR, uma fosforilação *in vitro* foi realizada (Figura 29). A incubação de SpdS com [³²P]ATP levou à incorporação de fosfato gama por SpdS em uma reação de autofosforilação típica deste tipo de enzimas (SKERKER, et al. 2005). Adicionando SpdR purificado na reação nota-se uma eficiente transferência do fosfato de SpdS para SpdR após 0,5 min. Estes resultados indicam que SpdS é a histidina quinase cognata de SpdR, e provavelmente trabalham juntas regulando genes em resposta a sinais sentidos na membrana citoplasmática.

Figura 29 - Reação de transferência de fosfato *in vitro*



A proteína purificada SpdS foi autofosforilada com [³²P]ATP e após a autofosforilação foi adicionada à reação a proteína purificada SpdR. A reação foi parada em diferentes tempos e a reação de fosforotransferência foi analisada em gel de SDS-PAGE. Canaleta 1, autofosforilação de SpdS (tempo 0); Canaleta 2 até 5, diferentes tempos de fosforilação (0,5; 10 e 30 minutos).

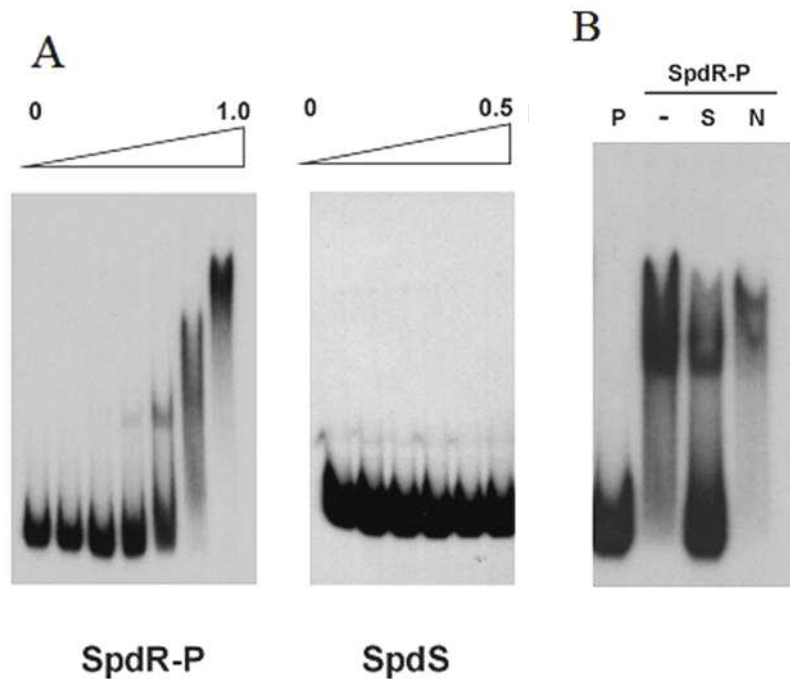
FONTE: da Silva, C. A P. T.

Os níveis de expressão de *cspD* no mutante *spdR* são similares aos níveis vistos na linhagem NA1000 contendo a construção do plasmídeo *lacZ* que não contém a região promotora do gene *cspD* (pEL5, ±500 unidades de β-Gal). Isto sugere que SpdR possa ligar diretamente na região promotora e ativar a transcrição de *cspD*. Para verificar se a proteína SpdR se liga nesta região, foi realizado ensaio de mobilidade em gel (EMSA) com a proteína SpdR purificada e o fragmento que continha a região promotora do gene *cspD*. Como observado na figura 30A, foi visto um retardamento na corrida, dependente do aumento da concentração da proteína SpdR previamente fosforilada. Desta maneira pode-se concluir que SpdR se liga no promotor de *cspD*. Como controle foi realizada uma reação com a proteína SpdS nas mesmas concentrações utilizadas de SpdR, e o resultado esperado era de que a proteína não se ligasse na região promotora de *cspD*, o que foi observado (Figura 30A). Através de ensaio de competição foi mostrado que a ligação de SpdR é específica na região

RESULTADOS

promotora de *cspD* (Figura. 30B). Houve competição com excesso de DNA não marcado (competidor específico), mas isso não aconteceu quando foi utilizado um competidor não específico. Com base nestes resultados, pode-se confirmar que a ligação de SpdR fosforilada no promotor do gene *cspD in vitro* é específica.

Figura 30 - Ligação de SpdR na região promotora de *cspD*



(A) O fragmento de DNA contendo a região regulatória do gene *cspD* foi marcado com ^{32}P e incubada com concentrações crescentes de SpdR (0.025, 0.05, 0.25, 0.5 e 1 μM). SpdR foi incubada em reações de fosforilação com SpdS antes do ensaio de EMSA. Como um controle negativo, foi realizada uma reação com SpdR sem SpdS. (B) No ensaio de competição foi utilizada SpdR na concentração de 0.5 μM previamente fosforilada por SpdS. P, fragmento marcado; -, fragmento marcado incubado com SpdR; S, fragmento marcado incubado com SpdR e excesso de 30x de fragmento específico não marcado; N, fragmento marcado e incubado com SpdR e excesso de 30x de fragmento inespecífico não marcado.

FONTE: da Silva, C. A P. T.

Para demonstrar a importância da fosforilação na ligação de SpdR no promotor do gene *cspD*, o mesmo ensaio de mobilidade em gel foi realizado, só que utilizando a proteína SpdR(D64A), que possui uma substituição do resíduo ácido aspártico na posição 64 pelo códon de alanina. Através de uma busca *in silico* foi verificado que este é o provável resíduo de fosforilação de SpdR, visto que ele pertence a uma região consenso presente em outros reguladores de resposta. Como observado na figura 31A, a proteína contendo a mutação não foi capaz de se ligar na região promotora, sendo que esta proteína foi previamente submetida a ensaio de fosforilação antes do EMSA, indicando que o sítio do ácido aspártico fosforilado é

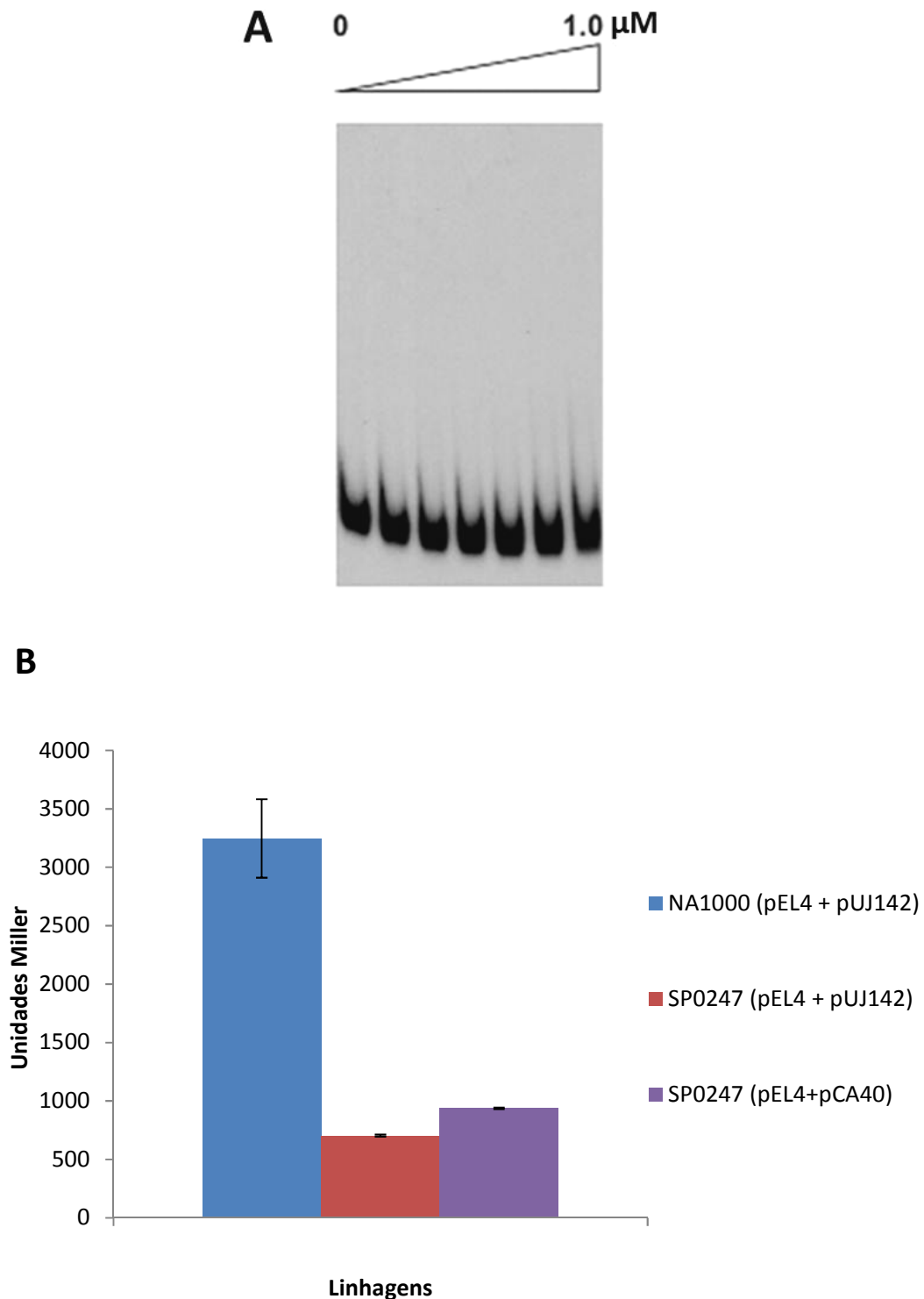
RESULTADOS

necessário para a ligação da proteína no promotor do gene *cspD*. Este resultado foi complementado pelo ensaio de atividade de β -galactosidase com plasmídeo contendo a região codificante do gene *spdR* mutado (Figura 31B). Este resultado mostrou que a proteína falhou na complementação do fenótipo da ativação de *cspD in vivo*, confirmando que a fosforilação de SpdR no resíduo D64 é necessária para a ativação da transcrição de *cspD*.

A região regulatória foi analisada por ensaio de *DNase I footprinting* para determinar a sequência exata de ligação de SpdR (Figura 32B). As sondas contendo a região promotora de *cspD* foram amplificadas com um dos oligonucleotídeos marcado com ^{32}P . Desta maneira, somente uma das fitas do fragmento apresentou-se marcada radioativamente. O DNA marcado foi incubado com concentrações crescentes de SpdR e digerido com DNase I. A região correspondente às posições -89 até -66 foi protegida pela proteína em ambas as fitas (Figura 32A). Dentro desta região há uma sequência repetida invertida separada por 5 nucleotídeos que é o motivo de ligação reconhecido por SpdR. Esta região é necessária para os máximos níveis de expressão do gene *cspD* e nossos resultados mostraram que esta expressão só é possível pela ligação de SpdR nesta região, ativando a transcrição do mesmo.

RESULTADOS

Figura 31 - Efeito da mutação no sítio de fosforilação da proteína SpdR

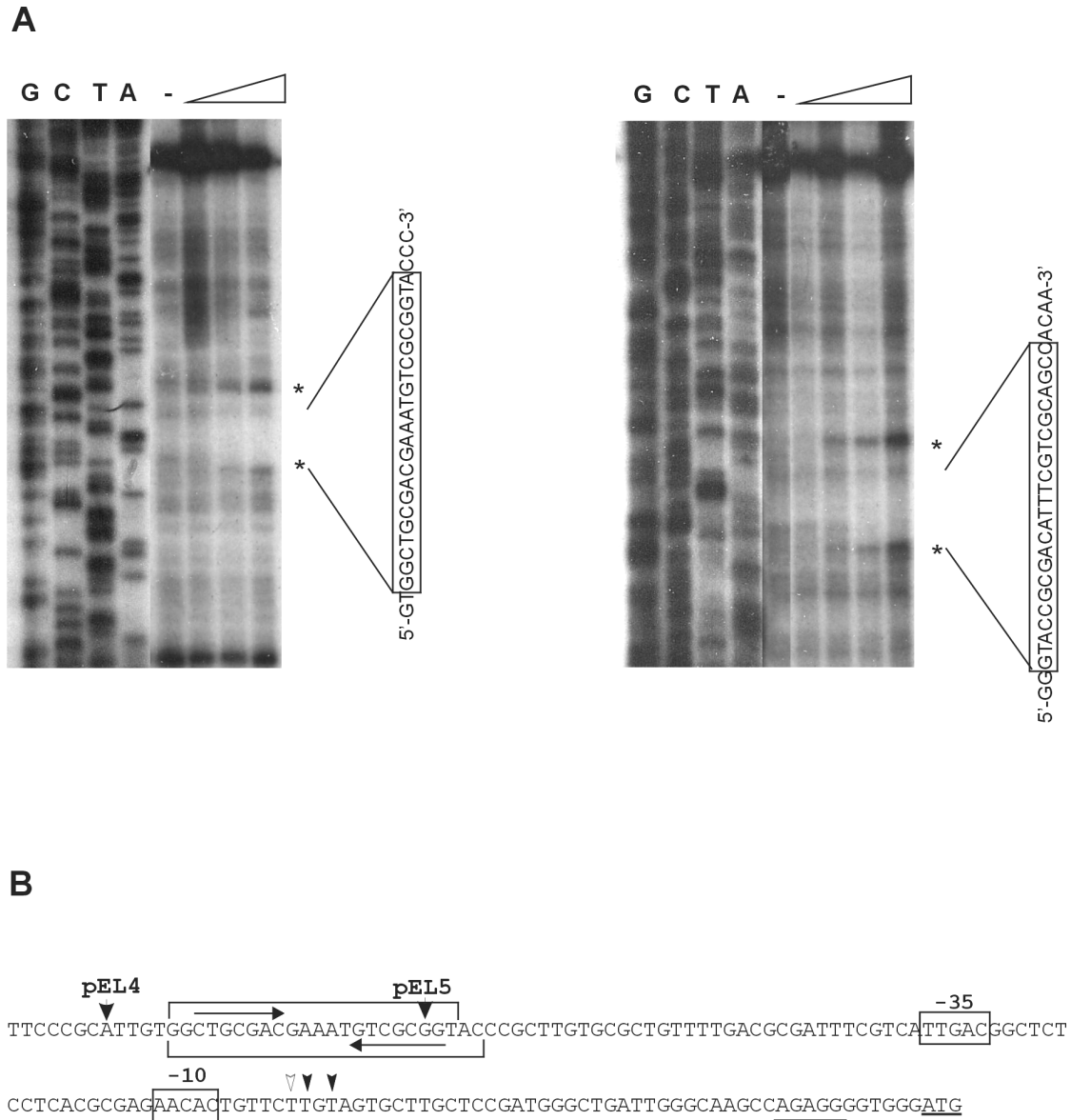


(A) Ensaio de EMSA com o fragmento de DNA contendo a região regulatória do gene *cspD* marcado com ^{32}P incubado com concentrações crescentes (0.025, 0.05, 0.25, 0.5 e 1 μM) da proteína SpdR(D64A) previamente incubada em reação de fosforilação. (B) Análise da expressão do gene *cspD* no mutante *spdR*. As linhagens NA1000 e SP0247 contendo os plasmídeos pUJØ ou pCA40 (contém o gene *spdR*(D64A) mutado), também carregavam o plasmídeo pEL4. As culturas cresceram em meio PYE a 30 °C e a expressão do gene foi medida por ensaio de β -Galactosidase na fase estacionária de 24 horas.

FONTE: da Silva, C. A P. T.

RESULTADOS

Figura 32 - Determinação da sequência de ligação da proteína SpdR.



(A) Ensaio de *DNase I footprinting* com SpdR na região regulatória do gene *cspD*. Amostras contendo a região regulatória do gene *cspD* marcada a 5ª fita simples e incubadas na ausência e presença de SpdR em concentrações crescentes (0.1, 0.25 e 0.5 μ M). As reações foram tratadas com DNaseI, e após o tratamento as amostras foram aplicadas em um gel de sequenciamento de poliácridamida-uréia, juntamente com as reações de sequenciamento realizadas com os mesmos oligonucleotídeos. O sinal de – indica a ausência de SpdR. A região protegida está indicada com a respectiva sequência, e os asteriscos mostram o início e o fim da região protegida por SpdR. (B) A sequência da região regulatória de *cspD*. As regiões –35 e –10 do promotor estão indicadas por um quadrado, as setas pretas indicam os inícios de transcrição e a seta branca indica o início de transcrição em fase estacionária. O sítio de ligação do ribossomo está indicado por um único sublinhado e o início de tradução, por um duplo sublinhado. A sequência de ligação da proteína está indicada em cada uma das fitas do fragmento entre as chaves. A sequência repetida invertida está indicada pelas setas.

FONTE: da Silva, C. A P. T.

RESULTADOS

Determinada a sequência de ligação da proteína SpdR pelo ensaio de DNaseI *footprinting* é possível identificar no genoma de *C. crescentus* outros genes potencialmente pertencentes ao regulon de SpdR. Desta maneira foi iniciada uma busca *in silico* utilizando a sequência CTGCGACNNNNNGTCGCGG, que corresponde as sequências repetidas invertidas de ligação de SpdR. Essa busca foi realizada utilizando-se o programa RSAT, permitindo apenas 1 troca de base no sítio. A lista de prováveis genes regulados por SpdR estão apresentados na tabela 9.

Tabela 9 - Possíveis genes regulados por SpdR.

Gene	Produto	Início	Final	Sequência correspondente	Score
CCNA_00940	Proteína Kinase (EAL/GGDEF)	79	-61	CTGCGGCGGATTGTCGCGG	0.95
CCNA_00996	Enoil-CoA hidratase	123	-105	CTGCGACCGCGCGTCGCGG	1.00
CCNA_01240	Regulador de resposta da família OmpR	86	-68	CTGAGACGTCCGGTCGCGG	0.95
<i>cspD</i>	Proteína de choque frio	137	-139	CTGCGACGAAATGTCGCGG	1.00
CCNA_01530	Flagelina	153	-135	CCGCGACCGCCTGTCGCGG	0.95
CCNA_02116	Proteína envolvida na biossíntese da cápsula polissacarídica	99	-85	CTGCGACATTAGGTCGCGC	0.95
CCNA_02238	Proteína hipotética	77	-59	CTGCGACATAAGGTCGGGG	0.95
<i>creS</i>	Proteína determinante de morfologia celular (Crescentina)	148	-130	CCGCGACGCCCGTCGCGG	0.95

4.8 Análise do papel de CspD em *C. crescentus*

Segundo Yamanaka (2001), CspD atua como inibidor de replicação de DNA em *E. coli*. Neste estudo foi mostrado que a deleção do gene *cspD* não modificou crescimento e a morfologia celular. Entretanto, nos ensaios com a superexpressão da proteína CspD, pode-se notar mudança na morfologia celular, similar às vistas em mutantes de genes que codificam para proteínas essenciais para a replicação do DNA. Os autores também mostram através de ensaio de mobilidade em gel que CspD se liga a DNA fita simples em regiões inespecíficas. Foi determinado também por ensaio de replicação *in vitro* que CspD atua inibindo a replicação, tanto no início quanto na elongação da síntese do DNA (YAMANAKA et al. 2001).

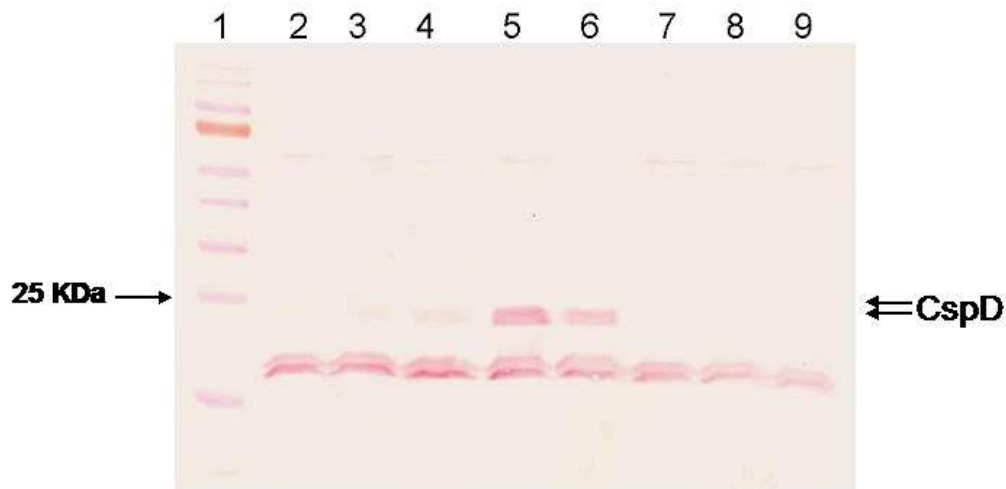
Visto que a regulação do gene *cspD* de *C. crescentus* foi detalhada, iniciaram-se estudos para definir o papel da proteína CspD na célula, tanto no crescimento exponencial quanto na fase estacionária. Desta maneira, uma linhagem superexpressando a proteína CspD foi construída. A região codificante do gene *cspD* foi amplificada e clonada no vetor pUJ142,

RESULTADOS

que possui um promotor independente induzido por xilose (MASCARENHAS; WEBER; GRAUMANN 2001).

O plasmídeo gerado, pCA50, foi introduzido na linhagem selvagem NA1000. Através de ensaio de *Western Blotting* pudemos verificar um notável aumento na expressão da proteína na linhagem contendo pCA50 em fase exponencial, após 4 horas de indução com 0,3% de xilose (Figura 33).

Figura 33 - *Western blotting* para confirmação da indução da proteína CspD.

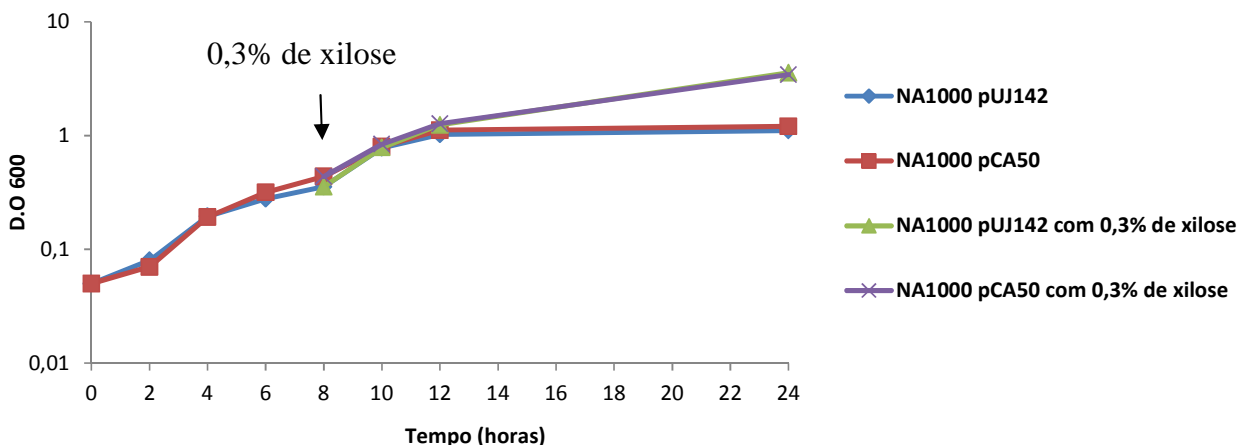


Culturas em diferentes tempos da curva de crescimento tiveram suas proteínas totais extraídas e aplicadas em gel de poliacrilamida-SDS 12%. Após a transferência destas para o filtro de nitrocelulose, foi feito um ensaio de *Western blotting* com soro anti-CspD (1:5000) para reconhecimento da banda de ~21 kDa. (1) Padrão de proteína; (2) NA1000 pCA50 no ponto 0 sem indução; (3) NA1000 pCA50 no ponto 4 horas sem indução; (4) NA1000 pCA50 no ponto 24 horas sem indução; (5) NA1000 pCA50 no ponto 4 horas com indução de 0,3% de xilose; (6) NA1000 pCA50 no ponto 24 horas com indução de 0,3% de xilose; (7) NA1000 pUJ142 no ponto 0 horas sem indução; (8) NA1000 pUJ142 no ponto 4 horas sem indução; (9) NA1000 pUJ142 no ponto 4 horas com adição de 0,3% de xilose
 FONTE: da Silva, C. A P. T.

Com a construção do plasmídeo que superexpressa a proteína CspD pronta, foram realizadas as curvas de crescimento para verificar se a superexpressão de CspD bloqueia a duplicação celular, agindo como um inibidor de replicação como o que foi visto *E. coli* (YAMANKA et al., 2001). Na figura 34 pode-se verificar que a partir do momento em que foi adicionado 0,3% de xilose, a cultura com a linhagem que continham o plasmídeo pCA50 continua crescendo normalmente, semelhante a cultura contendo o plasmídeo vazio pUJ142. Nota-se também que as culturas aumentaram muito sua absorbância máxima em meio contendo xilose, chegando a uma D.O₆₀₀ de 3,5 em 24 horas de crescimento.

RESULTADOS

Figura 34 - Curva de crescimento da linhagem NA1000 superexpressando a proteína CspD



A curva foi realizada com a linhagem NA1000 carregando o plasmídeo pUJ142 ou pCA50 com indução por xilose e sem indução. O crescimento foi avaliado pela medida da absorbância a 600 nm.

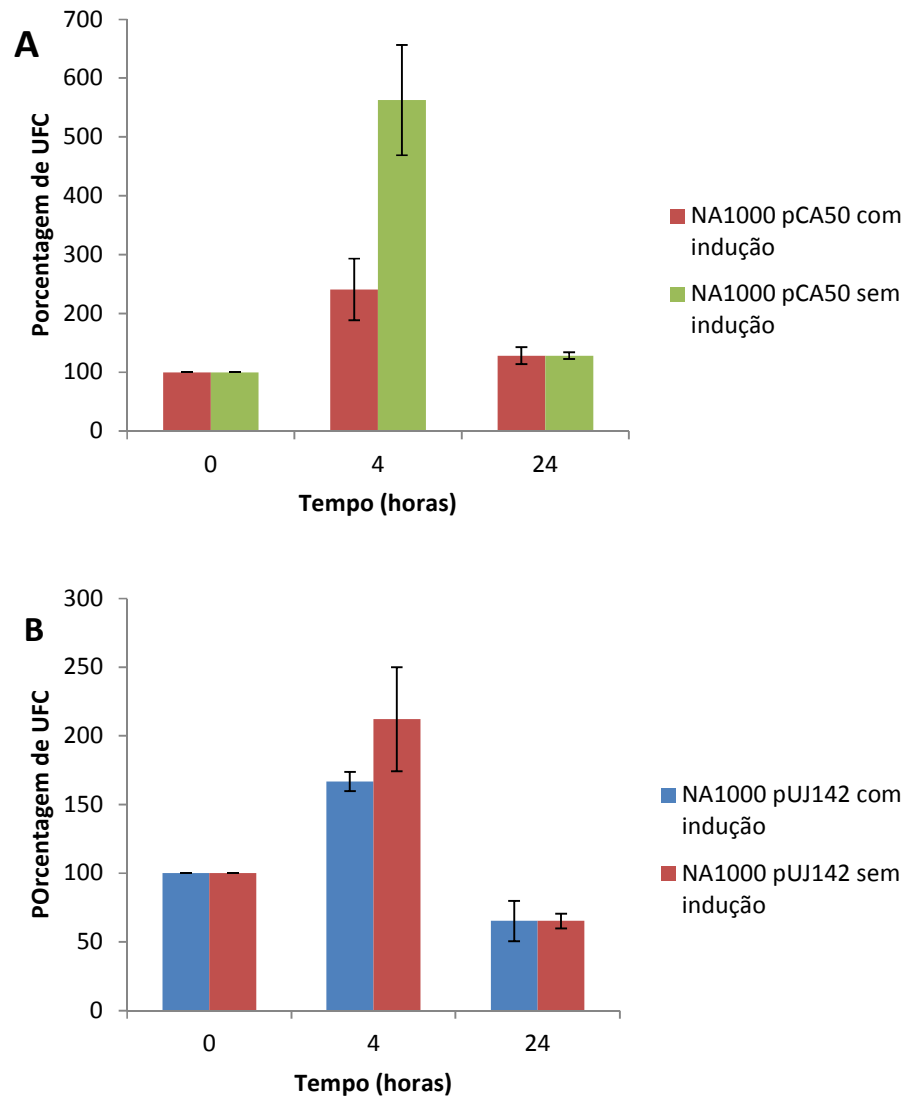
FONTE: da Silva, C. A P. T.

Nos experimentos de viabilidade podemos comparar e determinar a sobrevivência relativa da linhagem NA1000 contendo pUJ142 ou pUJ50 em meio com e sem xilose. Houve diminuição da capacidade de viabilidade na linhagem superexpressando CspD como observado na figura 35A. Entretanto não é possível afirmar que essa deficiência de viabilidade seja um resultado da inibição da replicação pela proteína CspD. Os desvios padrão do experimento não foram altos, porém este ensaio foi realizado somente uma vez, com triplicata de experimento. Este experimento será repetido mais algumas vezes e com mais pontos durante o crescimento a fim de verificar se essa queda na viabilidade é relevante e se esta realmente é determinada pelo desbalanço de CspD.

Nos ensaios realizados com *E. coli* a redução da viabilidade celular caiu para pouco mais de 1% após 8 horas de indução (YAMANAKA et al. 2001), mas o mesmo não foi verificado em *C. crescentus*, sugerindo que CspD não tem seu papel de inibidor da replicação nesta bactéria.

RESULTADOS

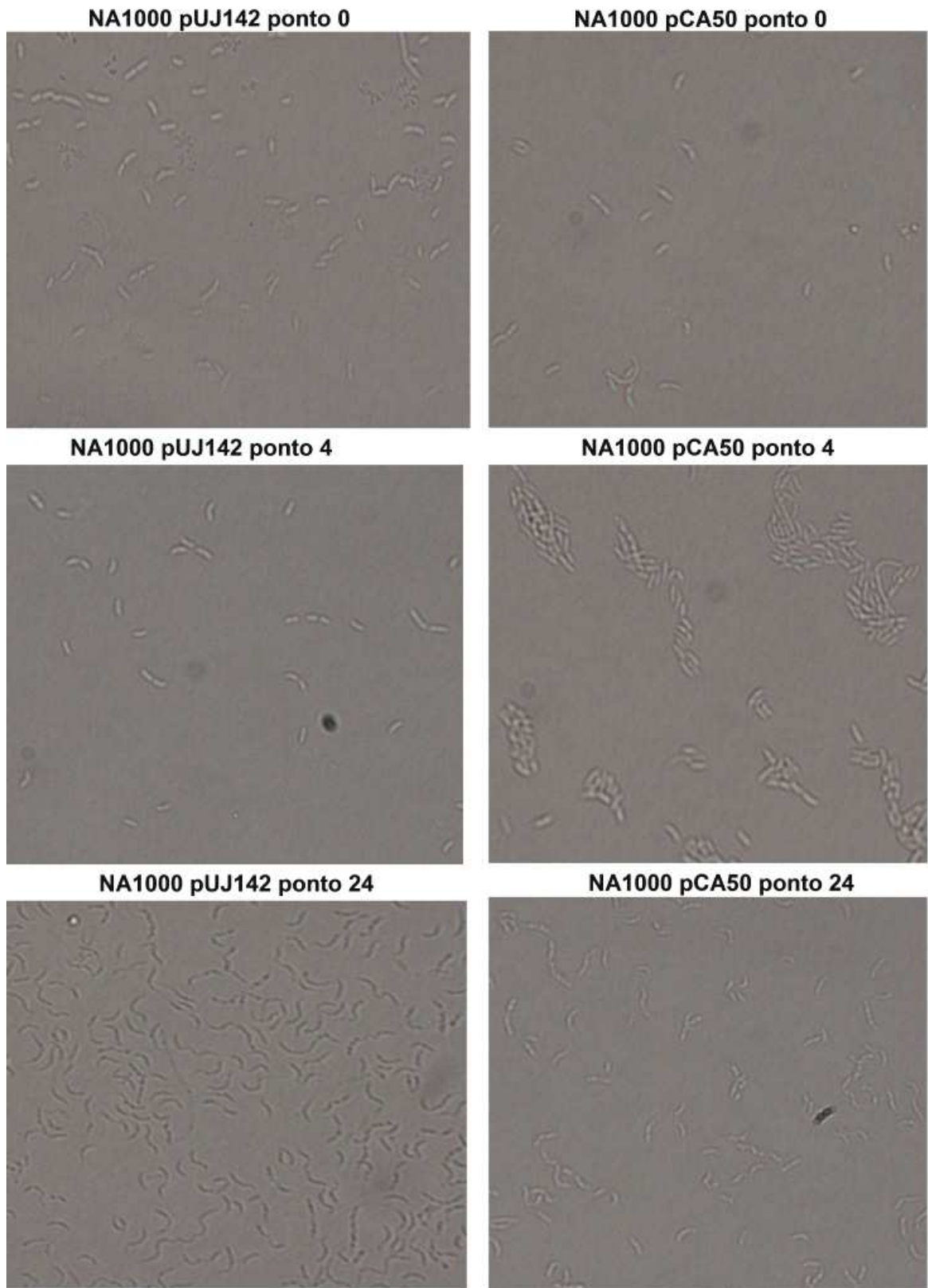
Figura 35 - Viabilidade relativa da linhagem NA1000 superexpressando CspD.



(A) Viabilidade das linhagens NA1000 contendo pCA50 com ou sem adição de xilose. (B) Viabilidade das linhagens NA1000 contendo pUJ142 com ou sem adição de xilose. Nos pontos indicados, alíquotas foram removidas e plaqueadas para a contagem das colônias.

FONTE: da Silva, C. A P. T.

Análise da morfologia da linhagem de *E. coli* superexpressando CspD comprovou que estas tornaram-se mais alongadas e o cromossomo mais condensado, sugerindo que CspD atua no DNA, inibindo a replicação do mesmo (YAMANAKA et al., 2001). Nas microscopias realizadas das culturas sob superexpressão de CspD em *C. crescentus* as células não apresentaram mudanças óbvias na morfologia (Figura 36), diferentemente do observado em *E. coli*. Este resultado novamente indica que CspD realmente não esteja atuando como um inibidor de replicação.

RESULTADOS**Figura 36** - Microscopia de células da linhagem NA1000 superexpressando CspD

Morfologia celular da cultura de *C. crescentus* NA1000 com pUJ142 ou pCA50 antes (ponto 0) e após a indução (4 e 24 horas) de CspD. As culturas foram visualizadas com 1000x de aumento.

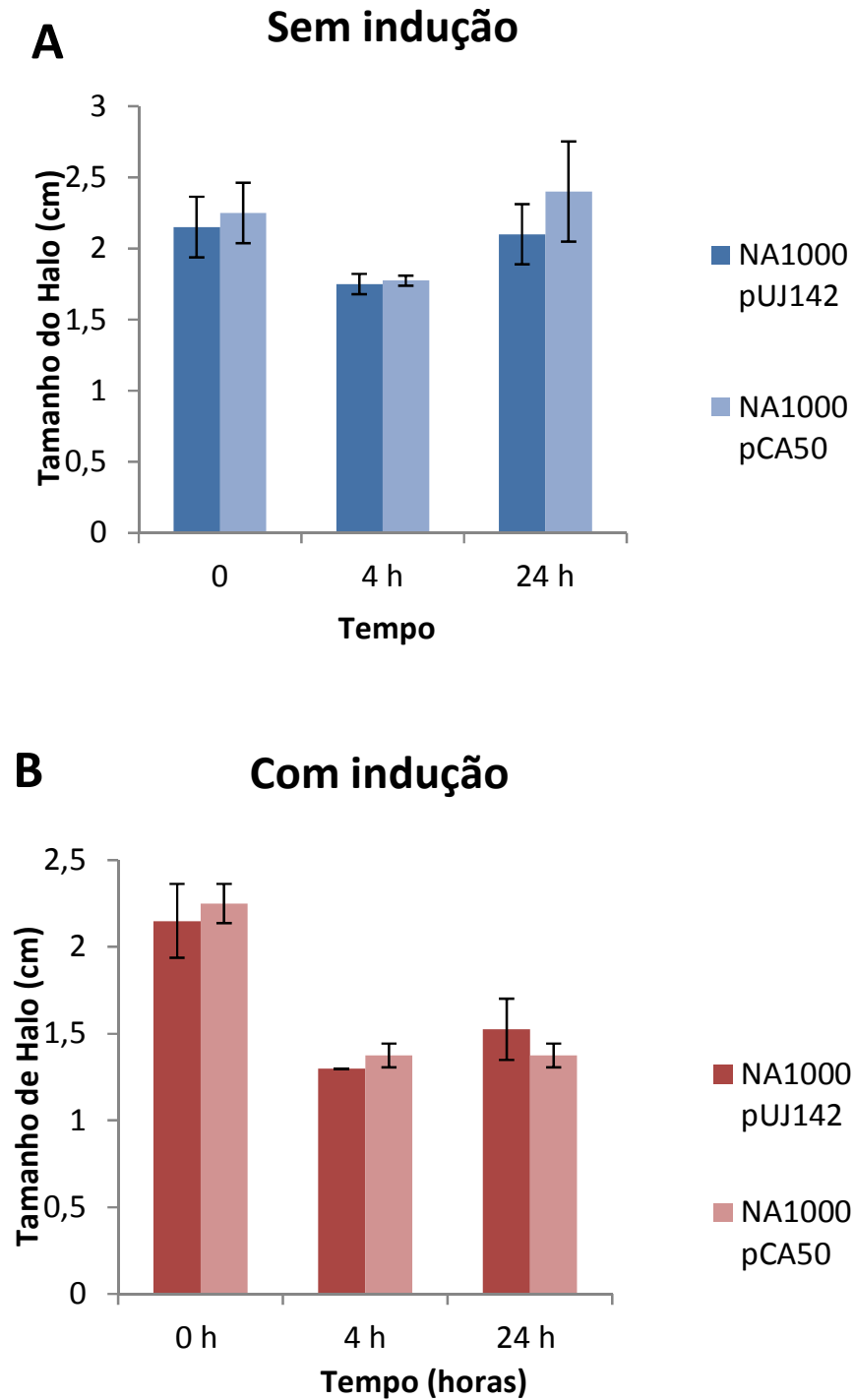
FONTE: da Silva, C. A P. T.

RESULTADOS

Genes expressos durante a fase estacionária são normalmente necessários para a sobrevivência celular nesta fase. Muitos genes expressos em fase estacionária têm sido identificados, tanto pertencentes a redes regulatórias quanto genes individuais, mas todos de grande importância para a proteção das células no momento em que a cultura entra em um estado de carência nutricional (NYSTROM, 2004).

Bactérias Gram-negativas quando estão em privação nutricional conduzem as células a uma maior resistência a choque frio, estresse oxidativo e variações osmóticas (KOLTER; SIEGELE; TORMO, 1993). Algumas proteínas induzidas após entrada em fase estacionária podem ser induzidas por estresses específicos como alta molaridade, alta temperatura e pH ácido (HENGGE-ARONIS, 1996; LEE et al., 1995; MUFFLER et al., 1997).

Baseado nestes estudos foi verificado se a superprodução da proteína CspD na linhagem selvagem NA1000 aumentava a resistência a peróxido de hidrogênio. Através de teste de inibição de crescimento por H₂O₂ foi observado na figura 37 (B) que células contendo o plasmídeo pCA50 não mostraram alteração de sensibilidade a H₂O₂ e essa resistência tampouco mostrou-se aumentada na fase estacionária (24 horas). A partir deste resultado podemos concluir que a superexpressão de CspD não causa nenhum efeito diante do estresse oxidativo. Será interessante realizar ensaios na mesmas condições com o mutante nulo do gene *cspD*, para saber se o mesmo apresenta sensibilidade a H₂O₂ ou a outros tipos de estresses em que CspD possa estar envolvido.

RESULTADOS**Figura 37** - Ensaio de inibição por H₂O₂. Em células superexpressando CspD.

Ensaio realizado na fase exponencial nas linhagens, NA1000 pUJ142 e NA1000 pCA50, com e sem indução por xilose, respectivamente. A medição dos halos foi feita antes da adição de xilose, após 4 horas e 24 horas de indução.

FONTE: da Silva, C. A P. T.

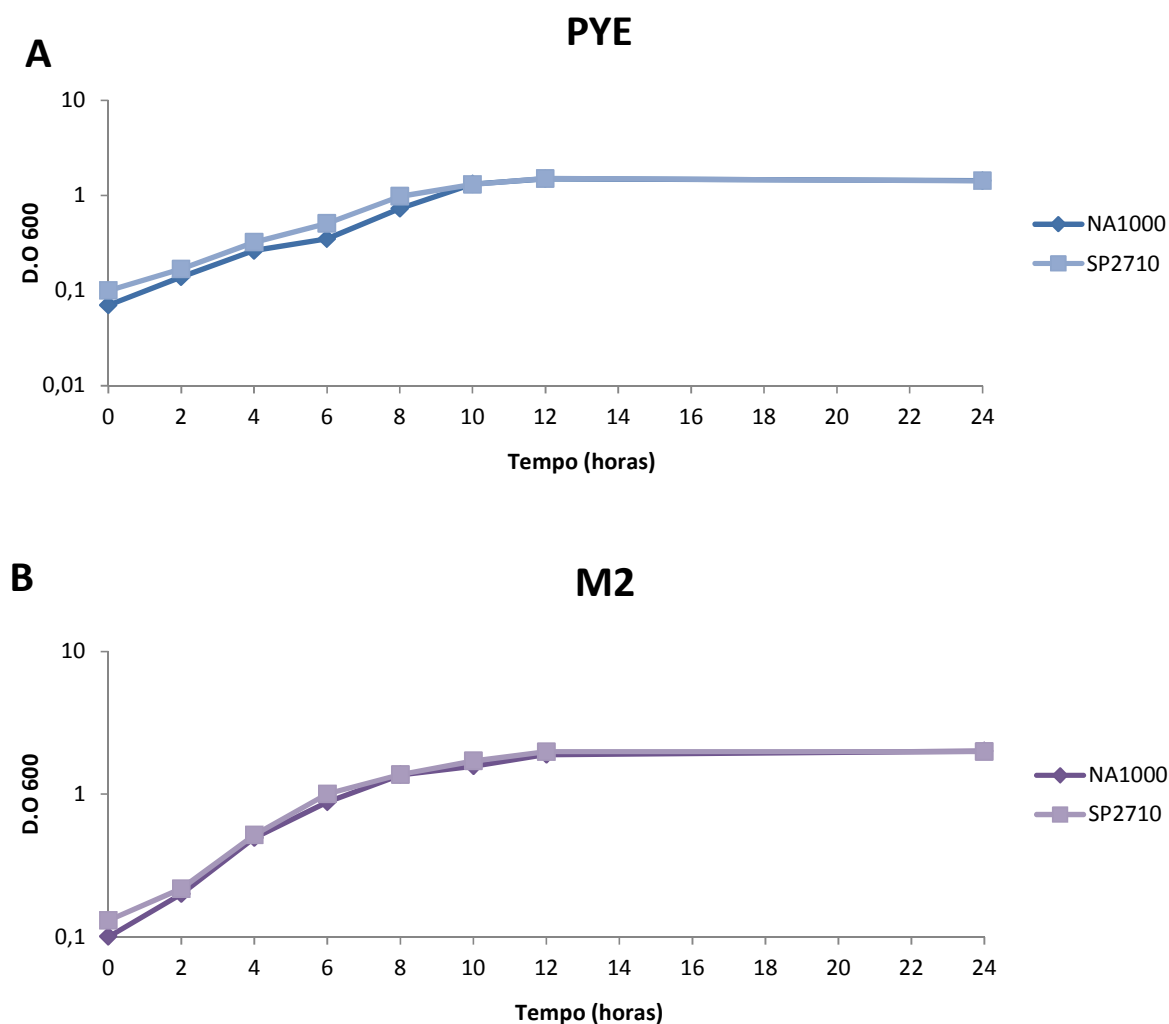
RESULTADOS

4.9 Análise do fenótipo do mutante SP2710 em resposta fase estacionária e a diferentes estresses

Um objetivo futuro deste trabalho é desvendar o regulon da proteína SpdR, através de ensaios de ensaios de microarranjos de DNA. Com este fim, iniciamos a construção de um mutante SpdR por deleção, para que nada pudesse vir a interferir em qualquer situação normal de crescimento, visto que possuímos um mutante SpdR::Tn5 (resistente a canamicina) e o mutante cedido pelo Dr. Laub CC0247::Tet^R (resistente a tetraciclina).

A linhagem mutante foi obtida conjugando-se a linhagem selvagem NA1000 com *E. coli* S17-1 carregando o plasmídeo pNPT Δ spdR. Através de reações de PCR utilizando os oligonucleotídeos RR1 e RR4, os eventos de recombinação homóloga foram confirmados. Os resultados obtidos demonstram que a primeira recombinação ocorreu e uma linhagem foi selecionada para a segunda recombinação. Para verificar a segunda recombinação, foram selecionadas 100 colônias cresceram com sacarose. Dessas, 2 colônias não eram sensíveis a canamicina, e 20 colônias sensíveis a canamicina foram escolhidas. Através de PCR pode-se confirmar que 14 apresentaram deleção do gene *spdR* e 6 reverteram para a forma selvagem desse gene.

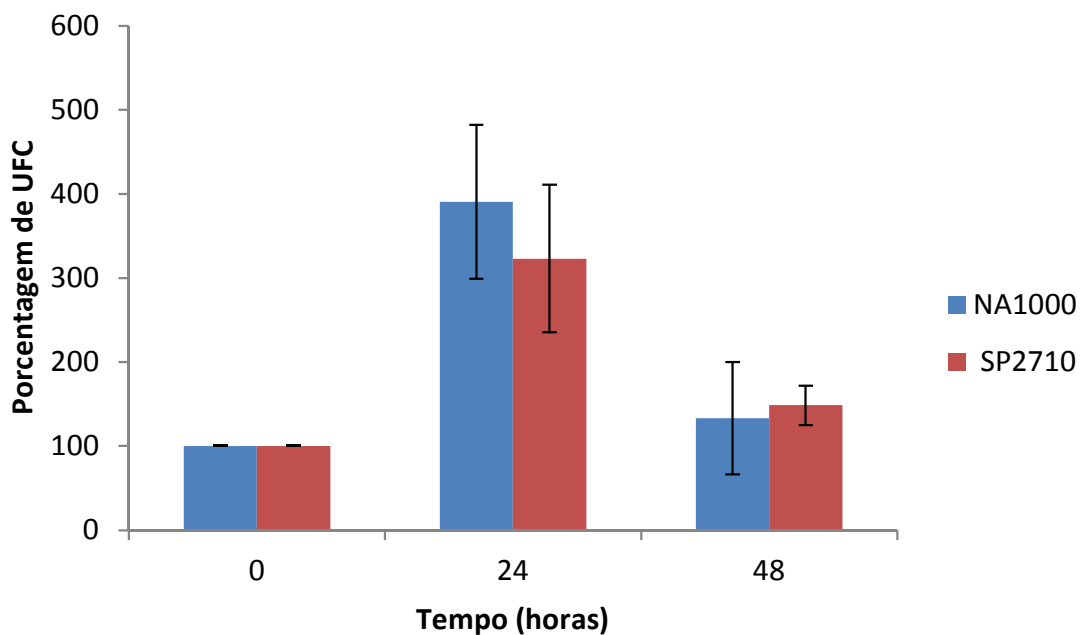
Após a obtenção da linhagem Δ spdR (nomeada SP2710) foi iniciada a caracterização dos fenótipos apresentados em diferentes situações. O perfil de crescimento do mutante SP2710 foi analisado em meio PYE e meio M2 durante a fase exponencial e estacionária da curva de crescimento. As avaliações foram realizadas por meio da medida da absorbância das culturas retiradas em intervalos regulares. No experimento da análise de curva de crescimento a 30°C, o mutante SP2710 não apresentou alteração significativa nas taxas de crescimento em relação à linhagem selvagem NA1000 em meio PYE ou M2 (Figura 38).

RESULTADOS**Figura 38** - Curva de crescimento da linhagem mutante SP2710 (NA1000 Δ spdR)

(A) Curva de crescimento a 30°C em meio PYE da linhagem selvagem e do mutante nulo. (B) Curva de crescimento a 30°C em meio mínimo M2 da linhagem selvagem e do mutante nulo. Alíquotas foram retiradas a cada duas horas e a Absorbância foi medida para verificar o crescimento das culturas.

FONTE: da Silva, C. A P. T.

Como não foi observada alteração no crescimento exponencial do mutante em relação à linhagem selvagem, realizamos ensaios de viabilidade em meio PYE, para verificar se o mutante apresentava menor viabilidade em fase estacionária. Através da comparação de porcentagem de UFCs, podemos observar que a linhagem SP2710 não apresenta diminuição da viabilidade a 30 °C, tanto na fase exponencial quanto na fase estacionária em comparação a linhagem selvagem NA1000 (Figura 39). Isto nos permite concluir que SpdR não deva regular uma grande quantidade de genes, ou que estes não estão diretamente relacionados à sobrevivência nesta fase.

RESULTADOS**Figura 39** - Viabilidade relativa das linhagens NA1000 e SP2710 ($\Delta spdR$).

Nos pontos indicados, alíquotas foram removidas e plaqueadas para a contagem das colônias. A sobrevivência relativa foi determinada como sendo a razão entre o número de UFCs obtido e o número de UFCs inicial.

FONTE: da Silva, C. A P. T.

Foi realizado um ensaio de sensibilidade a H_2O_2 com o mutante SP2710 para verificar se SpdR regula algum tipo de gene que está relacionado a estresse oxidativo. Na figura 40 podemos notar que o mutante não mostrou sensibilidade em comparação à linhagem selvagem NA1000. Desta maneira podemos concluir que SpdR não está relacionado com resposta a H_2O_2 durante a fase estacionária.

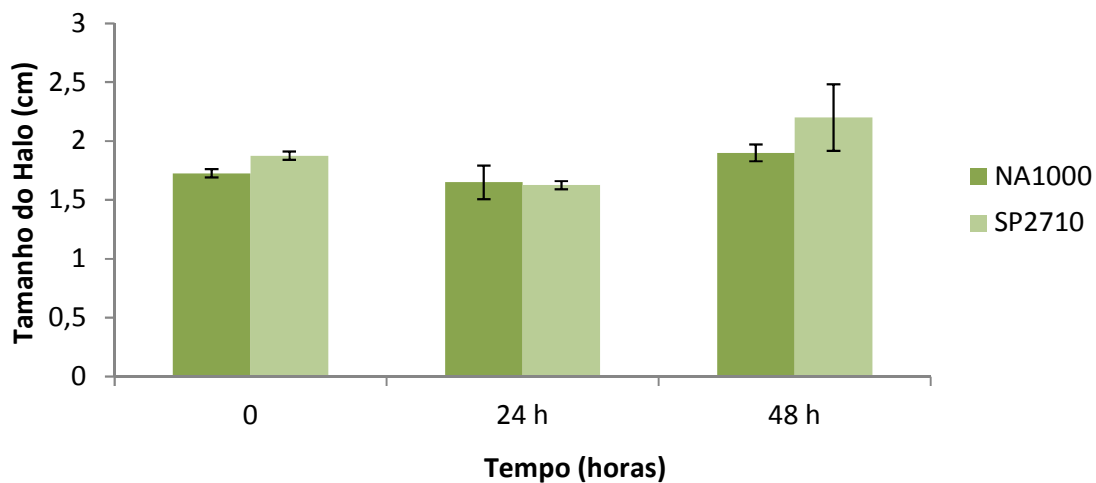
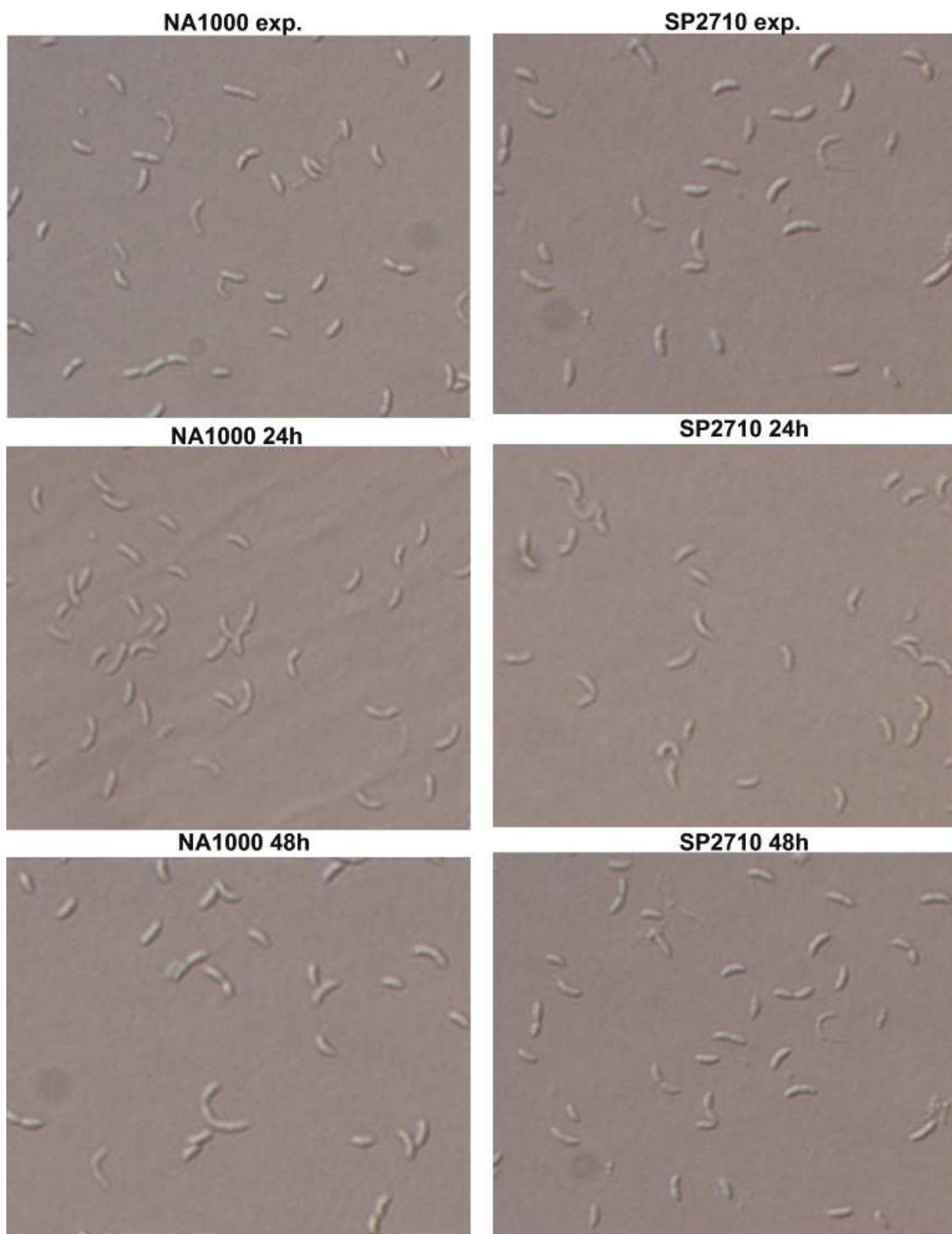
RESULTADOS**Figura 40** - Ensaio de inibição por H₂O₂

Gráfico da média dos tamanhos dos halos de inibição por H₂O₂ na fase exponencial e estacionária das linhagens, NA1000 e SP2710 ($\Delta spdR$), respectivamente.

FONTE: da Silva, C. A P. T.

Foi analisada a morfologia do mutante SP2710 na fase exponencial e na fase estacionária (24 e 48 horas de crescimento), e o mutante não mostrou nenhuma modificação em sua morfologia em relação à linhagem selvagem NA1000 (Figura 41), o que sugere que SpdR não está regulando nenhum gene relacionado a morfologia celular.

RESULTADOS**Figura 41** - Morfologia celular NA1000 e SP2710 ($\Delta spdR$).

As fotos foram tiradas de culturas na fase exponencial, 24 e 48 horas de crescimento em meio PYE. As culturas foram visualizadas na lente de 1000x de aumento.

FONTE: da Silva, C. A P. T.

5 DISCUSSÃO

A carência nutricional é um estresse frequentemente enfrentado pelas bactérias e as mesmas têm que se adaptar rapidamente à mudança no perfil de crescimento celular para manterem-se viáveis. Em *E. coli* e *B. subtilis* respectivamente, os fatores RpoS (σ^S) e SigB (σ^B) são reguladores globais de fase estacionária e estresse geral (LANGE; HENGGE-ARONIS, 1991; VOLKER; MAUL; HECKER, 1999). *C. crescentus* não possui ortólogos dos genes *rpoS* e *sigB*, bem como as outras α -proteobactérias (CHIANG; SCHELLHORN 2010; HECKER; PANE-FARRE; VOLKER, 2007) e um regulador global equivalente não foi identificado até o momento. Recentemente, foram identificados dois fatores envolvidos na adaptação de *C. crescentus* à carência de carbono: a molécula ppGpp, que contribui para a regulação da estabilidade da proteína DnaA e início da replicação do cromossomo, e o pequeno RNA não codificante CrfA, que controla a estabilidade do mRNA de 27 transcritos durante a carência de carbono (LESLEY; SHAPIRO 2008; LANDT et al., 2010).

Neste trabalho, a regulação do gene *cspD* de *C. crescentus* foi detalhada e foram identificados sinais que ativam a indução do gene no início da fase estacionária, revelando parte da complexa rede regulatória que modula sua expressão. Foi observado que a indução de *cspD* responde a carência de carbono, mas não à carência de nitrogênio e esta indução é dependente do tipo de fonte nutricional presente no meio. *cspD* é altamente induzido em meio contendo aminoácidos (peptona), mas não em meio contendo açúcares como glicose ou xilose e ainda, quando as células crescem em meio contendo xilose a expressão de *cspD* é reprimida na fase estacionária tardia. A presença de glicose no meio contendo peptona também diminui os níveis máximos de expressão deste gene, quando comparado com o meio contendo somente peptona. Este efeito pode ser resultante de uma possível repressão, embora não haja na literatura informações sobre tal sistema de regulação em *C. crescentus*. Em Meisenzahl e colaboradores (1997), podemos verificar que a repressão da utilização de lactose em *C. crescentus* pode ser vista em meio complexo contendo glicose e/ou xilose, indicando que ambos os açúcares podem ser utilizados como fontes primárias de carbono. Além disso, foi visto que AMP cíclico estimula a expressão de enzimas catabólicas, embora as concentrações intracelulares de AMP cíclico seja independente da fonte de carbono utilizada (SHAPIRO et al. 1972).

A análise da expressão de *cspD*, mostrou que a taxa de crescimento das células é significativamente maior em meios contendo açúcares que em meios contendo aminoácidos. Aparentemente a expressão do gene é inversamente proporcional à taxa de crescimento e, esse

DISCUSSÃO

efeito pode ser independente da fonte de carbono utilizada. Isto pode indicar que a indução de *cspD* de alguma maneira está respondendo a taxa de crescimento ao invés da fonte de carbono disponível. O mesmo foi observado em *E. coli*, onde a expressão de *cspD* também varia em resposta a diferentes fontes de carbono, e os resultados indicam que a expressão de *cspD* é inversamente proporcional à taxa de crescimento e essa expressão é independente do fator σ^S (YAMANAKA, INOUE, 1997).

Uma possível ligação entre a taxa de crescimento e a expressão de *cspD* em *C. crescentus* pode ser o segundo mensageiro ppGpp. Em *E. coli*, ppGpp é produzido em resposta a maioria dos estresses e limitações nutricionais, além da carência de aminoácidos, e foi verificado que o acúmulo de ppGpp é maior em células que crescem em meio mínimo que em células que crescem em meio rico (CASHEL et al. 1991; YAMANAKA, YNOUYE, 1997). A expressão de *cspD* de *E. coli* no duplo mutante *spoT/relA* é muito baixa, portanto ppGpp atua positivamente sobre a expressão de *cspD* neste organismo (YAMANAKA, YNOUYE, 1997). Em uma análise global da expressão gênica em *Lactobacillus lactis* em resposta à carência de carbono (isoleucina e glicose), a resposta severa e a taxa de crescimento foram comparadas, e os resultados mostraram que a resposta severa não é um mecanismo geral que controla a taxa de crescimento ou a resposta à carência de glicose neste organismo (DRESSAIRE, et al., 2008).

Em *Caulobacter*, a carência de glicose impede o início da replicação do DNA, processo dependente de ppGpp, e bloqueia a transição de célula-talo para célula móvel (LESLEY, SHAPIRO, 2008). A expressão de *cspD* no mutante nulo *spoT* indica que a indução de *cspD* por carência de glicose é dependente de ppGpp. Em *E. coli*, a produção de ppGpp responde à carência nutricional, circunstância esta que causa parada no crescimento. Durante a carência de aminoácidos, ppGpp é necessária para a eficiente transcrição de genes de biossíntese de aminoácidos (XIAO et al. 1991). Diferentemente de *E. coli*, *C. crescentus* produz ppGpp em carência de glicose e nitrogênio, mas não em carência de aminoácidos (LESLEY; SHAPIRO, 2008; BOUTTE; CROSSON, 2011). Este resultado pode ser fundamentado pelo fato que *E. coli* é um dos microrganismos que normalmente compõem a microbiota do trato intestinal de humanos, no qual aminoácidos estão presentes em altas concentrações, desta maneira, sendo uma fonte nutricional facilmente disponível para a bactéria (SAVAGEAU, 1983). Em contraste, *C. crescentus* vive em ambientes oligotróficos e os aminoácidos estão presentes em baixas concentrações (POINDEXTER, 1981; THOMAS, 1997), desta maneira a resposta severa neste organismo foi desenvolvida de modo a não responder à carência de aminoácidos. Através de uma análise global de genes regulados por

DISCUSSÃO

ppGpp em *C. crescentus*, foi observado que os genes relacionados com anabolismo são reprimidos, já genes relacionados com catabolismo, genes sensoriais e de quimiotaxia, além de genes relacionados à recombinação são induzidos por ppGpp. Estes resultados são similares aos que já foram reportados em outras espécies, com exceção dos genes de biossíntese de aminoácidos, que em *C. crescentus* são reprimidos (BOUTTE, CROSSON, 2011).

A molécula ppGpp pode estar agindo de duas maneiras sobre o gene *cspD* de *C. crescentus*, tanto na transcrição da proteína ativadora do mesmo, assim consequentemente diminuindo a expressão de *cspD* no mutante *spoT*, ou diretamente na transcrição de *cspD*. Os níveis de RNA polimerase livre aumentam durante a fase estacionária, devido à desestabilização do complexo aberto causado pela molécula ppGpp, diminuindo a transcrição de genes de manutenção da célula, causado pela dificuldade da RNA polimerase se ligar a estes promotores fortes, principalmente promotores de RNA ribossomais. Desta maneira, há uma maior quantidade de *core* da RNA polimerase livre, a competição pelo *core* da RNA polimerase diminui, e fatores sigmas alternativos têm maior acesso a este, transcrevendo os genes de estresse (MAGNUSSON; FAREWELL; NYSTROM, 2005). No caso de *cspD* de *C. crescentus*, o fator sigma que inicia sua transcrição ainda é desconhecido, desta forma é necessário um estudo mais apurado nesta via de regulação para que seja determinado a que sinal ppGpp responde, bem como qual fator sigma é responsável pela transcrição de *cspD*.

A região promotora do gene *cspD* foi analisada detalhadamente e observou-se que a região entre as posições -73 a -35 é importante para a expressão de CspD. Essa região poderia ser importante para a interação da subunidade α da RNA da polimerase com o promotor ou até mesmo ser o sítio de ligação de um regulador de transcrição que interage com a subunidade alfa da RNA polimerase, recrutando-a para o promotor. Ainda é possível que o ativador se ligue na região adjacente à região -35 do promotor, interagindo com o sigma da polimerase, posicionando a mesma na região promotora e assim ativando a transcrição. Nestes casos, a RNA polimerase necessita da interação com ativadores para um posicionamento efetivo na região promotora.

Há ainda a possibilidade de que um 1º ativador seja dependente de um 2º ativador. Muitos promotores são controlados por dois ou mais fatores transcricionais e, em alguns casos, a RNA polimerase pode interagir com mais de um ativador ou depender da combinação deles para que a transcrição ocorra. Os ativadores podem ser co-dependentes, onde um é incapaz de se ligar na região específica na ausência do outro. Seria possível que este tipo de regulação estivesse atuando sobre o gene *cspD*, onde uma proteína regulatória se ligue na

DISCUSSÃO

região -98 a -73 dependendo da outra proteína que se liga na região -73 a -35. Entretanto, nossos dados de ligação do regulador SpdR à região -98 a -73 não sustentam esta hipótese.

Com o propósito de achar o regulador transcricional do gene *cspD*, foram identificados vários genes que afetam a expressão de *cspD* na fase estacionária. Muitos genes estão envolvidos no transporte de nutrientes através da membrana e metabolismo de carbono, como aminoácidos e glicose, corroborando o fato de que *cspD* é induzido sob carência de carbono e não de nitrogênio. *C. crescentus* adquire muitos nutrientes externos via transporte pela membrana, e esses sistemas necessitam ter uma grande afinidade por nutrientes para que sustente o estilo de vida oligotrófico desta bactéria (NIERMAN et. al., 2001). Mais de 80 transportadores do tipo ABC transportam nutrientes em *C. crescentus* (YOUNG, HOLLAND, 1999). No trabalho de Hottes (2004) muitas proteínas de membrana foram estudadas; dentre estas, receptores TonB-dependentes e alguns transportadores do tipo ABC. Foi analisada a relação de expressão em meio mínimo com glicose (M2G), meio complexo (PYE) e meio mínimo contendo xilose (M2X). Os dados de expressão gênica deste estudo sugerem que *C. crescentus* modula o transporte e a síntese destes em resposta ao meio em que estão crescendo: seis transportadores do tipo ABC são reprimidos em meio PYE, incluindo três que estão envolvidos no transporte de sulfato; cinco são induzidos em PYE, que incluem componentes similares àqueles usadas no transporte de cisteína, açúcar e fosfato em outras bactérias.

Foi identificado um regulador de resposta de um sistema de dois componentes, codificado pelo gene *spdR*, necessário para os máximos níveis de expressão *cspD* na fase estacionária. A identificação deste regulador é de extrema importância, pois pouco se sabe a respeito dos genes controlados em fase estacionária em *C. crescentus*. Células neste estágio são mais adaptadas a lidar com condições de baixa concentração de nutrientes, aumentando sua resistência a estresses secundários gerados pela fase estacionária (WORTINGER; QUARDOKUS; BRUN, 1998). Alguns dos genes envolvidos no aumento da resistência a estresses nesta fase são regulados por fatores sigmas extracitoplasmáticos (ECF), como alguns genes de estresse oxidativo, que são regulados pelo fator sigma *sigF* (ALVAREZ-MARTINEZ; BALDINI; GOMES, 2006). Além disso, muitos pequenos RNAs regulatórios são induzidos na fase estacionária e por carência de carbono, sugerindo existir uma complexa rede regulatória controlando a expressão de vários genes nesta fase e essa regulação parece ser mais complexa do que depender apenas de um regulador global (LANDT, et al. 2008).

O gene *spdR* codifica um regulador de resposta de um sistema de dois componentes, e provavelmente é cotranscrito com *spdS*. Foram realizadas mutações nestes dois genes e os

DISCUSSÃO

resultados demonstraram que células cultivadas em meio PYE não sofrem alteração na morfologia e nem no ciclo celular, quando comparadas com a linhagem selvagem NA1000 (SKERKER, et al. 2005).

Estudos de expressão utilizando microarranjos de DNA revelaram que uma grande fração de genes têm a sua expressão variando significativamente nas culturas de *C. crescentus* cultivadas em PYE, M2G e M2 suplementado com xilose (HOTTES et al. 2004). Segundo estes autores, a classe de genes mais induzida em meio contendo xilose codifica proteínas relacionadas com a degradação de polímeros extracelulares. A expressão do gene *spdR* foi analisada em diferentes meios e mostrou-se maior em meio M2 suplementado com xilose em relação ao meio PYE (2.33 vezes maior) e M2 contendo glicose (1.66 vezes maior). É possível que SpdR regule a expressão de uma variedade de genes que estão relacionados à utilização de fontes alternativas de carbono. No trabalho de HU e colaboradores (2005), foi observado que o sistema de dois componentes *spdR* e *spdS* é induzido sob estresse causado por cromato e dicromato. Estes genes também são induzidos em carência de carbono segundo Britos e colaboradores, (2011). Estes trabalhos sugerem que o regulon de SpdRS em *C. crescentus* possa compreender genes de respostas diversas, de modo a responder a estresses, e certamente também envolvidos com carência nutricional.

Um estudo de microarranjos de DNA permitiu verificar os inícios de transcrição que respondem ao ciclo celular (SKERKER et al. 2005) e estresse por metais pesados (MCGRATH et al. 2007). A transcrição do gene *spdS* (que está em um possível operon com o gene *spdR*) responde a metais pesados, tendo o início de transcrição localizado a +6 da sequência ATG (códon de iniciação de tradução) prevista do gene. Assim, é provável que a notação do gene *spdS* no banco de dados GeneBank esteja errada e que a região codificante deste seja menor do que a prevista. Foi verificado também que a expressão deste operon não se altera durante o ciclo celular (MCGRATH et al. 2007 e SKERKER et al. 2005).

Em um recente trabalho de localização de proteínas em escala genômica de *C. crescentus*, foram localizadas um total de 352 proteínas, dentre as quais a histidina quinase produto do gene CC0248 (WERNER et al. 2009). A localização foi determinada utilizando uma fusão do N-terminal da proteína com a proteína mCherry. A histidina quinase se mostra em uma distribuição irregular ou manchas (identificadas como Patchy/Spotty), e é semelhante à localização de proteínas helicoidais como MreB. A formação deste filamento de proteínas não é caracterizada ainda, o que dá margem a estudos com relação a esta proteína e ao seu papel na célula (WERNER et al. 2009).

DISCUSSÃO

C. crescentus codifica 106 proteínas que fazem parte de sistema de dois componentes sendo, 62 histidinas quinase e 44 reguladores de resposta (NIERMAN et al. 2001). Alguns genomas de bactérias possuem mais de 250 proteínas sinalizadoras, muitas vezes mais que 5% dos genes identificados do genoma. Em *E. coli* a maioria do sistema de dois componentes são codificados em operons um regulador de resposta e sua a histidina quinase cognata e a fosfotransferência só é realizada pelo par de proteínas. Em *C. crescentus* cerca de 41 histidinas quinase e 19 reguladores de resposta, são órfãos, ou seja, 57% de todos os sistemas dois componentes não são codificados no mesmo operon (NIERMAN et al. 2001).

A proteína SpdR se liga em uma repetição invertida imperfeita, posicionada relativamente longe da região -35 do promotor de *cspD* (entre posições -87 e -69). Isto sugere que a proteína se ligue na região promotora como um dímero, interagindo com a RNA polimerase e consequentemente ativando a transcrição do gene *cspD* de *C. crescentus*. Neste trabalho, foi observado que SpdS fosforila o regulador SpdR *in vitro*, e este resultado vai de encontro a trabalhos anteriores que mostram que as histidinas quinases exibem uma preferência cinética por seu substrato cognato *in vivo* (SKERKER, et al. 2005). Além disso, o resíduo aspártico na posição 64 da proteína mostrou-se necessário para a ligação de SpdR na região promotora do gene *cspD*, confirmando a dependência de fosforilação.

Os resultados sugerem que pode haver mais de um tipo de regulação atuando neste gene. O gene *cspD* provavelmente responde à fase estacionária por carência de fonte de carbono. Esta regulação basal é independente da região ativadora a montante do promotor, e parece ser sujeita à repressão por glicose. Sobreposta a esta, um aumento notável na expressão de *cspD* depende da região ativadora, que contém o sítio de ligação da proteína SpdR. Como esta deve ser fosforilada pela histidina quinase SpdS em resposta a um sinal para ativar a expressão, o gene *cspD* também responde a este sinal que pode ser, ou não, relacionado à fonte de carbono.

Apesar dos genes *cspC* e *cspD* serem induzidos na fase estacionária e codificarem proteínas com a duplicação do domínio de choque frio, estas apresentam estruturas primárias bem diferentes. Em trabalhos paralelos realizados no laboratório foi visto que SpdR e a molécula ppGpp não atuam positivamente sobre o gene *cspC* de *C. crescentus*, apesar do mesmo ser induzido em carência de glicose (dados não publicados). Desta maneira sugere-se que ambos possuem funções distintas na célula (BALHESTEROS et al., 2010) e não compartilham a mesma via regulatória.

Quando CspD é superexpressa em *E. coli*, a proteína causa um efeito tóxico na célula, e este é atribuído ao fato de que esta pode atuar como inibidor de replicação de DNA

DISCUSSÃO

(ssDNA) na entrada da fase estacionária (YAMANAKA et al. 2001). Entretanto, o aumento da expressão de CspD em *C. crescentus* não surte o mesmo efeito, portanto, o papel fisiológico desta proteína neste organismo muito provavelmente é distinto do apresentado em *E. coli*. Até o momento também pudemos observar que a regulação da expressão do gene *cspD* de *C. crescentus* difere de *cspD* de *E. coli*, sendo este último regulado por um sistema de toxina e antitoxina (KIM, WOOD, 2010). Foi visto também que os níveis de CspD em *E. coli* durante o crescimento celular variam de forma dependente da protease Lon (LANGKLOTZ, NARBERHAUS, 2011). Outro fato interessante é que CspD de *C. crescentus* apresenta duas bandas em gel de SDS-PAGE, sendo que uma corresponde ao tamanho esperado e a outra é maior (BALHESTEROS et al. 2010). Este resultado indica que em *C. crescentus* CspD tem diferentes isoformas, sendo que provavelmente uma delas é objeto de modificação pós-traducional, e isto poderia ter efeito sobre a sua função na célula.

O papel de SpdR em ativar a expressão de CspD no início da fase estacionária, sugere que este regulador pode ser ativado por fosforilação desencadeada pela carência de nutrientes, provavelmente relacionada com a fonte de carbono. A determinação do regulon de SpdR poderia trazer informações a respeito do processo de adaptação a fase estacionária e estresses gerais, e ainda, evidenciar novos mecanismos regulatórios em *C. crescentus*. Através de uma análise *in silico* inicial, os genes possivelmente regulados por SpdR mostraram-se interessantes, dentre esses um de grande importância foi *creS*, que codifica para a proteína Crescentina que é responsável pelo formato vibrióide de *C. crescentus* (GITAI; DYE; SHAPIRO, 2004). O mutante SpdR não mostrou alteração morfológica; sendo assim, se este regulador possui papel na ativação do gene *creS* é possível que a sua contribuição seja minoritária na expressão geral deste gene ou ainda que outros fatores regulatórios estejam compensando sua ausência de modo a não comprometer os níveis adequados de crescentina para a manutenção do formato curvo da célula. Tendo em vista que essa proteína é responsável pela forma vibrióide ou helicoidal dependendo do tamanho das células, uma abordagem possível para o estudo da contribuição de SpdR na determinação da morfologia de *Caulobacter* seria a sua superexpressão, que poderia provocar o aumento dos níveis de crescentina nas células, levando-as à adoção da forma helicoidal mesmo na fase exponencial de crescimento.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho caracterizamos a regulação do gene *cspD*, desvendando os sinais que iniciam sua indução na fase estacionária e desvendando parte da rede regulatória que modula esta resposta. Foi observado que a indução de *cspD* responde à carência de carbono, e que essa carência depende da fonte de carbono presente. O gene é altamente induzido em meio contendo aminoácidos (Peptona), mas não em meio contendo açúcares (glicose e xilose), e células que cresceram em meio contendo xilose apresentam uma forte repressão de *cspD* em fase estacionária. Foi visto que a presença de glicose no meio contendo peptona causa uma forte diminuição na expressão de *cspD* em comparação ao meio contendo somente peptona, podendo ser uma repressão causada por glicose.

Através da mutação do gene que codifica a proteína SpoT, pudemos verificar que ppGpp é necessário para a expressão de *cspD* em carência de carbono, mas ainda não sabemos se esse efeito é direto ou indireto.

Foram realizadas varreduras em duas bibliotecas de mutantes, onde foram identificados vários genes que afetam a expressão de *cspD* na fase estacionária. Dentre estes, identificamos um regulador de resposta de um sistema de dois componentes, SpdR, que é responsável pela indução de *cspD* em fase estacionária. Este regulador é fosforilado pela histidina quinase SpdS e definimos a sequência de ligação deste fator.

Análises fenotípicas com a linhagem mutante *spdR* foram realizadas. Até o momento podemos concluir que este mutante não mostrou deficiência no crescimento tanto em fase exponencial quanto na fase estacionária em diferentes meios, a sua morfologia não foi alterada e esta linhagem não apresenta sensibilidade a estresse oxidativo.

Conseguimos verificar que a proteína CspD não está envolvida na inibição da replicação celular, não modifica morfologia da célula e não causa uma maior resistência a estresse por H₂O₂ quando superexpressa. Apesar da regulação de *cspD* de *E. coli* possuir algumas características comuns com *cspD* de *C. crescentus*, o seu papel fisiológico até o momento se mostra diferente.

Todos esses resultados deram origem a um artigo publicado recentemente no *Journal of Bacteriology*, intitulado “*SpdR, a Response Regulator Requires for Stationary –Phase Induction of Caulobacter crescentus cspD.*” Durante esse período também foram realizados experimentos cujos resultados foram publicados em outro artigo intitulado “*CspC and CspD are essential for Caulobacter crescentus stationary phase survival*”, no *Archives of Microbiology*, no qual tive participação.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

ALBERTSON, N. H.; NYSTRON, T.; KJELLEBERG, S.; Macromolecular synthesis during recovery of the marine *Vibrio* sp. S14 from starvation. **J. Gen. Microbiol.**, v. 136, p. 2201-2207, 1990.

ALLEY, M. R.; GOMES, S. L.; ALEXANDRE, W.; SHAPIRO, L. Genetic analysis of a temporally transcribed chemotaxis gene cluster in *Caulobacter crescentus*. **Genetics.**, v. 129, n.2, p. 333-341, 1991.

ALVAREZ-MARTINEZ CE, LOURENCO RF, BALDINI RL, LAUB MT, GOMES SL. The ECF sigma factor sigma(T) is involved in osmotic and oxidative stress responses in *Caulobacter crescentus*. **Mol Microbiol.**, v. 66, p. 1240–1255, 2007.

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. 1835-46, 2006.

AMY, P. S.; PAULING, C.; MORITA, R. Y. Recovery from nutrient starvation by a marine *Vibrio* sp. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 45, p. 1685-90, 1983.

ARTSIMOVITCH I, PATLAN V, SEKINE S, VASSYLYEVA MN, HOSAKA T, OCHI K, YOKOYAMA S, VASSYLYEV DG. Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. **Cell**, v. 117, p. 299–310, 2004.

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, p. 900. 1995

BAE, W.; XIA, B.; INOUE, M.; SEVERINOV, K. *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 7784-7789. 2000.

BALHESTEROS, H.; MAZZON, R.R.; DA SILVA, C. A. P. T.; LANG, E.A.; MARQUES, M.V. CspC and CspD are essential for *Caulobacter crescentus* stationary phase survival. **Arch. Microbiol.**, v. 192, n. 9, p. 747-758, 2010

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023: informações e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

REFERÊNCIAS

BAYLES, D. O.; ANNOUS B. A.; POTIER P. Cold stress proteins induced in *Listeria monocytogenes* genes in response to temperature downshock and growth at low temperatures. **Appl. Env. Microbiol.**, v. 62, p. 1116-1119, 1996.

BERDIS, A. J.; LEE, I.; COWARD, J. K.; STEPHENS, C.; WRIGHT, R.; SHAPIRO, L.; BENKOVIC, S. J. A cell cycle-regulated adenine DNA methyltransferase from *Caulobacter crescentus* processively methylates GANTC sites on hemimethylated DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 95, p. 2874–79, 1998.

BIONDI, E. G.; REISINGER, S. J.; SKERKER J. M.; ARIF, M.; PERCHUK, B. S.; RYAN, K. R.; LAUB, M. T. Regulation of the bacterial cell cycle by an integrated genetic circuit. **Nature**, v. 444, p. 899–904, 2006.

BLANVILLAIN S.; MEYER, D.; BOULANGER, A.; LAUTIER, M.; GUYNET C.; DENANCE, N.; VASSE, J.; LAUBER, E. Plant Carbohydrate Scavenging through TonB-Dependent Receptors: A Feature Shared by Phytopathogenic and Aquatic Bacteria. **PloS One** v. 2, p. 224, 2007.

BOUVET, P.; WOLFFE, A. P. A role for transcription and FRGY2 in masking maternal mRNA within *Xenopus oocytes*. **Cell**, v. 77, p. 931-41, 1994.

BOUTTE, C. C.; CROSSON, S.. The complex logic of stringent response regulation in *Caulobacter crescentus*: starvation signalling in an oligotrophic environment. **Mol. Microbiol.**, v. 80, n. 3, p. 695–714, 2011.

BRANDI, A.; PIETRONI, P.; GUALERZI, C. O.; PON, C. L. Post-transcriptional regulation of CspA expression in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 19, p. 231-40, 1996.

BRANDI, A.; PON, C. L.; GUALERZI, C.O Interaction of the main cold shock protein CS7.4 (CspA) of *Escherichia coli* with the promoter region of *hns*. **Biochimie.**, v. 76, p. 1090–1098, 1994.

BRANDI, A.; SPURIO, R.; GUALERZI, C. O.; PON, C. L. Massive presence of the *Escherichia coli* “major cold-shock protein” CspA under non-stress conditions. **EMBO J.**, v. 18, p. 1653–1659, 1999.

BRITOS, L.; ABELIUK, E.; TAVERNER, T.; LIPTON, M.; MCADAMS, H.; SHAPIRO, L. Regulatory Response to Carbon Starvation in *Caulobacter crescentus*. **Plos one**, v. 6, p. 1-19. 2011.

REFERÊNCIAS

BROWN, J. M.; SHAW, K. J. A novel family of *Escherichia coli* toxin–antitoxin gene pairs. **J. Bacteriol.**, v. 185, p. 6600–6608, 2003.

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

CASHEL, M.; GENTRY, D. R.; HERNANDEZ, V. J.; VINELLA, D. The stringent response. In NEIDHARDT, F. C. ***Escherichia coli* and *Salmonella: Cellular and Molecular Biology***. Washington, DC: American Society of Microbiology Press, p.1458–1496, 1996.

CHATTERJI, D.; FUJITA, N.; ISHIHAMA, A. The mediator for stringent control, ppGpp, binds to the beta-subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. **Genes Cells**, v. 3, p. 279–287, 1998.

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

CHIANG, S. M.; SCHELLHORN, H. E. Evolution of the RpoS regulon: origin of RpoS and the conservation of RpoS-dependent regulation in bacteria. **J. Mol. Evol.**, v. 70, p. 557–571. 2010.

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

COLLIER, J.; MURRAY, S. R.; SHAPIRO, L. DnaA couples DNA replication and the expression of two cell cycle master regulators. **EMBO J.**, v. 25, p. 346–56, 2006.

COLLIER, J.; SHAPIRO, L. Spatial Complexity and Control of a Bacterial Cell Cycle, **Curr. Opin. Biotechnol.**, v. 18, p. 333-340, 2007.

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

DAMMEL, C. S.; NOLLER, H. F. Suppression of a coldsensitive mutation in 16S rRNA by overexpression of a novel ribosome-binding factor, RbfA. **Genes Dev.**, v. 9, p. 626-37, 1995.

REFERÊNCIAS

DERSCH, P.; KNEIP, S.; BREMER, E. The nucleoid-associated DNA-binding protein H-NS is required for the efficient adaptation of *Escherichia coli* K-12 to a cold environment. **Mol. Gen. Genet.**; v. 245, p. 255-9, 1994.

DERZELLE, S.; HALLET, B.; FRANCIS, K. P.; FERAIN, T.; DELCOUR, J.; HOLS, P. Changes in *cspL*, *cspP* e *cspC* mRNA abundance as a function of cold shock and growth phase in *Lactobacillus plantarum*. **J. Bacteriol.**, v. 182, p. 5105-13, 2000.

DONOVAN, W. P.; KUSHNER, S. R. Polynucleotide phosphorylase and ribonuclease II are required for cell viability and mRNA turnover in *Escherichia coli* K-12. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 83, p. 120-4, 1986.

DRESSAIRE, C.; REDON, E.; MILHEM, H.; BESSE, P.; LOUBIERE, P.; COCAIGN-BOUSQUET, M. Growth rate regulated genes and their wide involvement in the *Lactococcus lactis* stress responses. **BMC Genomics**, v. 9, p. 343, 2008.

DURFEE, T.; HANSEN, A.; ZHI, H.; BLATTNER, F. R.; JIN, D. J. Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 1084–1096, 2008.

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

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

FINKEL, S. E; KOLKER, R. Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 4023-27, 1999.

FOSTER, S. J.; JOHNSTONE, K. The trigger mechanism of bacterial spore germination. In: SMITH, I.; SLEPECKY, R. A.; SETLOW, P (ed.) **Regulation of Prokaryotic Development**. Washington, DC: American Society of Microbiology Press, 1989, p. 89-108.

FRIEDMAN, D. I.; OLSON, E. R.; GEORGOPOULOS, C.; TILLY, K.; HERSKOWITZ, I.; BANUETT, F. Interactions of bacteriophage and host macromolecules in the growth of bacteriophage lambda. **Microbiol. Rev.**, v. 48, p. 299-325, 1984.

FROHLICH, K. S.; VOGEL, J. Activation of gene expression by small RNA. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.12, p. 674-682, 2009.

REFERÊNCIAS

GERTH, U.; KOCK, H.; KUSTERS, I.; MICHALIK, S.; SWITZER, R.L.; HECKER, M. Clp-dependent proteolysis downregulates central metabolic pathways in glucose-starved *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 321–331, 2008.

GITAI, Z.; DYE, N.; SHAPIRO, L. An actin-like gene can determine cell polarity in bacteria. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 101, n. 23, p. 8643-8, 2004.

GOBER, J. W.; SHAPIRO, L. A developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3' enhancer and IHF binding elements. **Mol. Biol. Cell**, v. 3, p. 913-26, 1992.

GOLDSTEIN, J.; POLLITT, N. S.; INOUE, M. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 87, n. 1, p. 283-287, 1990.

GORBATYUK, B.; MARCAZYNSKI, G.T. Regulated degradation of chromosome replication proteins DnaA and CtrA in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 55, p. 1233-45, 2005.

GRAUMANN, P. L.; MARAHIEL, M. A. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. **Trends Biochem Sci**, v. 23, p. 286-90, 1998.

GUALERZI, C. O.; PON, C. L. Initiation of mRNA translation in prokaryotes. **Biochemistry**, v. 29, p. 5881-9, 1990

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

HECKER, M.; PANE-FARRE, J.; VOLKER, U. SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 61, p. 215–236. 2007.

HENGGE-ARONIS, R. Signal Transduction and Regulatory Mechanisms Involved in Control of the σ^S (RpoS) Subunit of RNA Polymerase. **Microbial. Mol. Biol. Rev.**, v. 66, n. 3, p. 373-395, 2002

HENGGE-ARONIS, R. Survival of hunger and stress: the role of rpoS in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. **Cell**, v. 72, n. 2, p. 165-168, 1993.

_____. The general stress response in *Escherichia coli*. In: STORZ, G.; HENGGE-ARONIS, R. (Ed.). **Bacterial stress responses**. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 2000. p. 161-178.

REFERÊNCIAS

HIGGINS, C. F.; HYDE, S. C.; MIMMACK, M. M.; GILEADI, U.; GILL, D. R.; GALLAGHER, M. P. Binding protein-dependent transport systems. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 22, p. 571-592, 1990.

HILLSON, N. J.; HU, P.; ANDERSEN, G. L.; SHAPIRO, L. *Caulobacter crescentus* as a whole-cell uranium biosensor. **Appl. Environ. Microb.**, v. 73, p. 7615-7621, 2007.

HOLTZENDORFF, J.; HUNG, D.; BRENDE, P.; REISENAUER A.; VIOLLIER, P. H.; MCADAMS, H. H.; SHAPIRO, L. Oscillating global regulators control the genetic circuit driving a bacterial cell cycle. **Science**, v. 304, p. 983-87, 2004.

HOTTES, A.K., MEEWAN, M., YANG, D., ARANA, N., ROMERO, P., MCADAMS, H. H.; STEPHENS, C. Transcriptional profiling of *Caulobacter crescentus* during growth on complex and minimal media. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 1448-61, 2004

HOTTES, A. K.; SHAPIRO, L.; MCADAMS, H. H. DnaA coordinates replication initiation and cell cycle transcription in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 58, p. 1340-53. 2005.

INIESTA, A. A.; MCGRATH P. T.; REISENAUER, A.; MCADAMS H. H.; SHAPIRO, L. A phosphosignaling pathway controls the localization and activity of a protease complex critical for bacterial cell cycle progression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 103, p. 10935-10940, 2006.

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

JIANG, W.; HOU, Y.; INOUE, M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 196-202, 1997.

JONES, P. G.; KRAH, R.; TAFURI, S. R.; WOLFFE, A. P. DNA gyrase, CS7.4 and the cold shock response in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 174, p. 5798-802, 1992.

JONES, P. G.; INOUE, M. RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response. **Mol. Microbiol.**, v. 21, p. 1207-18. 1996.

KIM, Y.; WOOD, T. K. Toxins Hha and CspD and small RNA regulator Hfq are involved in persister cell formation through MqsR in *Escherichia coli*. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 391, n. 1, p. 209-13, 2010.

REFERÊNCIAS

KOLTER, R.; SIEGELE, D.A. TORMO, A. The stationary phase of the bacterial life cycle. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 47, p. 855-74, 1993.

LANDT, S. G.; LESLEY, J. A.; BRITOS, L.; SHAPIRO L. CrfA, a Small Noncoding RNA Regulator of Adaptation to Carbon Starvation in *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 192, n. 18, p. 4763–4775, 2010.

LANDT, S. G.; ABELIUK, E.; MCGRATH, P. T.; LESLEY, J. A.; MCADAMS, H. H.; SHAPIRO. L. Small non-coding RNAs in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 68, 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*. **J. Bacteriol.**, v. 192, p. 4763–4775, 2010.

LANG, E. A.; MARQUES, M. V. Identification and transcriptional control of *Caulobacter crescentus* genes encoding proteins containing a cold shock domain. **J. Bacteriol.**, v. 186, p. 5603-13, 2004.

LANGE, R.; HENGGE-ARONIS R. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 5, p. 49–59, 1991.

LANGKLOTZ, S.; NARBERHAUS, F. The *Escherichia coli* replication inhibitor CspD is subject to growth-regulated degradation by the Lon protease. **Mol. Microbiol.**, v. 80, p. 1313–1325, 2011.

LAUB, M. T.; MCADAMS, H. H.; FELDBLYUM, T.; FRASER, C. M.; SHAPIRO, L. Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. **Science**, v. 290, p. 2144–2148, 2000.

LAUB, M. T.; CHEN, S. L, SHAPIRO, L.; MCADAMS, H. H. Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 99, p. 4632–37, 2002.

LEE, S. J.; XIE, A.; JIANG, W.; ETCHEGARAY, J. P.; JONES, P. G.; INOUE, M. Family of the major cold-shock protein, CspA (CS7.4), of *Escherichia coli*, whose members show a high sequence similarity with the eukaryotic Y-box binding proteins. **Mol. Microbiol.**, v. 11, p. 833-839, 1994.

REFERÊNCIAS

LEE, I. S.; LIN, J.; HALL, H. K.; BEARSON, B.; FOSTER, J. W. The stationary phase sigma factor σ (Rpos) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella typhimurium*. **Mol. Microbiol.**, v. 17, p. 155-67, 1995.

LEMKE, J. J.; DURFEE, T.; GOURSE, R. L. DksA and ppGpp directly regulate transcription of the *Escherichia coli* flagellar cascade. **Mol. Microbiol.**, v. 74, p. 1368–1379, 2009.

LESLEY, J. A.; SHAPIRO L. SpoT regulates DnaA stability and Initiation of DNA replication in carbon-starved *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 190, p. 6867-80, 2008.

LLORENS, J. M. N.; TORMO, A.; MARTÍNEZ-GARCÍA, E. Stationary phase in gram-negative bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 34, n.4, p. 476-95, 2010.

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*. **Mol Microbiol.**, v. 80, n. 6, p. 1598-612, 2011

MAGNUSSON, U. L.; FAREWELL, A.; NYSTRÖM, T. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. **TRENDS in Microbiol.**, v. 13, p. 236-242, 2005.

MAJDALANI, N.; VANDERPOOL, C. K.; GOTTESMAN, S. Bacterial small RNA regulators. **Biochem. Mol. Biol.**, v. 40, p. 93-113, 2005.

MÄNNISTÖ, M. K.; PUHAKKA, J. A Temperature- and growth-phase- regulated changes in lipid fatty acid structures of psychrotolerant ground water Proteobacteria. **Arch. Microbiol.**, v.177, p. 41–46, 2001.

MÄNNISTÖ, M. K.; TIROLA, M. A.; SALKINOJA-SALONEN, M. S.; KULOMAA, M. S.; PUHAKKA, J. A. Diversity of chlorophenol-degrading bacteria isolated from contaminated boreal groundwater. **Arch. Microbiol.**, v. 171, n. 3, p. 189-197, 1999.

MASCARENHAS, J.; WEBER, M. H.; GRAUMANN, P. L. Specific polar localization of ribosomes in *Bacillus subtilis* depends on active transcription. **EMBO Rep.**, v. 2, n. 8, p. 685-9, 2001

MAZZON, R. R.; LANG, E. A.; BRAZ, V. S.; MARQUES, M. V. Characterization of *Caulobacter crescentus* response to low temperature and identification of genes involved in freezing resistance. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 288, n. 2, p. 178-185, 2008.

REFERÊNCIAS

MCADAMS, H. H.; SHAPIRO, L. A bacterial cell-cycle regulatory network operating in time and space. **Science**, v. 301, p 1874–1877, 2003.

MCGRATH, P. T.; INIESTA, A. A.; RYAN, K. R.; SHAPIRO, L.; MCADAMS, H. H. A dynamically localized protease complex and a polar specificity factor control a cell cycle master regulator. **Cell**, v. 124, p. 535–47. 2006.

MCGRATH, T.P., LEE, H., ZHANG, L., INIESTA, A. A., HOTTES, K. A., TAN, H. M., HILSON, J. N., HU, P., SHAPIRO, L., MCADAMS, H. H. High-throughput identification of transcription start sites, conserved promoter motifs and predict regulons. **Natures Biotechnol.**, p.1-8, 2007.

MEISENZAHL, A. C., L. SHAPIRO, JENAL, U. Isolation and characterization of a xylose-dependent promoter from *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 592-600,1997.

MEYER, D.; SCHNEIDER-FRESENIUS, C.; HORLACHER, R.; PEIST, R.; BOOS, W. Molecular characterization of glucokinase from *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 1298-1306,1997

MILLER, J.H. **Experiments in Molecular Genetics**. Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York., p. 352-355. 1972.

MOECK, G. S.; COULTON, J. W. TonB-dependent iron acquisition: mechanisms of siderophore-mediated active transport. **Mol. Microbiol.**, v. 28, p. 675-81, 1998.

MUFFLER, A., BARTH, M., MARCSHALL, C.; HANGEE-ARONIS, R. Heat-shock regulation of σ^S turnover: a role for DnaK and relationship between stress responses mediated by σ^S and σ^{32} in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 445-452, 1997.

NAKASHIMA, K.; KANAMARU, K.; MIZUNO, T.; HORIKOSHI, K. A novel member of the cspA family of genes that is induced by cold shock in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 178, p. 2994-2997, 1996.

NIERMAN, W. C.; et al. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. **Proc.Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, p. 4136-41, 2001.

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

REFERÊNCIAS

OKE, M. S. R., GHIRLANDO, R., FARNAUD, S., GORRINGE, A.R., EVANS, R. W., BUCHANAN, S. K. The plug domain of a neisserial TonB-dependent transporter retains structural integrity in the absence of its transmembrane beta-barrel. **FEBS Lett.**, v. 564, p. 294-300, 2004

PRICE, C. W. Protective function and regulation of the general stress response in STORZ, G.; HENGGE-ARONIS, R. (ed.) *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. **Bacterial stress responses**. Washington, DC: ASM Press, 2000. p. 179–197.

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

PHADTARE, S.; INOUE, M. Role of CspC and CspE in regulation of expression of RpoS and UspA, the stress response proteins in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 183, n. 4, p. 1205-1214, 2001.

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

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

RYAN, K. R.; SHAPIRO, L. Temporal and spatial regulation in prokaryotic cell cycle progression and development. **Annu Rev Biochem.**, v. 72, p. 367–394, 2003.

SANDS, M. K.; ROBERTS, R. B. The effects of a tryptophanhistidine deficiency in a mutant of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 63, p.505–511, 1952.

SATO, N. A family of cold-regulated RNA-binding protein genes in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* M3. **Nucleic Acids Res.**, v. 23, p. 2161-7, 1995.

SAVAGEAU, M.A. *Escherichia coli* habitats, cell types, and molecular mechanisms of gene control. **Am .Nat.**, v. 122, p. 732–744, 1983.

SCHMID, B., KLUMPP, J., RAIMANN, E, LOESSNER M. J., STEPHAN, R. e TASARA, T. Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions. **Appl. Environ. Microb.**, v. 75, p 1621-27, 2009.

REFERÊNCIAS

SHAPIRO L, AGABIAN-KESHISHIAN N, HIRSCH A, ROSEN OM. Effect of dibutyryladenine 3':5'-cyclic monophosphate on growth and differentiation in *Caulobacter crescentus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 69, p. 1225-1229, 1972.

SHENHAR, Y., RASOULY, A., BIRAN, D., RON, E.Z. Adaptation of *Escherichia coli* to elevated temperatures involves a change in stability of heat shock gene transcripts. **Environ Microbiol.**, v. 11, p. 2989–2997, 2009.

SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. **Biotechnology**, v. 1, p. 784-790, 1983.

SINENSKY, M. Homeoviscous adaptation a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 71, p. 522-5, 1974.

SKERKER, J. M.; LAUB, M. T. Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2 32, p.5-37, 2004.

SKERKER, M. J.; PRASOL, S. M.; PERCHUK, S. B.; BIONDI, G. E.; LAUB, M. T. Two-component signal transduction pathways regulating growth and cell cycle progression in a bacterium: a system-level analysis. **Plos.**, v. 3, p. 1770-88, 2005.

SONENSHEIN, A. L. Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 3, p. 561–566, 2000.

SRIVATSAN, A.; WANG, J. D. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. **Curr. Opin. Microbiol.**, v.11, p. 100-5, 2008.

STENT, G.S.; BRENNER, S. A genetic locus for the regulation of ribonucleic acid synthesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 47, p. 2005–2014, 1961.

THOMAS-CHOLLIER, M.; SAND, O.; TURATSINZE, J. V.; JANKY, R.; DEFRANCE, M.; VERVISCH, E.; BROHE E, S. E VAN HELDEN, J. RSAT: regulatory sequence analysis tools. **Nucleic Acids Res.**, v. 36, p. W119–W127, 2008

TOULOKHONOV, I. I.; SHULGINA, I.; HERNANDEZ, V.J. Binding of the transcription effector ppGpp to *Escherichia coli* RNA polymerase is allosteric, modular, and occurs near the N terminus of the beta0-subunit. **J. Biol. Chem.**, v. 276, p. 1220–1225, 2001.

REFERÊNCIAS

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

THOMAS, J. D. The role of dissolved organic matter, particularly free amino acids and humic substances, in freshwater ecosystems. **Freshw. Biol.**, v. 38, p. 1-36, 1997.

TOONE, W. M.; RUDD, K. E.; FRIESEN, J. D. *deaD*, a new *Escherichia coli* gene encoding a presumed ATP-dependent RNA helicase, can suppress a mutation in *rpsB*, the gene encoding ribosomal protein S2. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 3291-302, 1991

VOGEL, J.; ARGAMAN, L.; WAGNER, E. G.; ALTUVIA, S. The small RNA *IstR* inhibits synthesis of an SOS-induced toxic peptide. **Curr. Biol.**, v. 14, p. 2271-2276, 2004.

VOLKER, U.; MAUL, B., HECKER, M. Expression of the σ B-dependent general stress regulon confers multiple stress resistance in *Bacillus subtilis*. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 3942-3948. 1999.

USHER, K.C., ZKAN, E.O., GARDNER, K.H., DEISENHOFER, J.N. The plug domain of FepA, a TonB-dependent transport protein from *Escherichia coli*, binds its siderophore in the absence of the transmembrane barrel domain. **PNAS.**, v. 98, p. 10676-10681, 2001

XIAO, H.; KALMAN, M.; IKEHARA, K.; ZEMEL, S.; GLASER, G. E.; CASHEL, M. Residual guanosine 3', 5' - bisphosphorylation synthetic activity of RelA null mutants can be eliminated by SpoT null mutations. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 5980-5990, 1991.

WALKER, G. C. Mutagenesis and inducible responses to deoxyribonucleic acid damage in *Escherichia coli*. **Microbiol. Rev.**, v. 48, p. 60-93, 1984.

WANG, N.; YAMANAKA, K.; INOUE, M. CspI, the ninth member of the CspA family of *Escherichia coli*, is induced upon cold shock. **J. Bacteriol.**, v. 181, p. 1603-9, 1999.

WEBER, M.H.; MARAHIEL, M.A. Coping with the cold: the cold shock response in the Gram-positive soil bacterium *Bacillus subtilis*. **Philos Trans R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 357, p. 895-907, 2002.

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

REFERÊNCIAS

WERNER, J. N., CHEN, E.Y., GUBERMAN, J. M., ZIPPILI, A. R., IRGON, J. J. e GITAI, Z. Quantitative genome-scale analysis of protein localization in a asymmetric bacterium. **PNAS.**, p. 1-6, 2009.

WOLFFE, A. P. Structural and functional properties of the evolutionarily ancient y-box family of nucleic acid binding proteins. **Bioessays**, v. 16, p. 245-251, 1999.

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

YAMANAKA, K., FANG, L.; INOUE, M. The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. **Mol. Microbiol.**, v. 27, p. 247-55, 1998.

YAMANAKA, K.; ZHENG, W.; CROOKE, E.; WANG, Y. H.; INOUE, M. CspD, a novel DNA replication inhibitor induced during the stationary phase in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 39, p. 1572-84, 2001.

YAMANAKA, K.; MITANI, T.; OGURA, T.; NIKI, H.; HIRAGA, S. Cloning, sequencing, and characterization of multicopy suppressors of a mukB mutation in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 13, p. 301-12, 1994.

YAMANAKA, K.; INOUE, M. Growth-phase-dependent expression of *cspD*, encoding a member of the CspA family in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 179, p. 5126-30, 1997.

YOUNG, J., HOLLAND I.B. ABC transporters: bacterial exporters. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1461, p. 177-200, 1999

ZAMBRANO, M.M.; KOLKER, R. *Escherichia coli* mutants lacking NADH dehydrogenase-I have a competitive disadvantage in stationary phase. **J. Bacteriol.**, v. 175, p. 5642-47, 1993.

ZAMBRANO, M.M.; SIEGELE, D.A.; ALMIRÓN, M.; ORMO, A.; KOLKER, R. Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures. **Science**, v. 259, p.1757-60, 1993.

ZAREMBINSKI, T.I.; HUNG, L.W.; MUELLER-DIECKMANN, H.J.; KIM, K.K.; YOKOTA, H.; KIM, R.; KIM, S.H. Structure-based assignment of the biochemical function of a hypothetical protein: a test case of structural genomics. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, p. 15189-15193, 1998.

REFERÊNCIAS

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