

RODOLFO ALVARENGA RIBEIRO

**Caracterização da DEAD-box RNA helicase cc1478  
em *Caulobacter crescentus* e sua regulação**

**Versão Corrigida**

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

São Paulo

2019

RODOLFO ALVARENGA RIBEIRO

**Caracterização da DEAD-box RNA helicase cc1478  
em *Caulobacter crescentus* e sua regulação**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientadora: Marilis do Valle Marques

Versão Corrigida

São Paulo

2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Alvarenga Ribeiro, Rodolfo  
Caracterização da DEAD-box RNA helicase cc1478  
em *Caulobacter crescentus* e sua regulação / Rodolfo  
Alvarenga Ribeiro; orientadora Marilis do Valle  
Marques. -- São Paulo, 2018.  
60 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São  
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Microbiologia. 2. Choque frio. 3. DEAD-box  
RNA helicases. 4. *Caulobacter crescentus*. I.  
Marques, Marilis do Valle, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Rodolfo Alvarenga Ribeiro

Título da Dissertação/Tese: Caracterização da DEAD-box RNA helicase cc1478 em *Caulobacter crescentus* e sua regulação

Orientador(a): Profª Drª Marilis do Valle Marques

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**, em sessão publica realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

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

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

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

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

Presidente:        Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508-000  
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

## CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº 817/2016 referente ao projeto intitulado: "*Caracterização da DEAD box-RNA helicase CC1478 em Caulobacter crescentus e sua regulação*" sob a responsabilidade de **Rodolfo Alvarenga Ribeiro** e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Marilis do Valle Marques**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais e pela CEPESH - Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466 de 2012.

São Paulo, 08 de junho de 2016.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**  
Coordenador CEUA ICB/USP

Prof. Dr. **Paolo Marinho A. Zanotto**  
Coordenador CEPESH ICB/USP



Declaro, para os devidos fins, que

**Rodolfo Alvarenga Ribeiro**

concluiu o Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos",  
realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 11 janeiro 2018  
(Declaração válida por 5 anos)

**Helayne Freitas**  
Presidente da Comissão de Resíduos Químicos

**Prof. Dr. Jackson Cioni Bitencourt**  
Diretor do ICB

Instituto de Ciências Biomédicas | USP  
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 • Cidade Universitária "Armando Salles Oliveira" • Butantã – São Paulo – SP • CEP 05508-900

Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos"

1ª aula:

Orientações Gerais  
FISPQ- Ficha de Segurança de Produto Químico  
Armazenamento de Produtos Químicos

2ª aula:

Manuseio de Produtos Químicos  
Equipamentos de Proteção Individual e Coletivo  
Prevenção de Acidentes

3ª aula:

Resíduos Químicos  
Produtos Químicos Controlados  
Tarefas dos Laboratórios do ICB

Aos meus pais, Manuel e Heloisa, que sempre acreditaram que o conhecimento é a herança mais valiosa.



## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Marilis do Valle Marques, pela orientação, pela paciência em ensinar e pela oportunidade de aprender, seja no âmbito da Ciência ou na Docência.

Ao Prof. Dr. Rodrigo da Silva Galhardo, pelas valiosas contribuições em seminários.

Aos professores Dr. Robson Francisco de Souza, Dr<sup>a</sup>. Andréa Cristina Fogaça e Dr<sup>a</sup>. Regina Lúcia Baldini, por todas as críticas e sugestões acrescidas em minha banca de qualificação. E novamente ao Prof. Dr. Robson Francisco de Souza, pelos conselhos e discussões na parte bioinformática.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carla Columbano, pelo suporte e disponibilidade com os experimentos ribossomais.

Aos colegas e amigos de laboratório, Alexandre, Carolina, Ricardo, Juliana, Ivan, Laura, Larissa, Naara, Nadine, Hugo, Marco, Marina e Frank, pela paciência, pela discussão de ideias, e pela quantidade insalubre de café ingerida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa (processo nº 2016/06378-3) e à CAPES, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## Resumo

Ribeiro RA. Caracterização da DEAD box-RNA helicase CC1478 em *Caulobacter crescentus* e sua regulação[dissertação]. São Paulo. Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2018.

As helicases de RNA da família DEAD-box (DEAD-box RNA helicases) são enzimas envolvidas em diversos processos biológicos importantes, como a degradação e estabilização de ácidos nucleicos, montagem de complexos riboprotéicos, e biogênese do ribossomo. *Caulobacter crescentus* é uma bactéria oligotrófica pertencente ao grupo das  $\alpha$ -proteobactérias, que possui três genes codificando RNA helicases da família DEAD-box. Resultados anteriores sugerem que uma destas enzimas, DbpA, codificada pelo gene CC1478, é uma RNA helicase funcional, mas possui uma extremidade carboxi-terminal pouco conservada, com possível função de ancoragem ao ribossomo. Este projeto propõe caracterizar a RNA helicase DbpA, definindo sua regulação, avaliar as informações filogenéticas para determinar sua origem evolutiva, e determinar a importância deste domínio C-terminal para a função da enzima. A expressão da proteína na resposta a estresses, e sua interação com complexos proteicos como o ribossomo também foram avaliados. Almejando caracterizar a função e regulação do gene CC1478, foi obtida uma linhagem onde a proteína continha uma etiqueta no amino-terminal. A expressão, a nível transcricional foi medida através da técnica de qRT-PCR, e a nível traducional por *Western blotting* onde observou-se pouca diferença entre os níveis da proteína nos vários estresses. Resultados obtidos com as construções truncadas no C-terminal indicam que a proteína sem a extensão C-terminal perde parte de sua função em relação à selvagem, e que o domínio DbpA é importante para a sua função. A análise da interação com as subunidades ribossomais mostrou que a proteína estava presente nas frações contendo subunidades do ribossomo tanto quanto ribossomos completos. Filogeneticamente a cauda C-terminal se mostra como uma região hiper-variável, rica em aminoácidos carregados, porém não sempre na mesma quantidade. No aspecto evolutivo esta família de proteínas se mostra rica em parálogos, sendo que muitos deles ainda são complementares na sua função. O clã RRM (RNA-recognition-motif), no qual DbpA está incluída, possui uma origem tão basal quanto LUCA, o que sugere que estas proteínas sempre estiveram atuando na montagem no ribossomo, e em redundância, conferindo versatilidade frente aos estresses do meio.

**Palavras-chave:** *Caulobacter crescentus*. Helicase de RNA. Choque-frio.

## Abstract

Ribeiro RA. Characterization of the DEAD-box RNA helicase CC1478 in *Caulobacter crescentus* and its regulation [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas; 2018.

DEAD-box RNA helicases (DEAD-box RNA helicases) are enzymes involved in several important biological processes, such as the degradation and stabilization of nucleic acids, assembly of riboprotein complexes, and biogenesis of the ribosome. *Caulobacter crescentus* is an oligotrophic bacterium belonging to the  $\alpha$ -proteobacteria group, which has three genes encoding RNA helicases of the DEAD-box family. Previous results suggest that one of these enzymes, DbpA, encoded by the CC1478 gene, is a functional helicase RNA, but has a poorly conserved carboxy-terminal end, with possible ribosome anchoring function. This project aims to characterize the regulation of DbpA, defining its regulation, to evaluate the phylogenetic information to determine its evolutionary origin, and to determine the importance of this C-terminal domain for the function of the enzyme. Protein expression in response to stress, and its interaction with protein complexes, such as the ribosome, were also evaluated. In order to characterize the function and regulation of the CC1478 gene, a strain was obtained where the protein contained an amino-terminal tag. Expression at the transcriptional level was measured by qRT-PCR and at the translational level by Western blotting, and little difference was observed for protein levels in the various stresses. Results obtained with the truncated constructs of the C-terminus indicate that the protein lacking the C-terminal extension loses part of its function compared to the wild type, and that the DbpA domain is important for its function. Analysis of the interaction with the ribosomal subunits showed that the protein was present in the ribosome subunits as well as in complete ribosomes fractions. Phylogenetically the C-terminal tail is a hyper-variable region, rich in charged amino acids, but not always in the same amount. In the evolutionary aspect this family of proteins is rich in paralogues, and many are still complementary in their function. The RRM (RNA-recognition-motif) clan, in which DbpA is included, has an origin as basal as LUCA, suggesting that these proteins have always been acting in the assembly in the ribosome, and in redundancy, providing versatility in face of the environmental stresses.

**Keywords:** *Caulobacter crescentus*. RNA helicase. Cold-shock.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Helicase DEAD-box - Representação dos motivos de DEAD-box e estrutura de domínios conservada na família proteica.....	17
<b>Figura 2</b> - Ciclo celular de <i>C. crescentus</i> e suas principais proteínas regulatórias.....	19
<b>Figura 3</b> - Etapas na clonagem por PCR de fusão.....	25
<b>Figura 4</b> - Eletroforeses do processo de clonagem do promotor de dbpA no vetor pRKlacZ290.....	32
<b>Figura 5</b> - Ensaio de Atividade de beta-galactosidase de extratos celulares contendo a fusão dbpA-lacZ.....	33
<b>Figura 6</b> - Processamento do RNA total para análise por qRT-PCR.....	35
<b>Figura 7</b> - Gráfico de expressão relativa dos estresses testados em relação a condição inicial (DO600nm=0,5).....	35
<b>Figura 8</b> - Eletroforeses PCR de fusão.....	36
<b>Figura 9</b> - Eletroforeses da clonagem do fragmento Flag-dbpA por digestão e ligação.....	38
<b>Figura 10</b> - Eletroforese da digestão de pNPTS138 e fragmento completo.....	39
<b>Figura 11</b> - Western Blotting dos clones transformantes de <i>Caulobacter</i> mostrando a fusão do epítipo M2-FLAG à proteína DbpA.....	39
<b>Figura 12</b> - Expressão de DbpA em diferentes estresses.....	40
<b>Figura 13</b> - Arquitetura de domínios de DbpA.....	42
<b>Figura 14</b> - Ensaio de crescimento a 15°C.....	44
<b>Figura 15</b> - Perfil ribossomal da linhagem NA1000 FLAG-DbpA a 30 °C e a 15°C.....	46

<b>Figura 16</b> - Western blotting das frações do perfil ribossomal.....	47
<b>Figura 17</b> - Motivos conservados presentes em proteínas da família de DbpA.....	48
<b>Figura 18</b> - Árvore filogenética dos domínios DbpA na linhagem das alfa-proteobactérias.....	49
<b>Figura 19</b> - Weblogo gerado a partir do alinhamento das sequências obtidas de alfa-proteobactéria, considerando apenas a região C-terminal destas proteínas.....	51
<b>Figura 20</b> - Modelo de limiar de ação da cauda de DbpA segundo BUSA et al., 2017.....	52
<b>Figura 21</b> - Árvore filogenética do domínio de DbpA em Bactéria.....	52

# SUMÁRIO

<b>1 Introdução</b> .....	13
1.1 RNA helicases .....	13
1.2 DEAD-box .....	14
1.3 Biogênese ribossomal .....	16
1.4 Degradossomo de RNA .....	17
1.5 <i>Caulobacter crescentus</i> .....	17
1.6 Estresse frio .....	19
1.7 Relação estrutura e função das RNA helicases .....	20
1.8 Objetivos .....	22
<b>2 Material e Métodos</b> .....	23
2.1 Construção da proteína RNA-helicase com cauda de epitopo .....	23
2.2 Construção da proteína RNA-helicase truncada no domínio de DbpA .....	25
2.3 Ensaio de sedimentação de frações ribossomais .....	26
2.4 <i>Imunoblotting</i> .....	27
2.5 Construção da fusão transcricional com a região promotora de CC1478 .....	28
2.6 Ensaio de expressão .....	28
2.7 Análise de expressão por qRT-PCR .....	28
2.8 Análises filogenéticas .....	30
2.9 Análises de domínios .....	30
<b>3 Resultados</b> .....	31
3.1 Ensaio de expressão .....	31
3.2 Construção da proteína RNA-helicase com cauda de epitopo .....	36
3.3 Estudo da funcionalidade da extremidade carboxi-terminal da proteína DbpA ..	41
3.4 Análise da presença de DbpA em frações ribossomais .....	44
3.5 Análise filogenética .....	47
<b>4 Conclusões</b> .....	54
<b>5 Referências</b> .....	55

## 1. Introdução

### 1.1 RNA helicases

As helicases de RNA (RNA helicases) são enzimas envolvidas em diversos processos biológicos importantes, como a degradação e estabilização de ácidos nucleicos, formação de complexos riboprotéicos, e biogênese do ribossomo. A transição entre os estados estruturais do RNA é facilitada por suas características físico-químicas, o que pode gerar estruturas secundárias não funcionais, onde as RNA helicases atuam como aceleradoras do processo e possibilitam o dobramento correto de estruturas de RNA (KARPEL et al., 1975), e desenovelamento de RNA mensageiros (mRNAs), em situações desfavoráveis energeticamente, como em baixa temperatura. Proteínas desta família podem atuar como *chaperones* (JARMOSKAITE & RUSSELL, 2014), pois algumas têm atividade de desenovelamento de ácidos nucleicos, enquanto outras apenas translocam, apesar de serem classificadas como helicases.

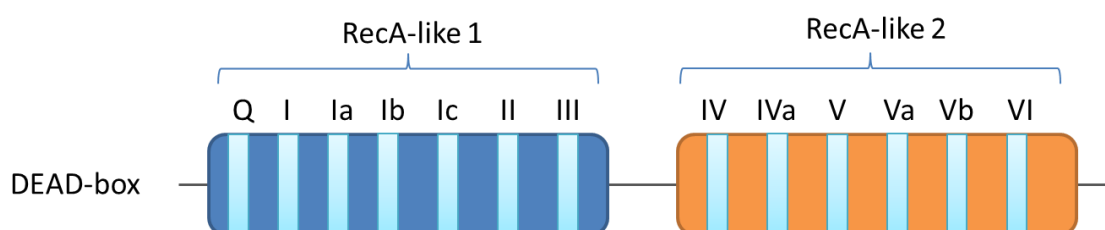
Em *Escherichia coli*, as RNA helicases são divididas em seis superfamílias (SF1 a SF6) com base em sequências conservadas e elementos estruturais (HARDWICK et al., 2013), e estas enzimas estão envolvidas em diversos processos, desde a alteração da estrutura de ácidos nucleicos, formação de complexos protéicos, e biogênese do ribossomo. A maior família (SF2) é formada pelo grupo das helicases DEAD-box (DEAH, DExD e DExH), que compartilham pelo menos 12 motivos conservados, que podem variar nos sub-grupos provenientes destas sub-famílias protéicas (LINDER et al., 2011), porém todas compartilham um núcleo conservado que se liga a ATP e a ácido nucleico, consistindo de dois domínios, semelhantes à recombinase RecA.

Algumas helicases em *Sacharomyces cerevisiae*, dos grupos DEAD-box, Ski2-like, e DEAH/RHA atuam no *splicing*, de forma a montar, rearranjar, e dissociar-se do spliceossomo. Duas proteínas da família DEAD-box Sub2 e Prp5 são necessárias para o reconhecimento pela proteína U2 snRNP e promovem rearranjos que permitem o pareamento de bases com U2 snRNA (KISTLER, 2001). Outras quatro helicases spliceossomais DEAH/RHA catalisam rearranjos que acompanham ou começam a ativação do

spliceossomo no começo do processo de *splicing*, e estes rearranjos se baseiam em sua capacidade de pareamento, o que é conservado na maioria das proteínas DEAD-box (JARMOSKAITE & RUSSELL, 2014). A helicases Ski2-like Brr2 promovem um rearranjo de larga escala enfraquecendo ligações das proteínas U4 e U6 snRNA e permitindo associações entre U2 e U6 e intra-U6 (RAGHUNATHAN, 1998). Adicionalmente, algumas helicases podem se utilizar de ATP para aumentar a fidelidade do processo de *splicing* (SEMLOW, 2012).

## 1.2 DEAD-box

O grupo das proteínas DEAD-box (Figura 1) compõem um grupo muito amplo e ubíquo, que são compostas de um núcleo de helicase e nove motivos de aminoácidos conservados (CORDIN et al., 2006). Estas proteínas podem atuar de muitas formas, sendo que a atividade de helicase é dependente do gasto de ATP. Entre as varias funções atribuídas a estas helicases, estão a de desagregadora de complexos proteicos de moléculas de RNA, facilitar o dobramento de RNA ou o anelamento de RNA, ou apenas se ligar a RNA (JANKOWSKY AND FAIRMAN, 2007). A ausência de algumas das proteínas DEAD-box como CsdA e SrmB causam sensibilidade ao frio (OWTTRIM, 2013).



**Figura 1** Helicase DEAD-box - Representação dos motivos de DEAD-box e estrutura de domínios conservada na família proteica. Modificado de Jarmoskaite & Russell, 2014



As helicases de RNA podem conter diversas fusões de domínios e especificidades diferentes, como mostrado na Tabela 1. Algumas fusões, como aquelas similares a DbpA, podem indicar que sua função seja atribuída mais frequentemente à montagem ribossomal, porém alguns ortólogos possam incluir outros domínios em sua sequência. Grande parte da variabilidade destas proteínas é devido às suas extremidades carboxi e amino-terminal, onde estas regiões podem variar de 50 a 328 aminoácidos para o amino-terminal e até 766 aminoácidos no caso do carboxi-terminal, conferindo especificidade e arcabouço para substratos (LÓPEZ-RAMIRÉZ et al., 2011).

Tabela 1 – Diversidade de proteínas DEAD-box e suas funções.

Proteína	Organismo	Função	Domínio DbpA	Referência
DeaD	<i>E. coli</i>	Montagem do ribossomo- Degradação de RNA	Região dependente	Moll et al. 2002
DbpA	<i>E. coli</i>	Montagem do ribossomo	sim	Fuller-Pace et al., 1993
RhlB	<i>E. coli</i>	Degradação de RNA	não	Py et al., 1996
SrmB	<i>E. coli</i>	Montagem do ribossomo	não	Charollais et al., 2003b
CshA	<i>Bacillus subtilis</i>	Montagem do ribossomo	não	Jain 2008
YxiN	<i>Bacillus subtilis</i>	Montagem do ribossomo	sim	Ando & Nakamura, 2006
YfmL	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Divisão celular	Não determinado	Garau et al., não-publicado
CshB	<i>Bacillus subtilis</i>	Montagem do ribossomo	não	Hunger et al., 2006
RhlE	<i>E. coli</i>	Montagem do ribossomo	Não	Jain, 2008

### 1.3 Biogênese ribossomal

As helicases DEAD-box que são associadas à biogênese ribossomal, em *E. coli*, são: SrmB, DbpA, CsdA e RhIE. SrmB interage com duas proteínas ribossomais, L4 e L24, que se ligam à região 5' do RNA ribossômico 23S (TRUBETSKOY et al., 2009), e a deleção de SrmB leva a sensibilidade ao frio, com acúmulo de subunidades 40S e 50S incompletas (CHAROLLAIS et al., 2003; JAIN, 2008). DbpA possui atividade de rearranjo estrutural de RNA devido ao reconhecimento do *hairpin92* no centro da peptidiltransferase ribossomal (FULLER-PACE et al., 1993; TSU et al., 2001), sendo que o reconhecimento do *hairpin* é mediada pelo domínio C-terminal RRM (RNA *recognition motif*). Porém, quando deletado este domínio, não se observa fenótipo aparente, nem montagem defeituosa de ribossomos, dado que este domínio rearranja o precursor de 50S, mas quando observado em um mutante dominante negativo (ELLES, 2009) que não possui atividade desenoveladora mas se liga a RNA, há a formação de ribossomos defeituosos. CsdA é também conhecida como DeaD, e pode atuar em diversas funções, como *chaperone* de RNA na biogênese ribossomal, no decaimento de mRNA, e tradução (IOST et al., 2013). CsdA atua em diversos estágios da biogênese ribossomal, substituindo, quando defectivo, SrmB, e pode ser suprimida por CspA que também possui atividade de *chaperone* (PHADTARE, 2011). CsdA, tal como DbpA, possui uma região carboxi-terminal similar a RRM que pode auxiliar no reconhecimento de RNA, mas não é definida como domínio pelo algoritmos presentes, tal como HMM (cadeias ocultas de Markov), que são adotadas pelo banco de dados de proteínas, o PFAM (<http://www.sanger.ac.uk/software/pfam>). Por sua vez, a RNA helicase RhIE é funcionalmente associada a CsdA, pois somente observa-se sensibilidade ao frio e acúmulo de precursores de 50S quando há deleção de ambos os genes, sugerindo uma complementaridade de funções entre ambos (JAIN, 2008).

#### 1.4 Degradosomo de RNA

O processamento de RNA pelo degradosomo de RNA tem como principal função a degradação e reciclagem dos RNAs celulares. O degradosomo de *E. coli* compõe-se pela ribonuclease RnaseE, à qual se associam a DEAD-box helicase RhlB, a exonuclease fosforolítica polinucleotideo fosforilase (PNPase), e a enzima glicolítica enolase (IOST et al., 2013). RhlB, diferentemente das outras helicases citadas, não atua na biogênese ribossomal mas sim na degradação de fragmentos e de estruturas terciárias de RNA. O núcleo do degradosomo associado a RNAseE ativa a degradação de RNA mensageiros, devido à região CTH (região carboxi-terminal, pouco conservada) que permite a ativação do complexo (KHEMICI et al., 2004). A RNA helicase CsdA também pode estar associada ao degradosomo em condições de choque-frio, como cultivo de *E. coli* a 15°C, e foi observado que a helicase pode se associar à RNAseE e à PNPase sugerindo que em estresse por frio pode existir um 'degradosomo de frio', que contaria com uma segunda RNA helicase para facilitar a ação das ribonucleases (PRUD'HOMME-GÉNÉREUX, 2004).

#### 1.5 *Caulobacter crescentus*

*Caulobacter crescentus* é uma bactéria Gram-negativa que cresce em ambientes aquáticos pobres em nutrientes e em solos úmidos, sendo um membro da subdivisão alfa 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. *C. crescentus* tem um ciclo de vida dimórfico, onde cada divisão assimétrica produz uma célula com flagelo e outra séssil com uma haste polar (CURTIS & BRUN, 2010). O ciclo desta bactéria (Figura 2) é dividido em G1, S e G2/M (REISINGER, 2007), onde a fase G1 é caracterizada pela diferenciação da célula flagelada para a forma com haste polar, há ejeção do flagelo e retração dos pili, e síntese da haste. A iniciação da replicação ocorre após a síntese das proteínas de adesão da haste ao substrato na célula talo, na fase S. Após o DNA ser completamente replicado e os nucleóides segregados (JENSEN, 2006), esta compartimentalização produz diferentes

pólos, e posteriormente a célula se divide assimetricamente formando dois tipos celulares (GOBER & MARQUES, 1995).

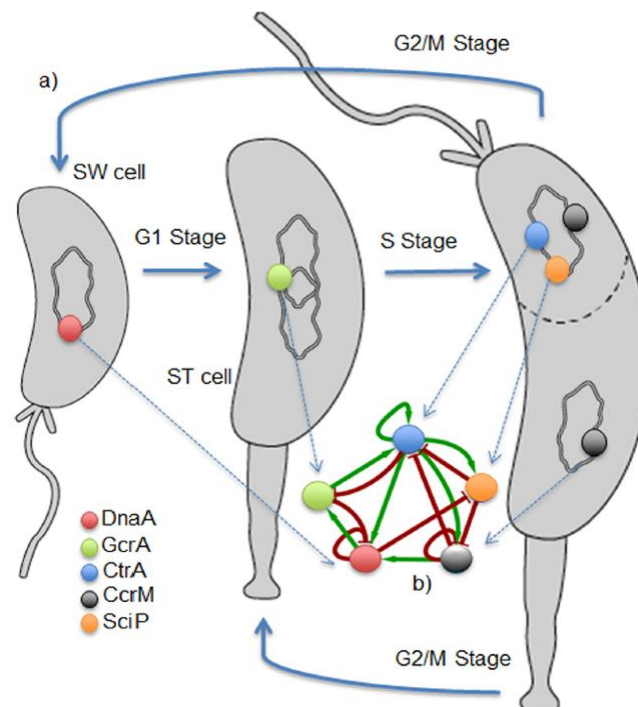


Figura 2 Ciclo celular de *C. crescentus* e suas principais proteínas regulatórias. Retirado de Quinones-Valles, 2014.

Um regulador central do ciclo celular de *Caulobacter crescentus* é a proteína CtrA, que é um fator de transcrição, auto-regulado, que regula uma centena de genes, mas sua ação principal se dá ao ligar a região OriC do DNA, bloqueando o acesso de DnaA e impedindo a replicação do DNA (QUON et al., 1998). CtrA tem sua transcrição inibida quando a metil-transferase CcrM metila seu promotor (REISENAUER et al., 1999), e SciP pode atuar como repressor de CtrA, ligando a CtrA e impedindo sua ação como fator de transcrição (GORA et al., 2010). CtrA atua como repressor de GcrA, que promove sua própria expressão em *feedback* positivo (LAUB et al., 2002). Enquanto CtrA inibe a transcrição de GcrA, DnaA promove a expressão dele (WINZELER, 1996). Partindo da célula natante, quando DnaA está em altas concentrações, e SciP está ativo, SciP reprime a transcrição de genes envolvidos no desenvolvimento dos pili e flagelo (TAN et al., 2010), e neste ponto ocorre a síntese do talo e começa a diferenciação para a forma sésil. GcrA começa a ser expresso, e leva à expressão de genes ligados a replicação do DNA. CtrA

promove a expressão de genes ligados à divisão celular, e CcrM metila o DNA impedindo a transcrição. Quando CtrA, CcrM e SciP estão altamente expressos ocorre a divisão assimétrica de uma célula-filha natante, e a célula-talo fixa.

### 1.6 Estresse frio

As bactérias mesofílicas (20°C a 45°C) sofrem alterações metabólicas quando expostas a temperaturas baixas como 10°C, e ocorrem muitas alterações moleculares que levam à modificação dos genes expressos e de crescimento (JONES et al., 1987). Muitas moléculas podem sofrer modificações em seu dobramento devido ao novo equilíbrio de energia livre, como é o caso de fitas de RNA, que tendem a formar estruturas secundárias, e terciárias com mais facilidade, podendo alterar sua expressão. Nestas condições, são expressas proteínas de choque-frio, que permitem a reorganização durante uma fase de adaptação ao frio, chamada aclimatação (PHADTARE et al., 1999).

As proteínas de choque-frio (Csp) possuem um domínio conservado, observado em CspA, que é a principal proteína de choque frio em *E. coli*, e em outras oito proteínas parálogas (WANG et al., 1999), que atuam como *chaperones* de RNA linearizando estruturas secundárias e promovendo a tradução de RNA mensageiros que formem pareamentos internos. Destas, CspC e CspE são expressas constitutivamente, independente da temperatura (YAMANAKA et al., 1994), e CspD é expressa na fase estacionária e em condições de carência de carbono (YAMANAKA & INOUE, 1997). As RNA helicases, tal como as proteínas de choque frio, têm um papel muito importante na resposta ao estresse frio, pois permitem que estruturas dependentes de RNA, como o ribossomo e o degradossomo funcionem da forma devida.

## 1.7 Relação estrutura e função das RNA helicases

A RNA helicase de *E. coli* DbpA interage com seu substrato por meio de um motivo de reconhecimento carboxila-terminal, que constitui um domínio de ligação específico com a forquilha 92 do centro peptidiltransferase no RNA ribossômico (rRNA) 23S (HARDIN et al., 2010). Todas as RNA helicases de *E. coli*, (IOST & DREYFUS, 2006) possuem atividade de helicase, porém têm extensões C-terminais distintas, como DbpA, e tal ligação é mediada diretamente pela região C-terminal; já CsdA e SrmB precisam de extensões simples fita, seja 3' ou 5' para iniciar a atividade de helicase, porém tais sítios não possuem a mesma especificidade que DbpA. RhlB não possui atividade de helicase quando sozinho, esta precisa ser estimulada pela região C-terminal da RNAase E para se ativar, e ambos estão envolvidos na composição do complexo do degradossomo. RhlE se liga à RNAaseE porém não é conhecida a sua função.

As helicases DEAD-box de *E. coli* associadas à biogênese ribossomal SrmB e DbpA, conservam os mesmos motivos estruturais, *Walker A*, *Walker B*, *SAT*, *DEAD-box*, e *Arginine-finger*, porém devido à sensível diferença no C-terminal de ambas proteínas, SrmB não tem a mesma especificidade que DbpA (PROUX., et al., 2011). DbpA reconhece o *hairpin92* no centro da peptidiltransferase ribossomal (FULLER-PACE et al., 1993; TSU et al., 2001), mediada pelo domínio C-terminal RRM (RNA recognition motif), que é flexivelmente ligado ao núcleo da helicase e melhora o desenovelamento de hélices de RNA posicionadas tanto a montante quanto a jusante do *hairpin* (HARDIN et al., 2010). A proteína DbpA teve sua cinética e motivos determinados, onde mostra-se que há atividade de ATPase quando os motivos *Walker AB* e *Arginine-finger* estão intactos, permitindo o desenovelamento pela região de helicase (DEAD), onde a deleção de qualquer uma das argininas envolvidas resulta na perda de função de helicase da proteína (ELLES et al., 2007).

Em *C. crescentus* CB15 existem três genes codificando RNA helicases da família DEAD-box: CC\_0835 (RhlE; DEAD/DEAH helicase), CC\_1847 (RhlB; DEAD/DEAH helicase) e CC\_1478 (DbpA; DEAD-box helicase-like). Trabalhos

anteriores mostraram que o mutante *rhIE* tem um fenótipo de baixa resistência ao frio (MAZZON *et al.*, 2008; AGUIRRE *et al.*, 2017). RhIB foi identificada como a proteína integrante do degradossomo a 30°C, associada à degradação de RNA (HARDWICK *et al.*, 2013). CC\_1478 está anotada como uma proteína passível de comportar ambos os domínios DbpA ou SrmB, segundo a anotação depositada (CDD, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine), porém há evidência de que uma região de reconhecimento de RNA (RRM) está presente caracterizando a proteína como uma DbpA, segundo critérios em ELLES e col. (2007). Assim, nos referiremos ao produto do gene CC\_1478 de *C. crescentus* como DbpA.

A distribuição filogenética geral das proteínas DbpA em proteobactérias e firmicutes evidencia que a região que se liga a RNA (RNA binding domain, RBD) é muito diversa, e especificamente em gama-proteobactérias a ocorrência destes genes parece recente, e o aparecimento do domínio DbpA completo é basal. É inferido que tanto SrmB como RhIB, em *E. coli* parecem derivar de um ancestral com o domínio completo, e portanto SrmB e RhIB seriam parálogos de DbpA. Dentre as espécies analisadas observou-se uma diferença entre as regiões C-terminal grande, variando entre 766 a 357 aminoácidos, conservando apenas a característica básica dos resíduos, necessários à função ligadora de RNA (LÓPEZ-RAMÍREZ *et al.*, 2011).

## 1.8 Objetivos

Este trabalho propõe caracterizar a regulação da proteína CC\_1478 (DbpA), sua distribuição filogenética, definir seu papel celular na condição de estresse frio e avaliar a importância do seu domínio C-terminal. Para isso, abordou-se:

- Construir linhagens que expressem a RNA helicase codificada pelo gene CC1478 (*dbpA*) em fusão com um epítipo para identificação por métodos imunológicos .
- Definir o padrão de expressão do gene CC1478 (*dbpA*) em resposta a estresses .
- Analisar o papel da proteína na adaptação ao frio, na biogênese ribossomal e no degradossomo de RNA.
- Avaliar a importância da região rica em lisinas para a função da proteína.
- Avaliar por métodos de análise filogenética o surgimento deste domínio C-terminal.



## 2 MATERIAL E MÉTODOS

As linhagens de *Caulobacter crescentus* foram cultivadas sob agitação a 30°C em meio PYE (peptona 2 g/L; extrato de levedura 1 g/L; MgSO<sub>4</sub> 0,2 g/L; CaCl<sub>2</sub> 0,5 mM) (Ely 1991). As linhagens de *Escherichia coli* foram cultivadas a 37°C em meio LB (triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; pH 7,5). Quando necessário, o meio de cultura foi suplementado com os antibióticos: tetraciclina (12,5 µg/mL), canamicina (50 µg/mL), gentamicina (15 µg/mL) ou carbenicilina (100 µg/ml).

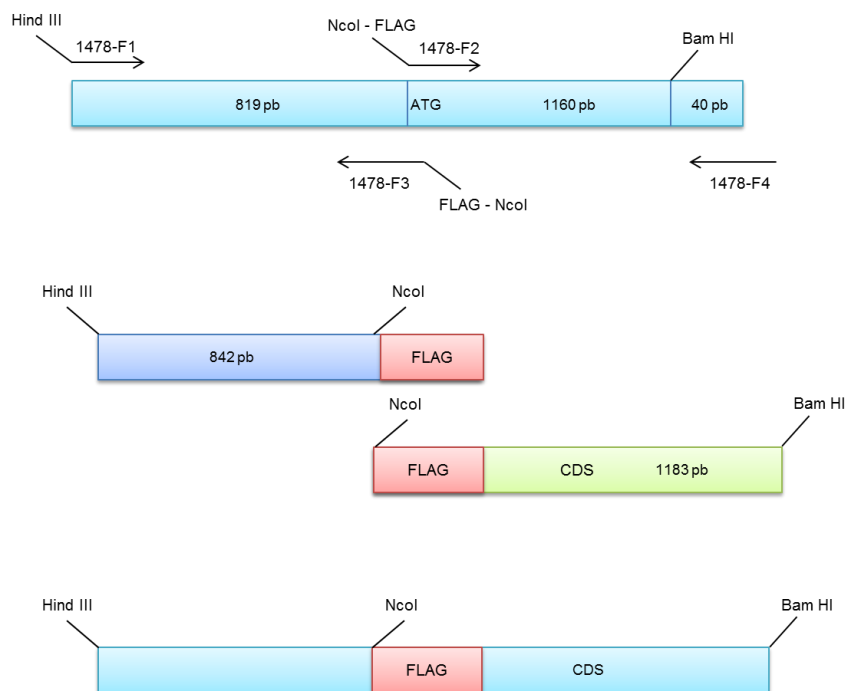
### 2.1 Construção da proteína RNA-helicase com cauda de epitopo

A estratégia de clonagem por digestão com enzimas de restrição foi adotada utilizando os fragmentos obtidos pela técnica de PCR de fusão (Figura 3), com o fragmento 1 gerado pela amplificação dos primers 1478-f1 e 1478-f3 e o fragmento 2 sendo gerado pela amplificação dos primers 1478-f2 e 1478-f4 (Tabela 2) tendo como molde o DNA genômico da linhagem *C. crescentus* NA1000, e ocorreu em duas etapas. Os fragmentos foram amplificados separadamente e, em uma segunda etapa da reação de amplificação, foram unidos proporcionando o pareamento entre a região contendo a sequência codificante para o epitopo FLAG de cada um dos fragmentos amplificados. O produto gerado foi utilizado como DNA molde para uma terceira reação utilizando-se apenas os oligonucleotídeos externos (1478-F1 e 1478-F4). Primeiro montamos o inserto completo com o epitopo no vetor de clonagem pUCBM21, que possui os sítios de restrição, HindIII, NcoI e BamHI, em ordem sequencial, e depois de verificada a presença do fragmento completo, este foi digerido com HindIII e BamHI, purificado por meio de eletroforese em gel de agarose e kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel), e então ligado ao vetor pNPTS138 linearizado por digestão com as mesmas enzimas utilizadas no inserto.

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Nome do Oligonucleotídeo	Sequência do Oligonucleotídeo
1478-f1	AAAAAAGCTTGAAGGGTCCGCATATAGAAGGC
1478-f2	CCATGGACTACAAGGACGACGACGACAAGATGCCCTTCCCCGCC TCCCACC
1478-f3	CTTGTCGTGTCGTCTTGTAGTCCATGGATGGGTCCAGTTCAC GTCTG
1478-f4	GACATCCTCTTCGGTCGAGGC
pbv-dbpat truncado forward NdeI	CATATG-TTGTGTGCGCGGTGCGCAGAC
pbv-dbpat truncado reverse-Eco RI	GAATTC-TGGTCGGGGTGATCTCAACGTCTTCGC
prklacz290 1546PF- Bam HI	GGATCC-CAGGTCGTGACTTCACCGGTC
prklacz290 1546PR- Hind III	AAGCTT-TGAGCGGCGAGAGCCC
Slic-pPNT R	AAGCTTGGCGCCAGCCGGCTTC
Slic-pPNT F	CTGGATCCACGAATTCGCTAGCTTC
Slic1546-frg1-F	GGCTGGCGCCAAGCTTGGGGGAAACATCGATGAAAC
Slic1546-frg1-R	GTCATCGTCTTTGTAGTCCATATGGGTCCAGTTCACG CCCATATGGACTACAAAGACGATGACGACAAGCCCTTCCCCGCC TCCCAC
Slic1546-frg2-F	GAATTCGTGGATCCAGCGACGGCGTGCTCGACCTC
Slic1546-frg2-R	ATA ATA ATA GAA TTC TTA CAT GCT GAC GCG CGG TTC GCG
1478-STOP-dbpA	CGTCGGCACGCCCGGCCGTC
CC1478A	TCCTCGCGGAAGCCCATGTGTCC
CC1478B	

O vetor suicida pNPTS138 com o fragmento do gene CC1478 codificando o epítipo FLAG foi introduzido em *Escherichia coli* S17-1 (SIMON, PRIEFER, PÜHLER 1983), através de eletroporação e mobilizado por conjugação para *Caulobacter crescentus* NA1000 (EVINGER & AGABIAN, 1977), onde o gene endógeno foi substituído pelo construído por dois eventos de recombinação homóloga.



**Figura 3** Etapas na clonagem por PCR de fusão. Em uma primeira etapa há a amplificação separada dos fragmentos incorporando a sequência do epítipo FLAG, em uma segunda reação há a junção dos dois fragmentos na ausência de oligonucleotídeos, para que haja pareamento das sequências e fusão do molde, na última reação há introdução do par de oligonucleotídeos externos permitindo a amplificação do fragmento contendo a sequência do epítipo em seu interior.

## 2.2 Construção da proteína RNA-helicase truncada no domínio de DbpA

A construção da proteína truncada no domínio DbpA foi obtida através da análise da estrutura secundária da proteína, modelada pelo programa PYHRE2 (KELLEY et al, 2015). Após a análise da região em comparação às demais da família, e em relação ao grupo filogenético, a provável alfa-hélice inicial do domínio DbpA foi removida, assim como os 266 aminoácidos finais da proteína, caracterizando na linhagem DbpACc475. Com os oligonucleotídeos 1478-f1 e 1478-STOP-dbpA foi amplificada a sequência da proteína truncada e com os oligonucleotídeos 1478-A e DBPAT-Reverse foi amplificada a sequência da proteína truncada DbpACc537 que não possui os últimos 204 aminoácidos, correspondentes a região C-terminal não estruturada após DbpACc. Utilizou-se a polimerase Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo-Scientific), e após purificação com kit NucleoSpin Gel and PCR Clean-

up (Macherey-Nagel) foi realizada a reação de *A-tailing*, onde se utilizou a polimerase Taq DNA polimerase (Sinapse), com dATP 2 mM, PCR Buffer Taq 10x, em ciclo único de 72°C por 30 min, e a amostra do fragmento amplificado. Após o *A-tailing* o fragmento foi ligado ao vetor de clonagem pGEM T-easy (Promega), inserido por eletroporação em *E.coli* DH10 $\beta$ , e as colônias tiveram seu plasmídeo extraído segundo protocolo padrão (SAMBROOK et al., 2001) e foram digeridos com NdeI e EcoRI (New England BioLabs) e ligados ao plasmídeo replicativo pBV-MCS4 (THANBICHLER et al., 2007). Ambos plasmídeos foram inseridos na linhagem  $\Delta$ dbpA, e estas linhagens ( $\Delta$ dbpA pBV DbpACc537 e  $\Delta$ dbpA pBV DbpACc475), a linhagem selvagem com plasmídeo vazio (NA1000 pBV  $\emptyset$ ) e complementada com a proteína completa ( $\Delta$ dbpA pBV DbpACc) foram cultivadas (em meio contendo vanilato 500  $\mu$ M), em triplicata biológica, a 30°C até atingirem DO=0,2 e transferidas para 15°C e a densidade óptica foi monitorada por 72 horas, em intervalos de 4 horas.

### 2.3 Ensaio de sedimentação de frações ribossomais

O protocolo de sedimentação foi adaptado de (BOUTTE & CROSSON, 2011), onde 800 mL de cultura de *C. crescentus* NA1000 (FLAG-DbpA) cresceu em meio PYE até a DO<sub>600nm</sub> = 0,4–0,5. As células foram sedimentadas e ressuspensas em 2 ml de tampão TM (20 mM Tris-Cl pH 7,5; 15 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 mg/ml de 1 PMSF e Coquetel Inibidor de Protease sem EDTA (Sigma). 800  $\mu$ l de 20 mg/ml de lisozima foram adicionados e a amostra enriquecida em esferoplastos foi lisada por cinco ciclos sucessivos de congelamento e descongelamento em banho de gelo (4°C) e gelo seco em etanol a -60 ° C. Em seguida, adicionaram-se 80  $\mu$ l de 10% deoxicolato e 20  $\mu$ l de DNase I livre RNAase (Thermoscientific) e os extratos foram incubados em gelo durante 20 min seguido de uma centrifugação a 12 000 r.p.m. por 30 min a 4°C. O lisado limpo foi removido e aproximadamente 50 DO<sub>260nm</sub> foram colocadas no topo de um gradiente de 15-45% de sacarose em Tampão E (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, NH<sub>4</sub>Cl 100 mM,  $\beta$ -mercaptoetanol 2 mM). O gradiente de sacarose foi centrifugado numa ultracentrífuga Hitachi himac CPN100X com rotor P40ST a 39.000 r.p.m. durante 3 h a 4°C. O gradiente foi

automaticamente fracionado em 25 amostras de 0,5 mL e a OD260 de cada fração foi lida em um leitor de placas SpectraMax Paradigm (Molecular Devices) ou acoplada ao leitor de UV Model EM-1 Econo™ UV Monitor (BioRad), onde leituras contínuas (0,5ml/minuto) de tensão (V) correspondem a absorvância em 260nm, na sensibilidade de 0,1 AUFS.

## **2.4 *Imunoblotting***

O método utilizado foi o de TOWBIN (TOWBIN et al., 1982). Cada cultura (5 ml) foi centrifugada por 5 min a 12.000 rpm e as células 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%; ajustado para pH 6,8). Após serem fervidas por 5 min, foram imediatamente colocadas em gelo e centrifugadas por 3 min. Também foram analisadas por Western blotting as amostras das frações ribossomais, as quais passaram pelo processo de precipitação com 12,5 M de ácido tricloroacético (TCA), onde o TCA 50 % foi adicionado em 500 µl da fração e incubado por 30 min em gelo. Após uma centrifugação a 12000 rpm a 4°C, foi descartado todo o sobrenadante e as proteínas foram ressuspensas com solução O 2X para seguir com o protocolo do Western.

O sobrenadante foi aplicado em um gel de SDS-poliacrilamida em gradiente Bolt 4-12% (Invitrogen), e subsequentemente submetido a eletroforese a 150 V por 75 min. As proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, em tampão de transferência, através de uma corrente de 250 mA por 1 h 30 min. A membrana foi incubada com TBS 1X (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, NaCl 150 mM) com 5% de leite em pó desnatado, para bloquear possíveis ligações inespecíficas com o anticorpo primário. Após incubar por 1 hora adicionou-se o anticorpo primário na diluição de 1: 20000 (Anti-FLAG - DYKDDDDK - M2 System Antibody anti-mouse, Sigma) em solução de TBST 1x (TBS 1x + Tween 20 0,05%) e incubou-se a 4°C por 1 hora. Foram feitas 4 lavagens com TBST 1x e uma lavagem com TBS 1x antes de incubar com o anticorpo secundário fluorescente Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG H+L (Molecular Probes by Life Technologies) na diluição de 1:5000 por 1 hora e foi detectado a fluorescência em transiluminador de UV (Bio-Rad Lab), e as

bandas foram submetidas a densitometria com o programa ImageJ (ImageJ, 2012) quando aplicável.

## **2.5 Construção da fusão transcricional com a região promotora de CC1478**

Como região promotora de CC1478 foram considerados os 350 pb a montante da região codificante do gene. Foram utilizados os oligonucleotídeos 1546-PF e 1546-PR (Tabela 2), portando respectivamente os sítios das enzimas de restrição Bam HI e Hind III em sua sequência, para amplificar a região promotora. Foi utilizado o mesmo método de *A-tailing* descrito anteriormente para tratar o amplificado e ligado ao vetor de clonagem pGEM T-easy (Promega), a ligação foi eletroporada em *E.coli* DH10 $\beta$  eletrocompetentes. Foi realizada a extração plasmidial (SAMBROOK et al., 2001) e após digestão com as enzimas Hind III e Bam HI os fragmentos foram ligados ao vetor pRK*lacZ*290 (GOBER & SHAPIRO, 1992) previamente digerido com as mesmas enzimas. O vetor com o inserto foi eletroporado em *E.coli* S17-1 e as colônias transformantes foram conjugadas com a linhagem NA1000 de *Caulobacter crescentus*.

## **2.6 Ensaios de expressão**

A expressão da região promotora de CC1478 em fusão ao gene repórter *lacZ* foi determinada por ensaio de atividade de  $\beta$ -galactosidase segundo descrito por MILLER (1972), em intervalos de tempo de 15 minutos até 3 horas a 15°C.

## **2.7 Análise de expressão por qRT-PCR**

Foram analisados tanto o mRNA de *dbpA* em NA1000 a 30°C quanto em diversos estresses para testar as condições de expressão do transcrito. Para a extração de RNA total a linhagem foi cultivada em 30°C até atingir DO<sub>600nm</sub>=0,5, então alíquotas de 5 ml foram retiradas antes e depois da adição dos estresses (Tabela 3), e seu RNA total foi purificado utilizando TRIzol™ Reagent (Invitrogen™).

**Tabela 3 - Estresses analisados na expressão do gene e seus respectivos tempos de exposição**

Estresse	Tempo de exposição
15°C	60 min
NaCl 85 mM	60 min
Sacarose 150 mM	60 min
Etanol 3,5%	60 min
pH 5 (0,8 ul HCl 12M)	60 min
pH 8 (0,5ul NaOH 10N)	60 min
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 5 mM	60 min
Fase Estacionária	24h após DO <sub>600nm</sub> =0,5
Controle em fase logarítmica a 30°C	

As amostras de RNA foram tratadas com DNAase I (Life Technologies), com aproximadamente 1 U para cada 1 µg de RNA. Após checagem por PCR para verificar se havia DNA genômico restante, foi realizada a conversão de RNA a cDNA, utilizando a transcriptase reversa SuperScript III First-strand for RT-PCR (Life Technologies). Os produtos foram quantificados por meio do Nanodrop para assegurar que as quantidades de cada amostra fossem comparáveis na corrida do qRT-PCR (reação em cadeia da polimerase em tempo real, quantitativo). Segundo testes anteriores, foi escolhido o gene CC\_0088(glutamato desidrogenase) como controle endógeno para os estresses, e o PCR foi realizado utilizando-se SYBR green e PCR master mix (Applied Biosystems); as reações foram de 12,5 µl de volume final, 6,25 µl de SYBR green e PCR master mix, 1 µl de cada primer (25 pmol), 50 ng/µl de cDNA e 2,25 µl de água MilliQ (Millipore) tratada com DEPC 0,1%.

## 2.8 Análises filogenéticas

De forma a analisar variações no domínio DbpA e possíveis motivos funcionais ainda não descritos foram colhidas 8268 sequências não redundantes de bactéria através de agrupamentos iterativos considerando 35% de identidade mínima entre as sequências consideradas. Foram produzidas topologias considerando apenas a região conservada, utilizando o programa RAxML 8 (STAMATAKIS, 2014) sob o modelo JTT, e aplicando 10000 *bootstraps*.

## 2.9 Análises de domínios

A análise da região rica em lisinas C-terminal somada à região truncada do domínio proposto DbpA foi realizada por homologia estática (WHEELER, 2001), onde 344 sequências não redundantes de alfa-proteobactérias foram coletadas a partir do programa SMART (SCHULTZ et al., 1998), quando colocado como busca a região obtida da proteína codificada por CC1478 (204 últimos aminoácidos) e alinhadas utilizando o programa MAFFT (KATO, 2013), utilizando o parâmetro de alinhamento global e 1000 iterações. Foram produzidas topologias considerando apenas a região conservada, utilizando o programa PhyML 3.0 (GUINDON et al., 2010) sob o modelo JTT, e aplicando 10000 *bootstraps*. Desta análise foi extraído um WebLogo contendo os aminoácidos mais conservados na região da cauda de DbpA ancorando os domínios principais mais conservados, de DEAD, Helicase C-terminal e DbpA. Posteriormente foi feita uma análise da família em bactérias, similar à feita com o SMART, porém realizando as buscas com o HMMER (FINN et al., 2015) com 5 iterações utilizando DbpA como busca, produzindo grupos com a ferramenta MMSEQS (HAUSER et al., 2016) utilizando 35% de identidade mínima e 80% de cobertura e com scripts em Python (HYLTON, 1995) a fim de recuperar as arquiteturas associadas, caso haja peculiaridades significativas para o C-terminal de DbpA de *C. crescentus*.



### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

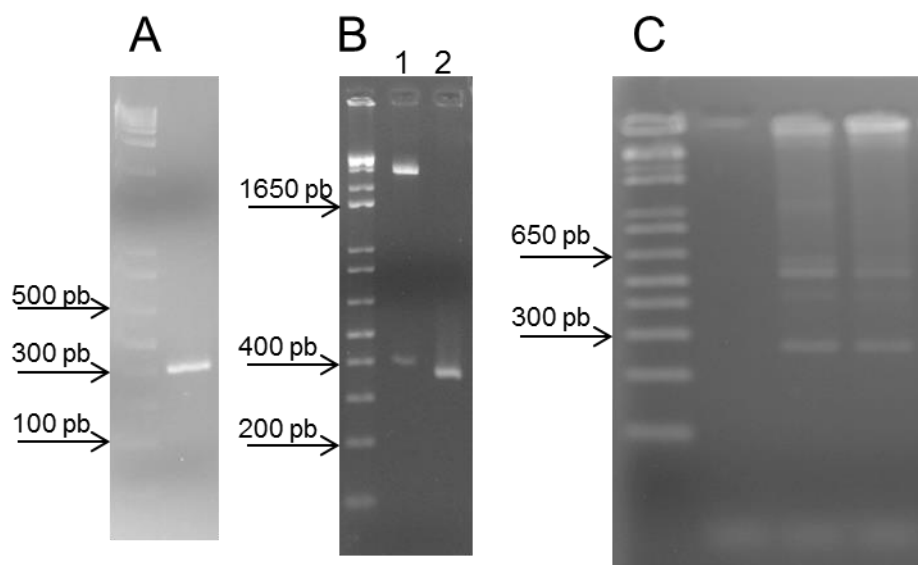
A resposta de *C. crescentus* ao frio tem sido bem estudada, e mostra que além das pequenas proteínas de choque frio (CSPs), as RNA helicases têm um papel importante para a sobrevivência nessas condições (MAZZON *et al.*, 2008). Neste trabalho caracterizamos uma destas helicases, codificada pelo gene CC1478, e que aqui será chamado de *dbpA*. Inicialmente analisamos o padrão de expressão do gene, para verificar se este é induzido em baixa temperatura e em resposta a outros estresses.

#### 3.1 Ensaios de expressão

A região promotora de CC1478 foi inserida no vetor pRK*lacZ*290, replicativo em *Caulobacter*, em fusão transcricional ao gene *lacZ*. Inicialmente foi amplificada a região 350 pb a montante da região codificadora, e ligada ao vetor pRK*lacZ*290, e a seguir este foi inserido por transformação em *E. coli* S17-1. Foram extraídos os plasmídeos das colônias obtidas e a região do promotor foi sequenciada para confirmação da clonagem e da sequência correta. As colônias transformantes de *E. coli* foram utilizadas para conjugação com a linhagem selvagem de *Caulobacter crescentus* NA1000 (Figura 4).

O clone obtido foi incubado em PYE até D.O. 0,5 e utilizados nos ensaios de medida de atividade de beta-galactosidase (Figura 5), conforme MILLER (1972). Os valores baixos de expressão (abaixo de 200 unidades Miller) são considerados basais para o repórter *lacZ*. Nos ensaios de beta-galactosidase pode-se observar um leve aumento na expressão do gene quando exposto ao frio (15°C) por 3 h, sugerindo que possa haver uma regulação transcricional da indução em baixa temperatura. O gene *rhIE* de *C. crescentus* não apresenta aumento na expressão em frio quando analisada a fusão transcricional do gene porém no mutante deste gene há uma expressão mais elevada o que sugere que transcricionalmente este gene tenha uma autorregulação negativa (VICENTE, 2017). Entretanto, as análises de fusões traducionais mostraram que ocorre aumento da expressão em frio, que

depende de sua extensão 5'UTR longa. Em *E. coli*, as funções de resposta ao frio são exercidas por proteínas de choque-frio e helicases de RNA, onde CspA atua como chaperona de RNA (PHADTARE, 1999), impedindo a formação de estruturas secundárias de RNA. *cspA* possui uma sequência de 11 nucleotídeos a montante do códon iniciador caracterizando um 5'UTR conhecido como cold-box (JIANG et al., 1996), e estas extensões se mostram comuns em genes de choque frio (MITTA et al.; 1997).



**Figura 4** Eletroforeses do processo de clonagem do promotor de *dbpA* no vetor pRK*lacZ*290. A: Gel do amplificado por PCR, com tamanho esperado de 350 pb. B: Digestão do vetor de clonagem pGEM T-easy com fragmento de 350 pb (1) e sua eluição (2). C: Amplificação por PCR da região promotora obtido de clones com pRK*lacZ*290 e fragmento de 300 pb amplificado. Foi utilizado o 1kb Plus Dna Ladder (Invitrogen) como padrão molecular em todos os géis, o gel apresentado é de 1% de agarose.

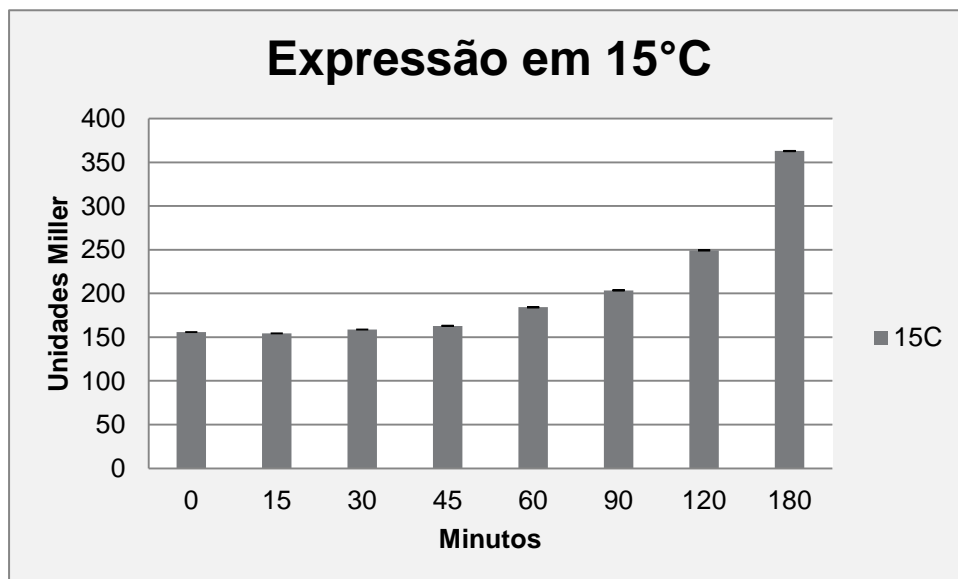


Figura 5 Ensaio de Atividade de beta-galactosidase de extratos celulares contendo a fusão *dbpA-lacZ*. Ensaio realizado em triplicata biológica e em duplicata técnica.

Como os ensaios de atividade de beta-galactosidase não mostraram uma grande variação e podem ser difíceis de interpretar, devido a longa atividade residual da proteína beta-galactosidase (CAZORLA et al., 2001), decidimos analisar a expressão de *dbpA* nas outras condições por qRT-PCR. As amostras RNA total para análise de estresses foram obtidas com quantidades apreciáveis de RNA, acima de 1 µg/µl. Entretanto, houve certa contaminação com DNA genômico remanescente (Figura 6A), então as amostras foram tratadas com DNAase I e submetidas a um PCR de checagem de negativação, onde não deve haver bandas amplificadas, pois não deve haver DNA disponível na reação (Figura 6B).

Após este primeiro tratamento das amostras foi feita a conversão em cDNA, e um PCR de checagem para verificar se o RNA convertido poderia ser amplificado (Figura 6C). A seguir foi realizada a quantificação da expressão dos transcritos, pelo método de  $\Delta\Delta Ct$ , normalizando pelo gene endógeno

CC\_0088. Pode-se observar que apenas na condição de mudança de fase de crescimento (Estacionária 24 h) a expressão foi significativamente menor, e os outros estresses não se mostraram capazes de influenciar significativamente a expressão de CC\_1478, em fase logarítmica (Figura 7) Nas células expostas ao frio e a NaCl houve uma indicação de aumento nos transcritos, mas não foram estatisticamente significativas. Quando foi avaliado por sequenciamento de RNA total da amostra NA1000 a 30°C em relação à de 15°C (VICENTE, 2017), notou-se que *dbpA* é significativamente diferencialmente expresso, sendo regulado positivamente (7,6 vezes de indução) em condição de choque-frio. Entretanto, não foi possível verificar este aumento consistentemente em nossos ensaios de qRT-PCR.

A expressão de outros ortólogos de DbpA é afetada por alguns estresses, como em *E. coli* onde foi visto que *dbpA* tinha alguma implicação na fase estacionária, como descrito por Blattner e colaboradores (1997), e que também possui níveis aumentados em choque-ácido e concentrações sub-inibitórias de ciprofloxacina. Aguirre e colaboradores mostraram que a RNA helicase RhIE de *C. crescentus* não sofre alteração transcricional em sua expressão, porém há indícios que o 5'-UTR longo de RhIE atue na estabilização do transcrito, assim maximizando sua expressão, em um mecanismo pós-transcricional (AGUIRRE et al., 2017). No caso de DbpA é observado um 5'UTR longo possivelmente regulatório, que estabilizaria o transcrito de DbpA mantendo a proteína de forma constante na célula, apesar da parada de transcrição esperada pelo choque-frio.

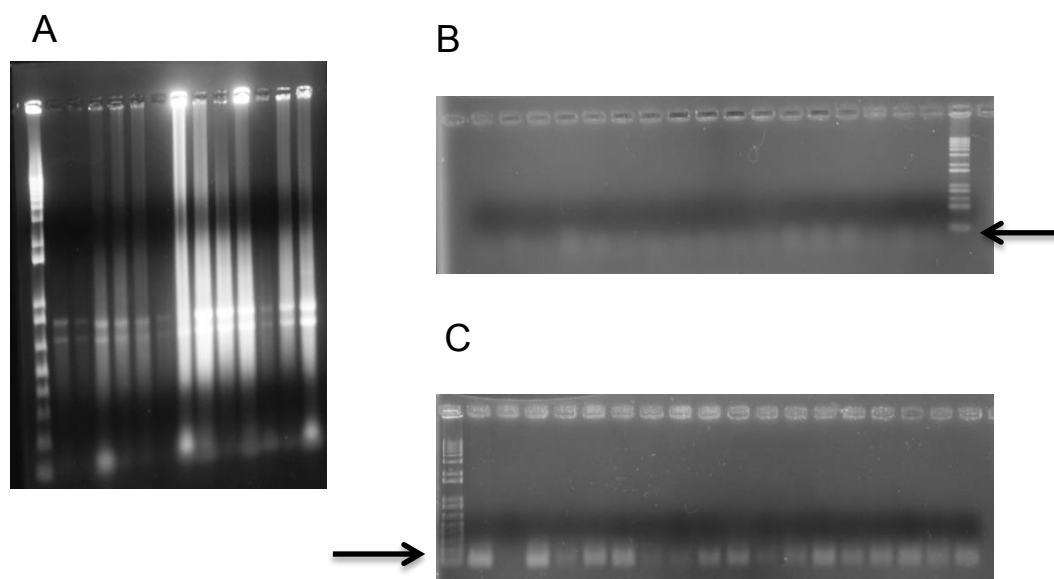


Figura 6 Processamento do RNA total para análise por qRT-PCR. A. Gel 1% agarose verificando integridade do RNA extraído. B. PCR de negivação após tratamento com DNAase I (quantidade normalizada pela quantidade de ácido nucléico presente em cada amostra). C. PCR de positivação pós-síntese de cDNA. As setas indicam a banda esperada, de 100kb no caso de amplificação.

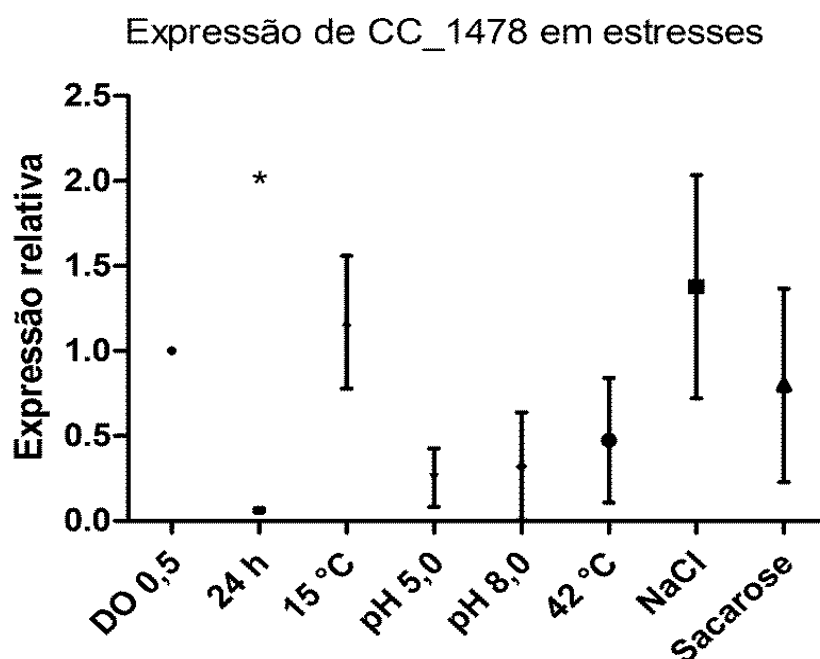
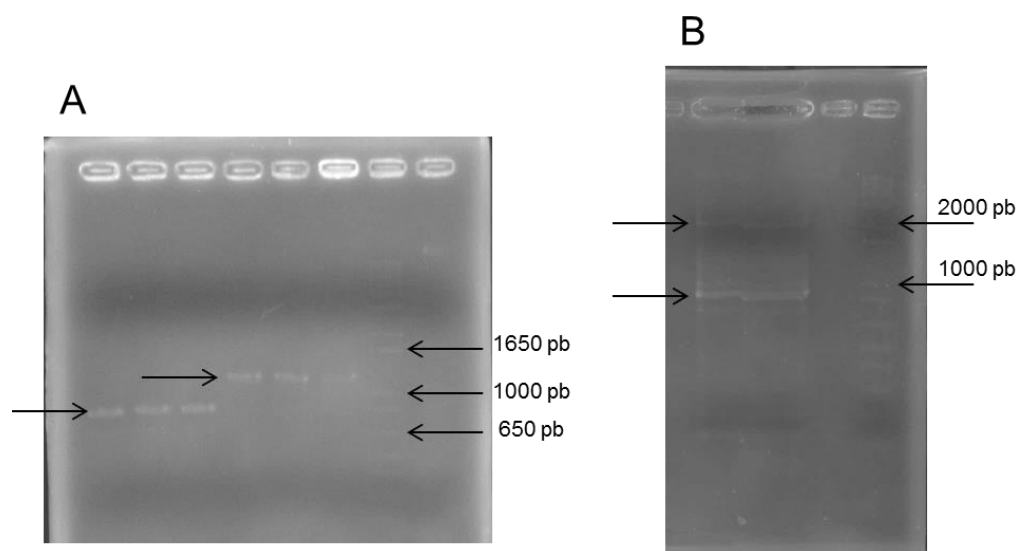


Figura 7 Gráfico de expressão relativa dos estresses testados em relação a condição inicial ( $DO_{600nm}=0,5$ ). Considerou-se o teste de One-Way anova, como análise de variância entre todas as amostras pela correção de Tukey, com  $p < 0,05$ . 24h – 24h após atingida  $DO_{600nm}=0,5$ . 15°C – estresse aplicado de 15°C por 60 minutos sob agitação. pH 5,0 – estresse ácido por adição de HCl ao meio, e mantendo sob agitação a 30°C. pH 8 – estresse básico por adição de NaOH ao meio, e mantendo sob agitação a 30°C. 42°C – estresse por choque térmico, a cultura foi mantida a temperatura de 42°C por 60 minutos. NaCl – estresse por adição de NaCl 85 mM ao meio e mantendo a 30°C sob agitação. Sacarose – estresse por adição de sacarose 150 mM ao meio e mantendo a 30°C sob agitação.

### 3.2 Construção da proteína RNA-helicase com cauda de epitopo

Como não foi observada uma regulação transcricional clara para o gene *dbpA*, fomos investigar se a concentração intracelular da proteína variava em resposta a diferentes condições do meio. Para isso, foi construída uma linhagem contendo a proteína DbpA carregando uma etiqueta na extremidade amino-terminal codificando um epitopo FLAG reconhecido por anticorpos comerciais. Inicialmente foi adotada a metodologia de PCR de fusão para construção do inserto contendo a sequência para o epitopo FLAG, onde os fragmentos foram amplificados (Figura 8A) e na segunda etapa de PCR, onde deveria haver o anelamento da região homóloga entre os fragmentos, a eficiência da amplificação foi muito baixa (Figura 8B).



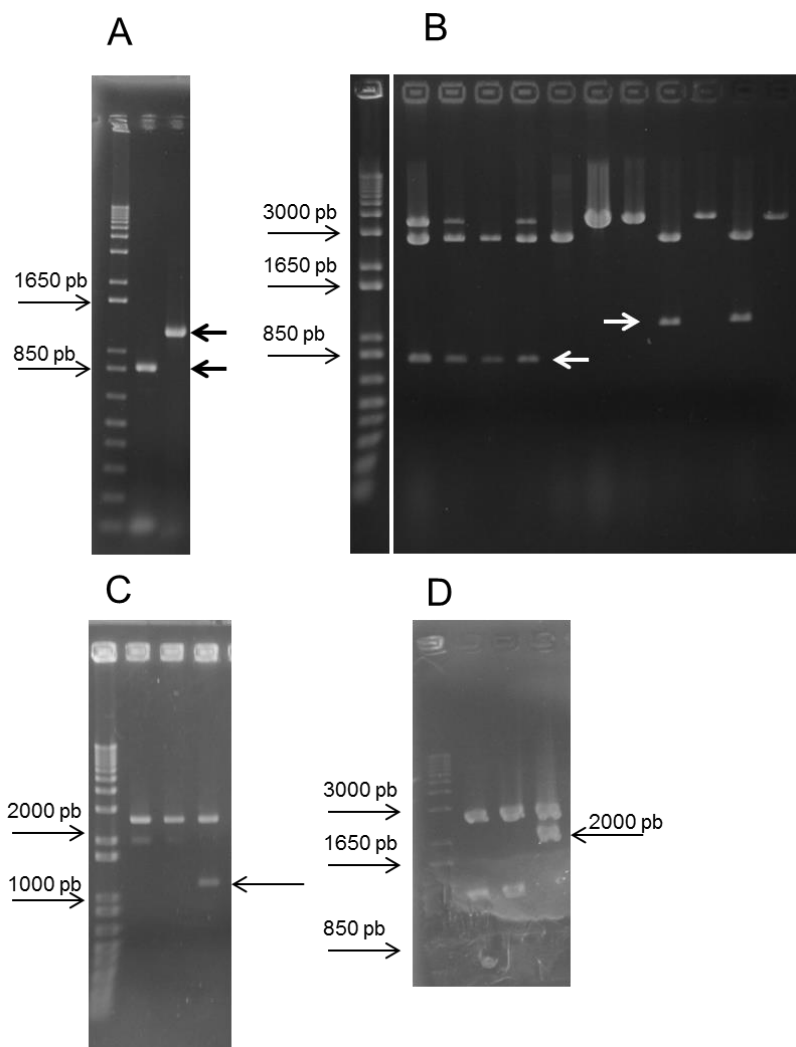
**Figura 8** Eletroforeses PCR de fusão. A: Os fragmentos estão destacados nas setas a esquerda, sendo o fragmento menor com 842 pb e o maior com 1183 pb. B: Eletroforese depois da etapa de PCR de anelamento entre os fragmentos, espera-se ter uma banda com a soma dos fragmentos (2002pb) na seta superior a esquerda e na seta abaixo se pode observar o restante dos fragmentos livres. Foi utilizado o 1kb Plus Dna Ladder (Invitrogen) como padrão molecular em todos os géis, todos os géis apresentados são de 1% de agarose.

Para contornar o problema de eluição do fragmento unido, várias abordagens foram empregadas na purificação, onde foi adotado o protocolo de máxima eficiência para a purificação. Mesmo assim, não foi possível recuperar a amostra obtida e, portanto foram adotadas medidas para aumentar a eficiência do processo do PCR de fusão, onde ambos os fragmentos são

amplificados por PCR separadamente, e a após purificação para remoção dos oligonucleotídeos, é realizada uma fase mais longa de extensão sem *primers*. Alternativamente foram otimizados PCR com incubações curtas e longas, onde as incubações longas eram o dobro das incubações do PCR controle, e as incubações curtas com tempo de todas as incubações dobrado, e ciclos da incubação sem *primers* reduzidos para apenas 5 ciclos.

Simultaneamente, como forma de agilizar a clonagem, foi tentada a metodologia de SLIC (JEONG, 2012), onde foram utilizados *primers* contendo regiões idênticas às do plasmídeo, mas nenhuma das reações foi capaz de gerar colônias transformantes. Em vista destes problemas, optamos por seguir com a metodologia de clonagem por digestão e ligação tradicional, onde obtivemos progresso.

Na abordagem por digestão e ligação tradicional foi observado que o vetor suicida final (pNPTS138), não possuía sítios de restrição adequados para permitir a clonagem do pGEM T-easy direto para o pNPTS138, então utilizamos um vetor de clonagem intermediário, o pUCBM21, que possui os sítios HindIII, NcoI, e BamHI na ordem desejada. Inicialmente foram utilizados os fragmentos separados gerados da metodologia do PCR de fusão (Figura 9A), e após *A-tailing* foram clonados no pGEM T-easy (Figura 9B). O segundo fragmento foi purificado, digerido e ligado ao pUCBM21 digerido com as mesmas enzimas (Figura 9C), e com a segunda ligação, do fragmento 1 ao pUCBM21, obteve-se apenas um clone contendo ambos os fragmentos unidos (Figura 9D).



**Figura 9** Eletroforeses da clonagem do fragmento Flag-*dbpA* por digestão e ligação. Foi utilizado o 1kb Plus Dna Ladder (Invitrogen) como padrão molecular em todos os géis, todos os géis apresentados são de 1% de agarose. A: A seta preta superior a direita aponta para a banda correspondente ao fragmento 2 (1183 pb) amplificado por PCR com enzima de alta fidelidade, a seta inferior a direita aponta para o fragmento 1 (842 pb) amplificado por PCR com enzima de alta fidelidade. B: No gel a seta em branco a direita mostra os transformantes de pGEM T-easy e o fragmento 2. A seta em branco a esquerda mostra os transformantes de pGEM T-easy e o fragmento 1. C: A seta preta a direita mostra o transformante de pUCBM21 e o fragmento 2. D: A seta preta a direita mostra o transformante de pUCBM21 com ambos fragmentos ligados (2002 pb).

O clone com o fragmento unido (fragmento 1 e 2) teve seu plasmídeo extraído e digerido com as enzimas de restrição externas, Hind III e Bam HI, e foi ligado ao plasmídeo pNPTS138. Após inserção em *E. coli* DH10 $\beta$ , vários clones mostraram possuir o fragmento completo (Figura 10A), obtendo-se o clone recombinante correto (Figura 10B).



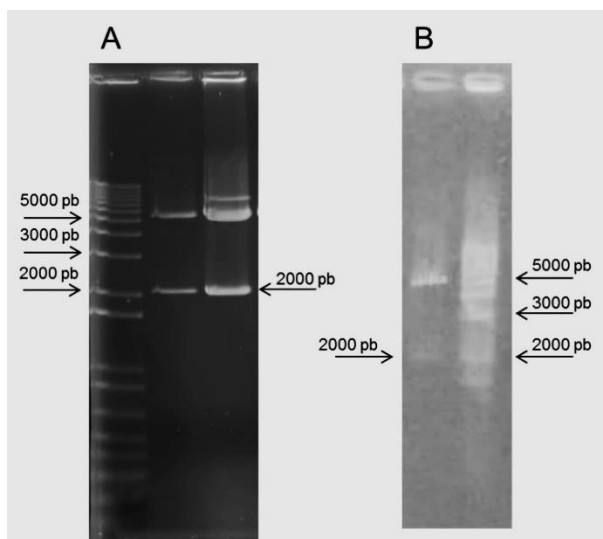


Figura 10 Eletroforese da digestão de pNPTS138 e fragmento completo. Os transformantes que possuem o fragmento correto tem tamanho de 2kb, como mostrado na seta. A: Transformações utilizando-se do método mencionado ao inserir um fragmento após o outro no vetor pUCBM21. B: Transformante obtido a partir de ligação de ambos fragmentos ao vetor pNPTS138. Foi utilizado o 1kb Plus Dna Ladder (Invitrogen) como padrão molecular em todos os géis, de 1% agarose.

O plasmídeo pNPTS com inserto foi utilizado para transformar *E.coli* S17-1 eletrocompetente. Este transformante foi utilizado na conjugação com a linhagem selvagem de *Caulobacter crescentus* NA1000 e após seleção em meio contendo 3% de sacarose os possíveis mutantes foram avaliados por Western blotting (Figura 11). Foi possível observar a banda reconhecida pelo anticorpo em todos os clones avaliados, confirmando a obtenção da proteína DbpA com o tag FLAG no amino-terminal. Após a obtenção da linhagem NA1000 FLAG-DpbA, utilizou-se esta linhagem nos próximos experimentos para avaliar a presença da proteína e sua quantidade em diversas situações.

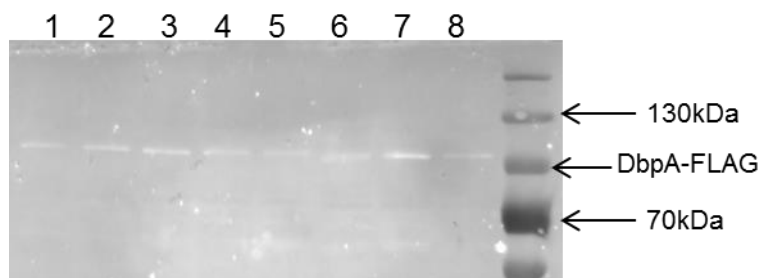
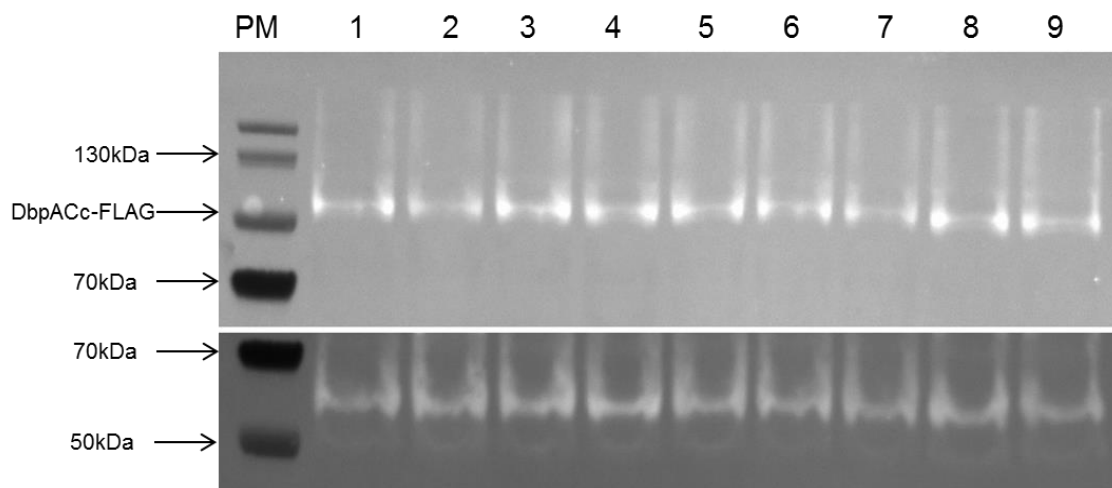


Figura 11 Western Blotting dos clones transformantes de *Caulobacter* mostrando a fusão do epítipo M2-FLAG à proteína DbpA. Extratos totais de proteína foram separados por eletroforese

em SDS-PAGE e após transferência foram revelados com anticorpo anti-FLAG e anticorpo secundário anti-IgG conjugado ao marcador fluorescente ALEXA fluor 488.

Foi escolhido o clone 7 na figura 11 para prosseguir com os ensaios. As proteínas totais das amostras foram ressuspensas em tampão de amostra e sua expressão foi determinada por Western *blotting* utilizando o anticorpo anti-FLAG. De forma a avaliar sua regulação em resposta a estresses foi comparada a quantidade de proteína em vários estresses: estresse osmótico, pH ácido, pH alcalino, estresse oxidativo, fase estacionária e choque-frio (Figura 12). As culturas foram incubadas em todas as condições por 60 min, exceto em fase estacionária, onde se esperou que a cultura cessasse o crescimento e mantivesse a DO constante. Como controle endógeno da quantidade de proteína foi utilizado um antissoro anti-Rho (ITALIANI et al., 2002), pois a proteína Rho não varia entre as condições.



**Figura 12** Expressão de DbpA em diferentes estresses. 1- NaCl 85 mM 2- Sacarose 150 mM 3- Etanol 3,5% 4- pH 5 5- pH8 6- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 5 mM 7-24h 8- DO=0,5 9- 15°C. Todos os estresses foram aplicados por 60 minutos. A exposição da membrana inferior (controle interno da proteína Rho) foi independente da membrana superior, mas ambos os blots derivam do mesmo experimento. Extratos totais de proteína foram separados por eletroforese em SDS-PAGE e após transferência foram revelados com anticorpo anti-FLAG e anticorpo secundário anti-IgG conjugado a Alexa fluor 488.

A expressão normalizada da proteína se mostrou estável dentre os diferentes estresses não apresentando diferenças significativas ( $p < 0,05$  One-Way-Anova) entre as amostras e o controle sem estresses, indicando que apesar de haver descrições (BLATTNER et al., 1997) que DbpA tenha sua expressão modulada em diferentes estresses, isto não se confirma para *C. crescentus*. Interessante, mesmo em fase estacionária a quantidade da proteína na célula se mantém constante mesmo após o desmonte da maquinaria de tradução. Isto sugere que a proteína possa exercer outras funções ainda não descobertas, pois é visto que em *E. coli* não há interação de DbpA com partículas ribossomais após o processamento do 50S (IOST & DREYFUS, 2006).

### **3.3 Estudo da funcionalidade da extremidade carboxi-terminal da proteína DbpA**

A extremidade C-terminal de DbpA de *C. crescentus* possui um domínio DbpA semi-conservado, seguido de uma longa extensão de aminoácidos. Como outras proteínas DbpA não possuem esta extensão, decidimos verificar o papel desta região para a função da proteína. Construímos uma versão da proteína DbpA com a região C-terminal truncada com a remoção dos últimos 204 aminoácidos da proteína (DbpACc537), o que garante apenas a remoção da parte C-terminal não-estruturada de DbpA em relação à sua estrutura secundária modelada por alinhamentos entre ortólogos de proteobactérias. Também construímos uma nova versão da proteína DbpA com a remoção dos últimos 266 aminoácidos da proteína (DbpACc475) (Figura 13), o que garante a remoção completa do domínio DbpA no que se refere à sua super-estrutura secundária.

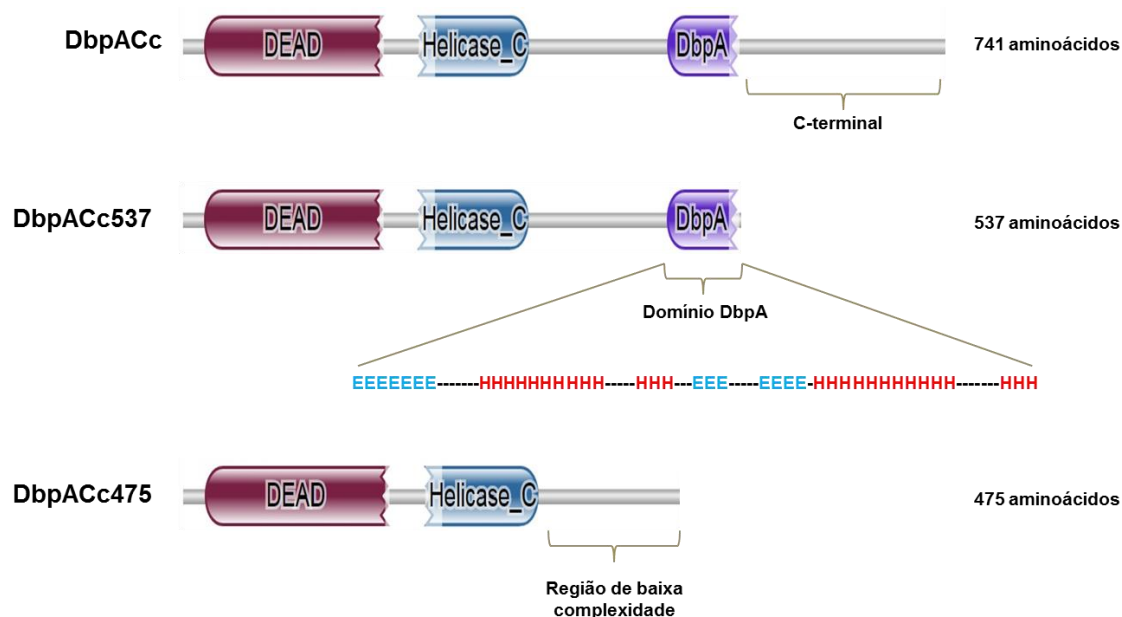


Figura 13 Arquitetura de domínios de DbpA. DbpACc é a proteína íntegra. DbpACc537 é uma construção removendo-se apenas a parte não estruturada do C-Terminal. DbpACc475 é a proteína contendo apenas os domínios DEAD e de Helicase\_C-terminal. H significa alfa-hélice e E significa fita-beta na estrutura secundária destacada. Estrutura modelada com Quick2D e PSIPRED (Zimmerman et al., 2018; Jones et al., 1999).

Os genes para estas proteínas truncadas foram clonados no vetor de expressão pBV-MCS4, cuja expressão controlada é coordenada por um promotor responsivo a vanilato (THANBICHLER *et al.*, 2007). Analisamos a importância destas regiões por análise de complementação do fenótipo de sensibilidade ao frio do mutante  $\Delta dbpA$  (AGUIRRE, 2017). Isto permite inferir a atividade da helicase sem o domínio terminal e possivelmente sem a especificidade por RNAs ribossomais, devido à perda da região RRM. Os ensaios de crescimento foram conduzidos em 15°C e 30°C em meios suplementados com 500  $\mu$ M de vanilato. Com relação aos ensaios de complementação, a linhagem  $\Delta dbpA$  complementada com a proteína íntegra teve fenótipo de crescimento esperado, similar ao da linhagem selvagem NA1000 pBV  $\emptyset$  (contendo o pBV-MCS4 sem inserto). Já a linhagem  $\Delta dbpA$  complementada com a proteína truncada após o domínio DbpA (DbpACc537) mostrou crescimento similar ao da selvagem, indicando que a cauda carboxi-

terminal talvez tenha papel de reconhecimento, mas não é indispensável. Isto também foi observado em proteínas SrmB, cuja extensão carboxi-terminal não influencia no reconhecimento nem na função da proteína (CHAROLLAIS *et al.*, 2003).

A construção DbpACc475 foi obtida com inserção do epitopo FLAG, a fim de permitir estudos futuros com interações ribossomais. Nesta construção foi removido completamente o domínio DbpA, introduzindo um códon de parada UAA com o primer 1478-STOP-dbpA. A sequência foi confirmada por sequenciamento, e inserida no vetor pBV-MCS4 para avaliar sua expressão em *C. crescentus*. A perda da região codificadora para o domínio DbpA na helicase DbpA impediu que a proteína atuasse de forma correta, onde pode-se observar que DbpACc475 tem crescimento a 15°C similar ao mutante ( $p < 0,05$ , One-Way ANOVA), sendo que somente esta construção e o mutante nulo apresentaram crescimento inferior aos demais (Figura 14). É importante destacar que em trabalhos anteriores mostrou-se que a complementação desta deficiência com parálogos da mesma família (RhIE) mostrou-se viável, mesmo estas proteínas não apresentando o domínio DbpA (AGUIRRE, 2017).

O domínio DbpA em *Bacillus* tem papel no reconhecimento fino da subunidade 23S na montagem do ribossomo, garantido pela parte C-terminal da proteína (HARDIN *et al.*, 2010). Em *Geobacillus stearothermophilus* a carga da cauda terminal varia com o número de resíduos de Arginina e há uma quantidade mínima para o reconhecimento adequado dos RNAs ribossomais, e tais resíduos podem ancorar a proteína ao substrato (MALLAM *et al.*, 2011; GROHMAN *et al.*, 2007; HUEN *et al.*, 2017). Em *C. crescentus* a região C-terminal rica em lisinas, argininas e prolinas se mostrou importante para a função da proteína, dado que houve perda de função quando o domínio DbpA completo foi removido, porém não houve perda significativa quando apenas a extensão C-terminal foi removida. Uma perspectiva futura será verificar se as proteínas truncadas ainda mantêm sua interação com as partículas ribossomais.

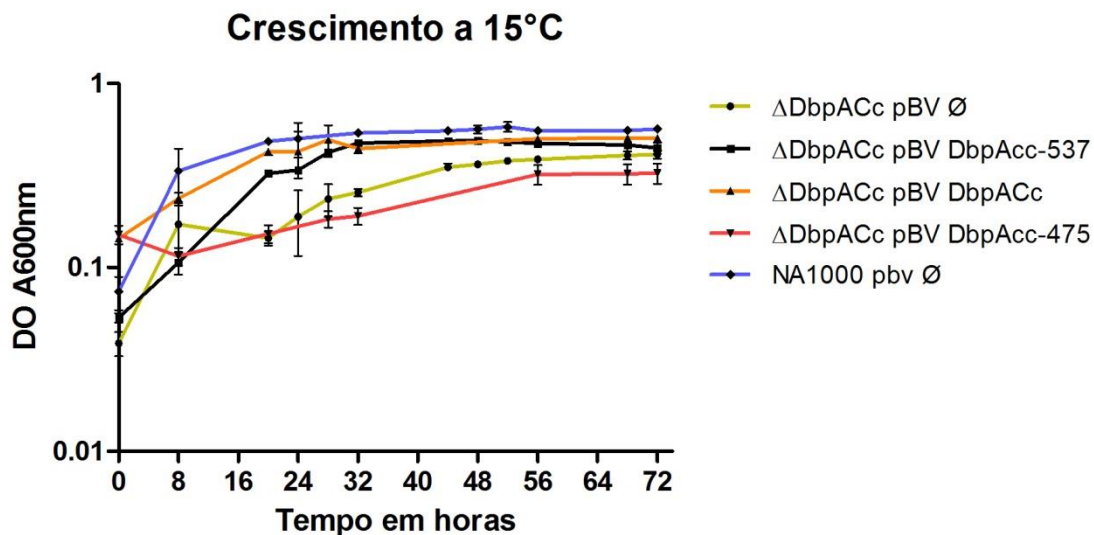


Figura 14. Ensaio de crescimento a 15°C. Ensaio de complementação do fenótipo de sensibilidade ao choque-frio do mutante deletado de DbpACc ( $\Delta dbpA$ ). Apenas as curvas do mutante deletado  $\Delta dbpA$  e do mutante complementado do DbpACc475 se mostraram significativamente diferente das demais. ANOVA ( $p < 0.05$ ).

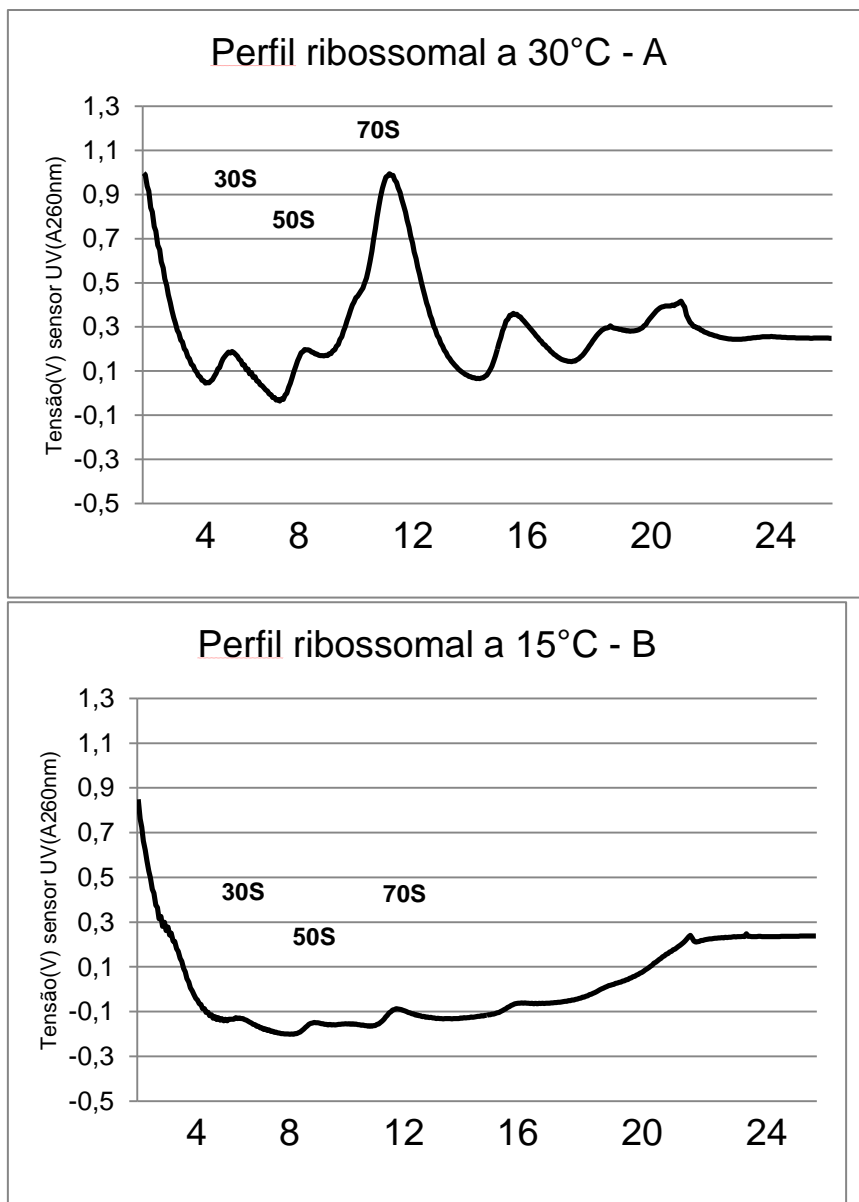
### 3.4 Análise da presença de DbpA em frações ribossomais

A análise da interação entre a proteína DbpA e as frações ribossomais foi realizada por separação dos ribossomos utilizando gradientes de sacarose 15%-45% em múltiplas tentativas, e notou-se que ao incrementar os ciclos de congelamento e descongelamento havia um ganho na  $DO_{600nm}$  final da amostra. Após refinamento do protocolo, foram analisadas amostras submetidas a 4 horas de choque-frio a 15°C, e amostras que apresentaram  $DO_{600nm}=0,5$  em temperatura ótima de crescimento 30°C. As frações foram separadas por tempo de coleta, e a absorbância foi medida no sensor de UV acoplado ao fracionador, na mesma sensibilidade adotada em todas as corridas. As amostras que cresceram em 30°C foram capazes de produzir bons gradientes de sacarose após centrifugação, com RNA detectável ( $A_{260nm}$ ) mostrando as frações do ribossomo, enquanto que as amostras a 15°C não mostraram picos evidentes (Figura 15). Este fato pode ser um reflexo da parada de crescimento causada pela baixa temperatura, onde os ribossomos

são desmobilizados e reciclados, e portanto o conteúdo de ribossomos por célula é bem menor. Observou-se que a fração 5 (Figura 15A) delimitava o fim da porção solúvel do gradiente, e a fração 6 o começo das subunidades do ribossomo, assim foi escolhido utilizar da fração 6 até a fração 13 para avaliar a presença de proteína DbpA.

Como se pode observar na figura 16, a proteína se mostra presente em pequena quantidade em todas as frações analisadas. Na última canaleta foi adicionado o extrato total de uma cultura como controle positivo da presença da proteína no método. A quantificação por imagem (ImageJ) não foi capaz de mostrar diferenças significativas entre as amostras ( $p < 0,05$ , por teste t de Student) (HAZEWINKELE, 2001), exceto em relação ao controle positivo. Pela sua distribuição, podemos inferir que DbpA de *C. crescentus* seja atuante em várias fases de maturação das partículas ribossomais. Inicialmente houve a possibilidade da proteína estudada neste trabalho ser um ortólogo de SrmB, devido à sua anotação nos bancos de dados, porém as evidências experimentais mostram que não há prevalência da proteína na fração correspondente à partícula 23S, na qual SrmB tem maior atuação (TRUBETSKOY et al., 2009).

A via de biogênese ribossomal em bactérias se mostra muito redundante, dado muitas bactérias possuem diversos parálogos de helicases de RNA DEAD-box, como RhIE e SrmB, e SrmB e CsdA que podem se complementar em função (CHAROLLAIS et al., 2004; JAIN, 2008), apesar de RhIE não complementar completamente a função de SrmB em *E. coli*. Em *E. coli* DbpA atua na maturação do precursor do 50S, desenovelando o grampo 92 do 23S, assim permitindo a montagem de ribossomos funcionais (DIGES & UHLENBECK, 2001). Há evidências de que mesmo em *E. coli* DbpA não seja essencial, dado que outras proteínas, como SrmB, podem suprir a falta de DbpA, e ainda assim manter a biogênese ribossomal (ELLES et al., 2009).



**Figura 15** Perfil ribossomal da linhagem NA1000 FLAG-DbpA a 30 °C e a 15°C. A- Perfil ribossomal obtido da leitura discreta das frações de 0,5 mL, das amostras a 30°C. B- Perfil ribossomal obtido da leitura contínua do fracionamento por monitor de UV a 15°C.



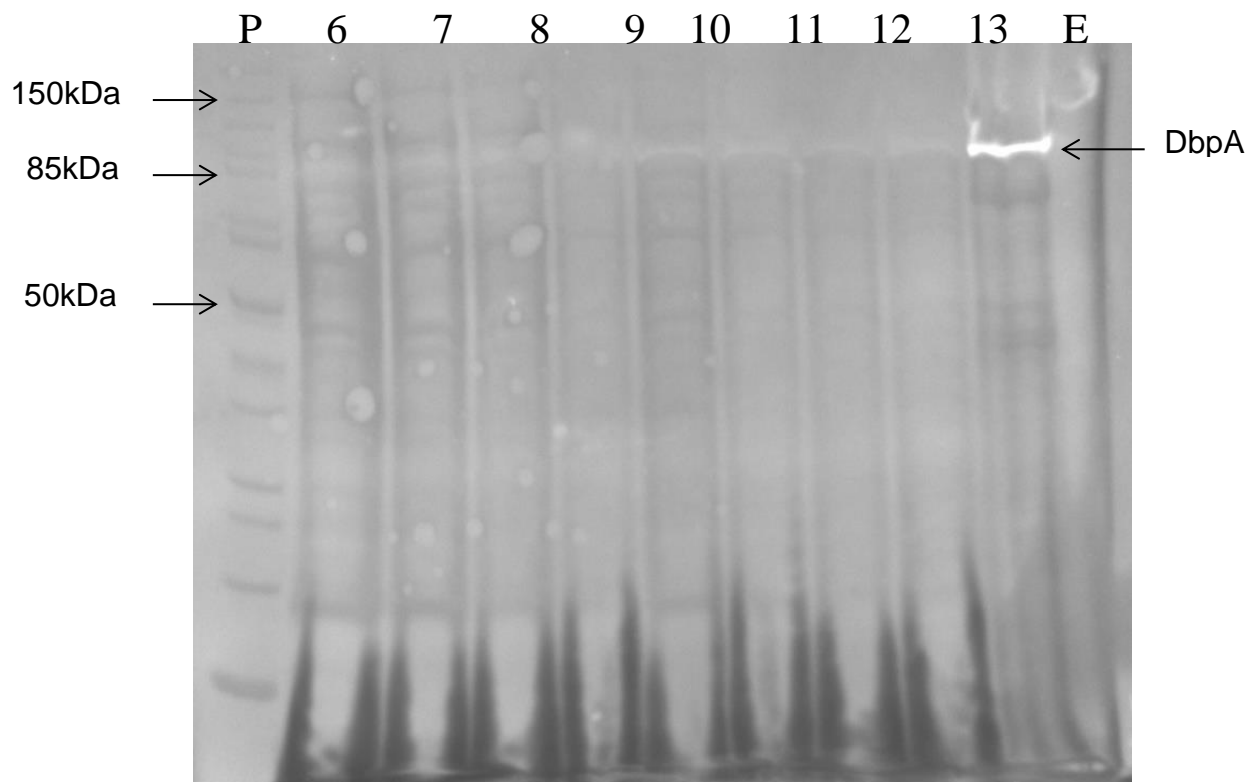


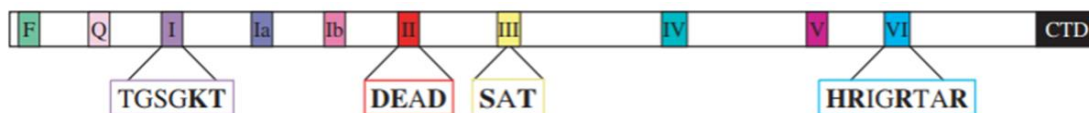
Figura 16. Western blotting das frações do perfil ribossomal. O blot foi incubado com anticorpo anti-FLAG e revelado com anticorpo anti-IgG conjugado a Alexa fluor 488. P- padrão molecular PageRuler Unstained. 6 a 13- Frações do perfil ribossomal. E- Extrato proteico, usado como controle positivo.

### 3.5 Análise Filogenética

Com intuito de avaliar a importância do domínio DbpA e sua diversidade de extensões C-terminais, foi proposta uma análise filogenética que fosse capaz de contextualizar a evolução da família em espécies próximas de *C. crescentus* e complementar o que está disponível na literatura (LÓPEZ-RAMÍREZ *et al.*, 2011). Apesar das dificuldades enfrentadas na adequação do modelo ideal a ser utilizado para analisar, foi escolhido proceder com a análise de forma consoante às metodologias utilizadas recentemente, onde os programas propostos inicialmente no projeto foram substituídos por outros que seriam mais eficientes e mais acurados na sua proposta.

Os dados analisados foram avaliados conforme características observadas na região específica de DbpA para a sua especificidade de ligação,

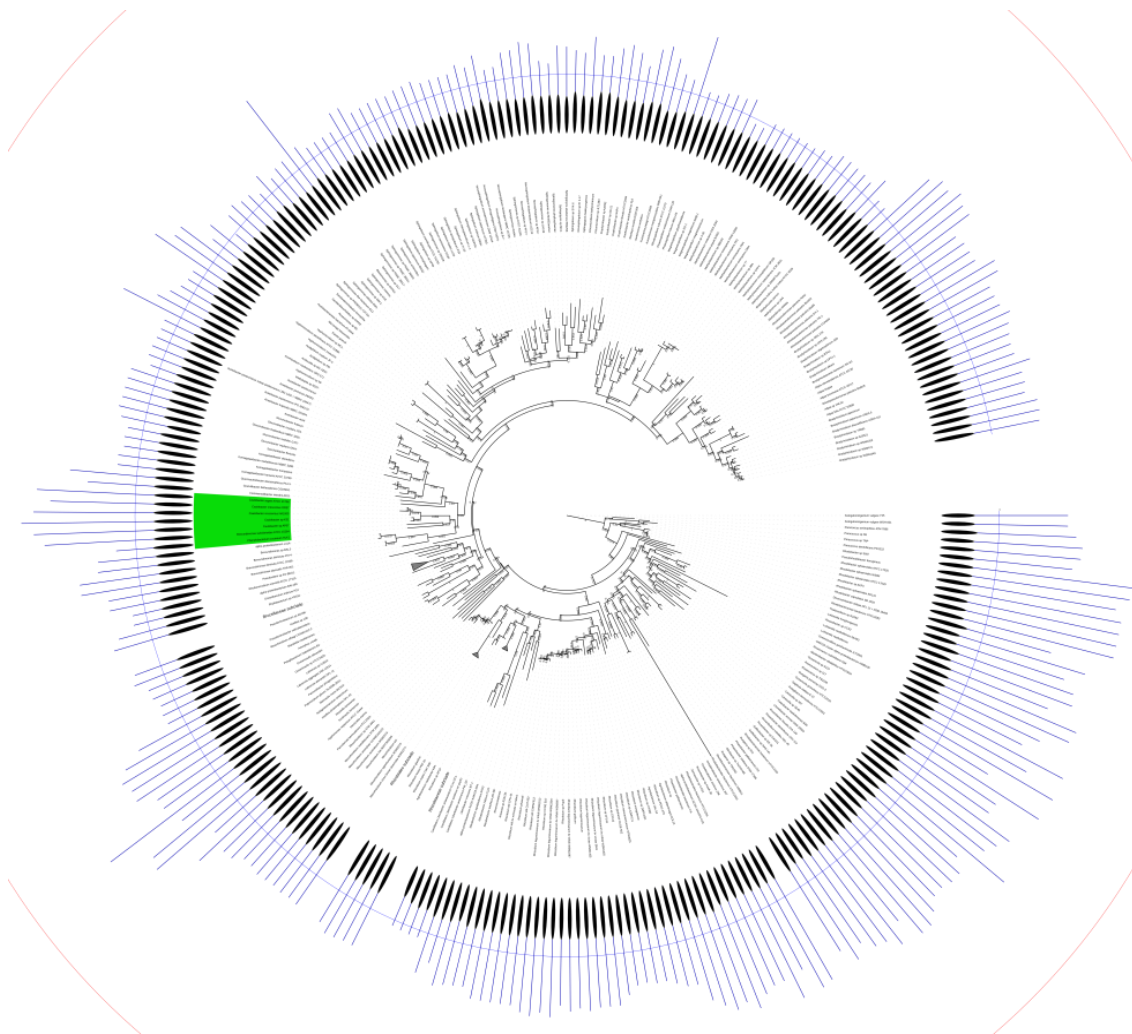
assim mantendo o domínio DbpA e sua extensão, como forma de reduzir ruídos gerados por buscas de regiões extremamente conservadas, como no caso o domínio de RNA helicase, como os motivos da figura 17.



**Figura 17. Motivos conservados presentes em proteínas da família de DbpA. No estudo foi considerado no alinhamento após o motivo VI.**

As topologias geradas pela análise do domínio DbpA e região C-terminal predominantemente básica consistem em 344 terminais de alfa-proteobactérias, alinhadas em algoritmo global iterativo (MAFFT) com 1000 iterações, e as árvores foram geradas por máxima verossimilhança no programa PhyML (Figura 18). A árvore foi gerada no visualizador iTOL (LETUNIC & BORK 2016). Uma versão interativa e de maior resolução pode ser acessada no link: [https://itol.embl.de/shared\\_projects.cgi](https://itol.embl.de/shared_projects.cgi) e digitando o meu usuário: rodolfoar.

Em vista da diversidade de extensões carboxi-terminais observadas na topologia gerada pela análise filogenética, pode-se observar que na família em que *C. crescentus* está contida há um comprimento singular em relação às espécies vizinhas, mais próximo do que seriam as esperadas para espécies mais basais dentro do grupo de alfa-proteobactérias (Figura 18). Tal comprimento deve-se à maior parte de resíduos não conservados no alinhamento; diferindo dos aminoácidos que se conhece função nesta estrutura, que são majoritariamente os resíduos de Lisina e Arginina.



**Figura 18** Árvore filogenética dos domínios DbpA na linhagem das alfa-proteobactérias. Destaque em verde para a família das *Caulobacteraceae*. Acima dos nomes dos terminais existe uma caixa preta que delimita o domínio DbpA para cada espécie analisada, e as linhas em azul representam as extremidades C-terminal das proteínas analisadas.

A análise do alinhamento da extensão C-terminal em alfa-proteobactérias permitiu a identificação de resíduos conservados como mostrado no WebLogo gerado (Figura 19). A conservação dos resíduos de aminoácidos presentes na região carboxi-terminal pode ser observada no WebLogo gerado a partir do alinhamento anterior, onde nota-se a presença de resíduos carregados positivamente, além de prolina em grande quantidade. Outras proteínas dentro do mesmo clã, como é caso da proteína Hera de *T. thermophilus*, a cauda C-terminal confere mobilidade à molécula, e contribui para sua estabilização espacial na formação de dímeros (KLOSTERMEIER et al., 2008). Em CYT-19, que é uma DEAD-box RNA helicase de mitocôndrias,

foi mostrado que há um limiar de reconhecimento entre os resíduos de arginina na cauda C-terminal e o substrato de RNA a ser reconhecido, onde apenas a carga seria o limitante do processo, dado que lisina também pode ser utilizada no reconhecimento (BUSA et al., 2017) (Figura 20).

Realizamos buscas iterativas da região C-terminal contra o banco de dados não redundante do NCBI (*National Center for National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine*) com seguidas clusterizações com coeficiente de similaridade de 35%. Observamos que a região C-terminal posterior ao domínio DbpA se manteve como hipervariável em nossas análises, mas conseguimos obter uma clusterização gerando cinco grupos distintos predominantes (Figura 21).

A análise do domínio em relação à sua família mostrou que apesar de ser altamente conservado em sua estrutura e sequência, existem divergências em fusões podendo haver duplicações. No caso de alfa-proteobactérias, há parte do grupo que compartilha a mesma arquitetura que as gama-proteobactérias, o que sugere que tenha ocorrido transferência lateral de genes nestas espécies, a ser confirmado por reconstrução do caráter ancestral, já que as gama-proteobactérias são observadas também em outros ramos da filogenia, sendo estas mais próximas das actinobactérias e firmicutes. Como proposto por LOPÉZ-RAMIRÉZ em 2011, isso ocorreu devido à separação entre os ramos que possuem a região de reconhecimento de RNA bem definido e as que podem ter perdido esta região. Firmicutes também possuem as duas classes de DbpA, onde um grupo mantém a região de reconhecimento de RNA, e outro grupo distante a perdeu (Figura 21). As duplicações presentes em um ramo de alfa-proteobactérias aparentam ter ocorrido independentemente, tal como em beta-proteobactérias (LOPÉZ-RAMIRÉZ et al., 2011). Uma análise de motivos entre os grupos observados está em andamento para avaliar se houve coevolução do C-terminal e do domínio de DbpA propriamente dito, e assim poder definir possíveis funções para os resíduos.

A análise filogenética mostrou que o grupo de alfa-proteobactérias possui extensões variáveis no comprimento da cauda C-terminal de DbpA, que se mostra basal em Bacteria. Infere-se que a família tenha papel essencial na adaptação a diversos estresses, em vários ramos da filogenia, tal como suas fusões e perdas de domínios são acompanhados de diversos parálogos que possam complementar suas funções, e assim munir os organismos de uma versatilidade às condições do meio. O acúmulo de mutações neutras ou não no C-terminal poderia justificar sua sequência hipervariável, gerando variantes adaptadas a exercer diferentes papéis celulares.

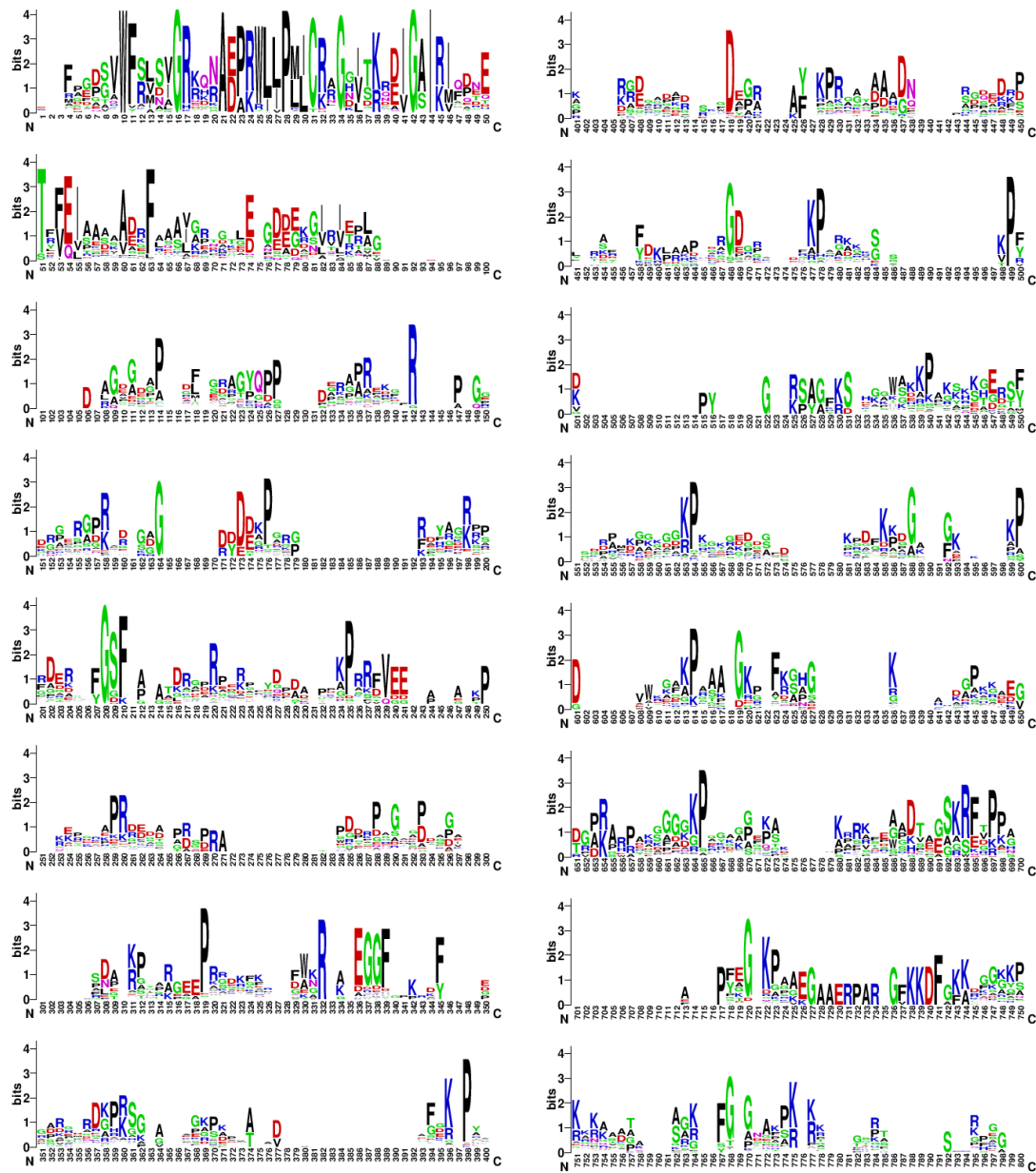


Figura 19. Weblogo gerado a partir do alinhamento das seqüências obtidas de alfa-proteobactéria, considerando apenas a região C-terminal destas proteínas, onde observa-se o domínio DbpA conservado nas duas primeiras linhas seguido das assinaturas da cauda C-terminal, onde nota-se grande conservação de resíduos de prolina e lisina, além de argininas.

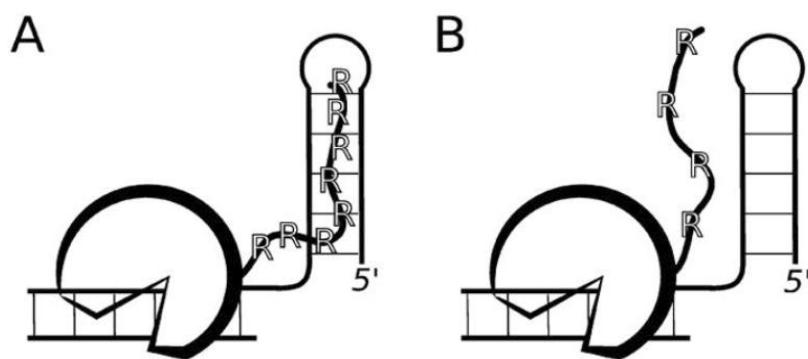


Figura 20 Modelo de limiar de ação da cauda de DbpA segundo Busa et al., 2017. A – A proteína possui seus resíduos carregados completos e consegue interagir com a estrutura secundária. B – Ao remover parte dos resíduos há perda de função da proteína.

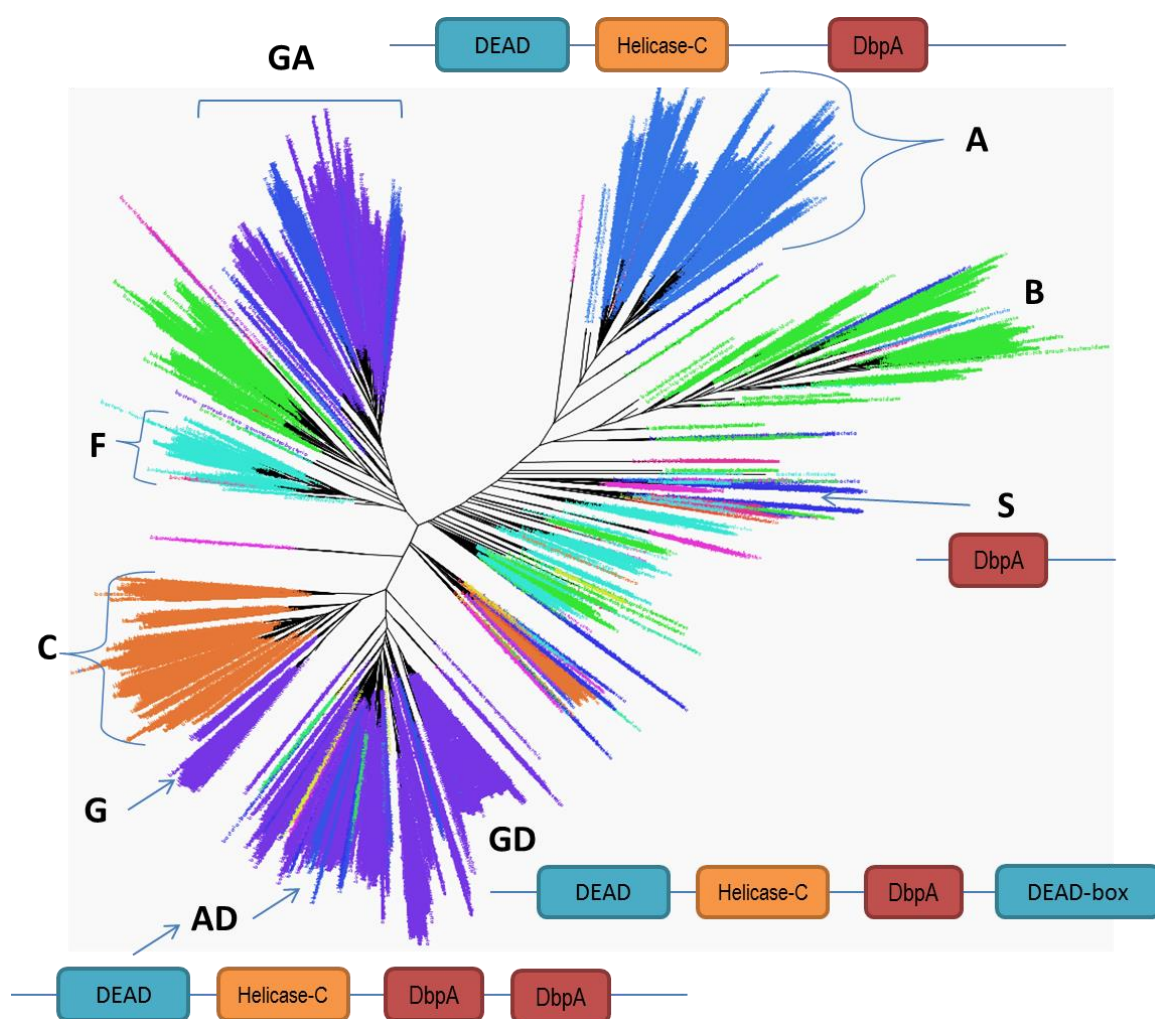


Figura 21 Árvore filogenética do domínio de DbpA em Bactéria. A – Em azul, alfa-proteobactérias, com a arquitetura de domínios mais predominantes (+95%) DEAD+Helicase-C+DbpA. B – Em verde, bacteriodesetes, apresenta mesma arquitetura que alfa-proteobactérias. G – Em roxo, gama-proteobactérias com mesma arquitetura predominante. GA – grupo de alfa-proteobactérias e gama-proteobactérias com mesma arquitetura e similares em sequência. C – Em laranja, actinobactérias, com a mesma arquitetura predominante. F – Em celeste firmicutes, com a mesma arquitetura predominante. AD – Grupo de alfa-proteobactérias com duplicação do domínio DbpA no C-terminal da proteína. GD – Grupo de gama-proteobactérias com duplicação da região DEAD-box no C-terminal. S – Grupo de espiroquetas, contendo apenas um domínio DbpA na proteína, sem a presença de DEAD e helicase.

## 4 Conclusões

Foi construída uma linhagem que expressa a RNA helicase codificada pelo gene *dpbA* (CC1478) em fusão com um epitopo M2-FLAG, que foi utilizada para identificação da proteína por métodos imunológicos, permitindo a análise de expressão em condição de estresse frio e ensaios de interação com o ribossomo.

O padrão de expressão do gene *dpbA* em resposta a estresses foi analisado, mostrando que o transcrito provavelmente aumenta em baixa temperatura e estresse salino, e cai em fase estacionária. Porém ainda não foi possível determinar os mecanismos de sua regulação.

Foi demonstrada a presença de DbpA associada a frações ribossomais, sugerindo que a proteína possa atuar na montagem do ribossomo.

A região C-terminal rica em lisinas, argininas e prolinas se mostrou importante para a função da proteína, dado que houve perda de função quando o domínio DbpA completo foi removido, porém não houve perda significativa com a perda da extensão C-terminal sem o domínio DbpA.

A análise filogenética mostrou que o grupo de alfa-proteobactérias possui extensões variáveis no comprimento da cauda C-terminal de DbpA, porém o compartilham desde o último ancestral comum de Bacteria. Observamos que a região C-terminal posterior ao domínio DbpA se manteve como hipervariável em nossas análises, mas conseguimos obter um agrupamento gerando cinco grupos distintos de arquiteturas.



## 5. Referências Bibliográficas

- Ando Y, Nakamura K. Bacillus subtilis DEAD protein YdbR possesses ATPase, RNA binding, and RNA unwinding activities. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 2006 Jul 23;70(7):1606-15.
- Aguirre, A.A., Marques, M.V. Caracterização Fenotípica de linhagens mutantes das RNA helicases DEAD-box de *Caulobacter crescentus* em condições de baixa temperatura. Universidade de São Paulo. 2017.
- Aguirre AA, Vicente AM, Hardwick SW, Alvelos DM, Mazzon RR, Luisi BF, Marques MV. Association of the cold-shock DEAD-box RNA helicase RhIE to the RNA degradosome in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*. 2017 Apr 10;JB-00135.
- Awano N, Rajagopal V, Arbing M, Patel S, Hunt J, Inouye M, Phadtare S. Escherichia coli RNase R has dual activities, helicase and RNase. *Journal of Bacteriology*. 2010 Mar 1;192(5):1344-52.
- Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J. The complete genome sequence of Escherichia coli K-12. *Science*. 1997 Sep 5;277(5331):1453-62.
- Boutte CC, Crosson S. The complex logic of stringent response regulation in *Caulobacter crescentus*: starvation signalling in an oligotrophic environment. *Molecular Microbiology*. 2011 May;80(3):695-714.
- Busa VF, Rector MJ, Russell R. The DEAD-box protein CYT-19 uses arginine residues in its C-tail to tether RNA substrates. *Biochemistry*. 2017 Jul 7;56(28):3571-8.
- Cazorla D, Feliu JX, Villaverde A. Variable specific activity of Escherichia coli  $\beta$ -galactosidase in bacterial cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 2001 Feb 5;72(3):255-60.
- Charollais J, Pflieger D, Vinh J, Dreyfus M, Iost I. The DEAD-box RNA helicase SrmB is involved in the assembly of 50S ribosomal subunits in Escherichia coli. *Molecular Microbiology*. 2003 Jun;48(5):1253-65.
- Charollais J, Dreyfus M, Iost I. CsdA, a cold-shock RNA helicase from Escherichia coli, is involved in the biogenesis of 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Research*. 2004 May 1;32(9):2751-9.
- Cordin O, Banroques J, Tanner NK, Linder P. The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*. 2006 Feb 15;367:17-37.
- Curtis PD, Brun YV. Getting in the loop: regulation of development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2010 Mar 1;74(1):13-41.
- Diges CM, Uhlenbeck OC. Escherichia coli DbpA is an RNA helicase that requires hairpin 92 of 23S rRNA. *The EMBO Journal*. 2001 Oct 1;20(19):5503-12.
- Elles LMS, Uhlenbeck OC. Mutation of the arginine finger in the active site of Escherichia coli DbpA abolishes ATPase and helicase activity and confers a dominant slow growth phenotype. *Nucleic Acids Research*. 2007 Nov 5;36(1):41-50.
- Elles LMS, Sykes MT, Williamson JR, Uhlenbeck OC. A dominant negative mutant of the E. coli RNA helicase DbpA blocks assembly of the 50S ribosomal subunit. *Nucleic Acids Research*. 2009 Sep 4;37(19):6503-14.
- Evinger MA, Agabian N. Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *Journal of Bacteriology*. 1977 Oct 1;132(1):294-301.

Finn RD, Clements J, Arndt W, Miller BL, Wheeler TJ, Schreiber F, Bateman A, Eddy SR. HMMER web server: 2015 update. *Nucleic Acids Research*. 2015 May 5;43(W1):W30-8.

Fuller-Pace FV, Nicol SM, Reid AD, Lane DP. DbpA: a DEAD box protein specifically activated by 23s rRNA. *The EMBO Journal*. 1993 Sep;12(9):3619-26.

Fuller-Pace FV. The DEAD box proteins DDX5 (p68) and DDX17 (p72): multi-tasking transcriptional regulators. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2013 Aug 31;1829(8):756-63.

Garau, G., Job, V., Dideberg, O. Cell division protein ylmH from *Streptococcus pneumoniae*. *Texto não publicado*.

Gober JW, Shapiro L. A developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3'enhancer and IHF binding elements. *Molecular Biology of The Cell*. 1992 Aug;3(8):913-26.

Gober JW, Marques MV. Regulation of cellular differentiation in *Caulobacter crescentus*. *Microbiological Reviews*. 1995 Mar 1;59(1):31-47.

Gora KG, Tsokos CG, Chen YE, Srinivasan BS, Perchuk BS, Laub MT. A cell-type-specific protein-protein interaction modulates transcriptional activity of a master regulator in *Caulobacter crescentus*. *Molecular Cell*. 2010 Aug 13;39(3):455-67.

Grohman JK, Del Campo M, Bhaskaran H, Tijerina P, Lambowitz AM, Russell R. Probing the mechanisms of DEAD-box proteins as general RNA chaperones: the C-terminal domain of CYT-19 mediates general recognition of RNA. *Biochemistry*. 2007 Mar 20;46(11):3013-22.

Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*. 2010 May 1;59(3):307-21.

Hardin JW, Hu YX, McKay DB. Structure of the RNA binding domain of a DEAD-box helicase bound to its ribosomal RNA target reveals a novel mode of recognition by an RNA recognition motif. *Journal of Molecular Biology*. 2010 Sep 17;402(2):412-27.

Hardwick SW, Luisi BF. Rarely at rest: RNA helicases and their busy contributions to RNA degradation, regulation and quality control. *RNA Biology*. 2013 Jan 1;10(1):56-70.

Hunger K, Beckering CL, Wiegeshoff F, Graumann PL, Marahiel MA. Cold-induced putative DEAD box RNA helicases CshA and CshB are essential for cold adaptation and interact with cold shock protein B in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*. 2006 Jan 1;188(1):240-8.

Hauser M, Steinegger M, Söding J. MMseqs software suite for fast and deep clustering and searching of large protein sequence sets. *Bioinformatics*. 2016 Jan 6;32(9):1323-30.

Hazewinkel, Michiel, "Student test", *Encyclopedia of Mathematics, Springer, ISBN 978-1-55608-010-4.ed. 2001*.

Hylton J, Manheimer K, Drake FL, Masse R, van Rossum G. Knowbot programming: System support for mobile agents. In *Object-Orientation in Operating Systems, 1996.*, Proceedings of the Fifth International Workshop on 1996 Oct 27 (pp. 8-13). IEEE.

Huen J, Lin CL, Golzarroshan B, Yi WL, Yang WZ, Yuan HS. Structural insights into a unique dimeric DEAD-box helicase CshA that promotes RNA decay. *Structure*. 2017 Mar 7;25(3):469-81.

Iost I, Dreyfus M. DEAD-box RNA helicases in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research*. 2006 Aug 25;34(15):4189-97.

Iost I, Bizebard T, Dreyfus M. Functions of DEAD-box proteins in bacteria: current knowledge and pending questions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*. 2013 Aug 31;1829(8):866-77.

- Italiani VC, Zuleta LF, Marques MV. The transcription termination factor Rho is required for oxidative stress survival in *Caulobacter crescentus*. *Molecular Microbiology*. 2002 Apr;44(1):181-94.
- Jain C. The *E. coli* RhlE RNA helicase regulates the function of related RNA helicases during ribosome assembly. *RNA*. 2008 Feb 1;14(2):381-9.
- Jankowsky E, Fairman ME. RNA helicases—one fold for many functions. *Current Opinion in Structural Biology*. 2007 Jun 1;17(3):316-24.
- Jarmoskaite I, Russell R. RNA helicase proteins as chaperones and remodelers. *Annual Review of Biochemistry*. 2014 Jun 2;83:697-725.
- Jensen RB. Coordination between chromosome replication, segregation, and cell division in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*. 2006 Mar 15;188(6):2244-53.
- Jeong JY, Yim HS, Ryu JY, Lee HS, Lee JH, Seen DS, Kang SG. One-step sequence-and ligation-independent cloning (SLIC): rapid and versatile cloning method for functional genomics studies. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012 May 18:AEM-00844.
- Jiang W, Fang L, Inouye M. The role of the 5'-end untranslated region of the mRNA for CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, in cold-shock adaptation. *Journal of Bacteriology*. 1996 Aug 1;178(16):4919-25.
- Jones DT. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices1. *Journal of Molecular Biology*. 1999 Sep 17;292(2):195-202.
- Jones PG, VanBogelen RA, Neidhardt FC. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1987 May 1;169(5):2092-5.
- Karpel RL, Swistel DG, Miller NS, Geroch ME, Lu C, Fresco JR. Acceleration of RNA renaturation by nucleic acid unwinding proteins. In *Brookhaven Symposia in Biology* 1975 Jul (No. 26, pp. 165-174).
- Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution*. 2013 Jan 16;30(4):772-80.
- Kelley LA, Mezulis S, Yates CM, Wass MN, Sternberg MJ. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nature Protocols*. 2015 Jun;10(6):845.
- Khemici V, Toesca I, Poljak L, Vanzo NF, Carpousis AJ. The RNase E of *Escherichia coli* has at least two binding sites for DEAD-box RNA helicases: Functional replacement of RhlB by RhlE. *Molecular Microbiology*. 2004 Dec;54(5):1422-30.
- Kistler AL, Guthrie C. Deletion of MUD2, the yeast homolog of U2AF65, can bypass the requirement for sub2, an essential spliceosomal ATPase. *Genes & Development*. 2001 Jan 1;15(1):42-9.
- Kossen K, Uhlenbeck OC. Cloning and biochemical characterization of *Bacillus subtilis* YxiN, a DEAD protein specifically activated by 23S rRNA: delineation of a novel sub-family of bacterial DEAD proteins. *Nucleic Acids Research*. 1999 Oct 1;27(19):3811-20.
- Klostermeier D, Rudolph MG. A novel dimerization motif in the C-terminal domain of the *Thermus thermophilus* DEAD box helicase Hera confers substantial flexibility. *Nucleic Acids Research*. 2008 Dec 2;37(2):421-30.
- Laub MT, Chen SL, Shapiro L, McAdams HH. Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002 Apr 2;99(7):4632-7.

Letunic I, Bork P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic acids research*. 2016 Apr 19;44(W1):W242-5.

Linder P, Jankowsky E. From unwinding to clamping—the DEAD box RNA helicase family. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2011 Aug;12(8):505.

López-Ramírez V, Alcaraz LD, Moreno-Hagelsieb G, Olmedo-Alvarez G. Phylogenetic distribution and evolutionary history of bacterial DEAD-Box proteins. *Journal of Molecular Evolution*. 2011 Apr 1;72(4):413.

Mallam AL, Jarmoskaite I, Tijerina P, Del Campo M, Seifert S, Guo L, Russell R, Lambowitz AM. Solution structures of DEAD-box RNA chaperones reveal conformational changes and nucleic acid tethering by a basic tail. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2011 Jul 26;108(30):12254-9.

Mazon RR, Lang EA, Braz VS, Marques MV. Characterization of *Caulobacter crescentus* response to low temperature and identification of genes involved in freezing resistance. *FEMS Microbiology Letters*. 2008 Oct 13;288(2):178-85.

Miller, J. H. *Experiments in molecular genetics*. New York Cold Spring Harbor Laboratories Press 352-355.1972.

Miller Jr RG. *Beyond ANOVA: basics of applied statistics*. Chapman and Hall/CRC; 1997 Jan 1.

Mitta M, Fang L, Inouye M. Deletion analysis of *cspA* of *Escherichia coli*: requirement of the AT-rich UP element for *cspA* transcription and the downstream box in the coding region for its cold shock induction. *Molecular Microbiology*. 1997 Oct;26(2):321-35.

Moll I, Grill S, Gründling A, Bläsi U. Effects of ribosomal proteins S1, S2 and the DeaD/CsdA DEAD-box helicase on translation of leaderless and canonical mRNAs in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 2002 Jun;44(5):1387-96.

Owtrim GW. RNA helicases: diverse roles in prokaryotic response to abiotic stress. *RNA Biology*. 2013 Jan 1;10(1):96-110.

Phadtare S, Alsina J, Inouye M. Cold-shock response and cold-shock proteins. *Current Opinion in Microbiology*. 1999 Apr 1;2(2):175-80.

Phadtare S, Inouye M. Sequence-selective interactions with RNA by CspB, CspC and CspE, members of the CspA family of *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 1999 Sep;33(5):1004-14.

Phadtare S. Unwinding activity of cold shock proteins and RNA metabolism. *RNA Biology*. 2011 May 1;8(3):394-7.

Prud'homme-Généreux A, Beran RK, Iost I, Ramey CS, Mackie GA, Simons RW. Physical and functional interactions among RNase E, polynucleotide phosphorylase and the cold-shock protein, CsdA: evidence for a 'cold shock degradosome'. *Molecular Microbiology*. 2004 Dec;54(5):1409-21.

Proux F, Dreyfus M, Iost I. Identification of the sites of action of SrmB, a DEAD-box RNA helicase involved in *Escherichia coli* ribosome assembly. *Molecular Microbiology*. 2011 Oct;82(2):300-11.

Py B, Higgins CF, Krisch HM, Carpousis AJ. A DEAD-box RNA helicase in the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Nature*. 1996 May;381(6578):169

Quon KC, Yang B, Domian IJ, Shapiro L, Marczyński GT. Negative control of bacterial DNA replication by a cell cycle regulatory protein that binds at the chromosome origin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998 Jan 6;95(1):120-5.

Raghunathan PL, Guthrie C. RNA unwinding in U4/U6 snRNPs requires ATP hydrolysis and the DEIH-box splicing factor Brr2. *Current Biology*. 1998 Jul 16;8(15):847-55.

- Reisenauer A, Quon K, Shapiro L (1999) The CtrA response regulator mediates temporal control of gene expression during the *Caulobacter* cell cycle. *J Bacteriol* 181: 2430–2439
- Reisinger SJ, Huntwork S, Viollier PH, Ryan KR. DivL performs critical cell cycle functions in *Caulobacter crescentus* independent of kinase activity. *Journal of Bacteriology*. 2007 Nov 15;189(22):8308-20.
- Sambrook J, Russell DW, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual* (3-volume set). Immunol. 2001 Jan 15;49:895-909.
- Schultz J, Milpetz F, Bork P, Ponting CP. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998 May 26;95(11):5857-64.
- Semlow DR, Staley JP. Staying on message: ensuring fidelity in pre-mRNA splicing. *Trends in Biochemical Sciences*. 2012 Jul 1;37(7):263-73.
- Simon RU, Priefer U, Pühler A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Nature Biotechnology*. 1983 Nov;1(9):784.
- Stamatakis A. RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*. 2014 May 1;30(9):1312-3
- Tan MH, Kozdon JB, Shen X, Shapiro L, McAdams HH. An essential transcription factor, SciP, enhances robustness of *Caulobacter* cell cycle regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010 Oct 18:201014395.
- Thanbichler M, Iniesta AA, Shapiro L. A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Research*. 2007 Oct 24;35(20):e137-.
- Towbin H, Ramjoue HP, Kuster H, Liverani D, Gordon J. Monoclonal antibodies against eucaryotic ribosomes. Use to characterize a ribosomal protein not previously identified and antigenically related to the acidic phosphoproteins P1/P2. *Journal of Biological Chemistry*. 1982 Nov 10;257(21):12709-15.
- Trubetsky D, Proux F, Allemand F, Dreyfus M, Iost I. SrmB, a DEAD-box helicase involved in *Escherichia coli* ribosome assembly, is specifically targeted to 23S rRNA in vivo. *Nucleic Acids Research*. 2009 Sep 4;37(19):6540-9.
- TSU CA, KOSSEN K, UHLENBECK OC. The *Escherichia coli* DEAD protein DbpA recognizes a small RNA hairpin in 23S rRNA. *RNA*. 2001 May;7(5):702-9.
- Vicente, A. M., Marques, M. V. Estudo da RNA helicase DEAD-box codificada pelo gene CC0835 em *Caulobacter crescentus*. Universidade de São Paulo 2017.
- Wang N, Yamanaka K, Inouye M. CspI, the Ninth Member of the CspA Family of *Escherichia coli*, Is Induced upon Cold Shock. *Journal of Bacteriology*. 1999 Mar 1;181(5):1603-9.
- Wheeler W. Homology and the optimization of DNA sequence data. *Cladistics*. 2001 Mar;17(1):S3-11.
- Winzeler E, Shapiro L (1996) A novel promoter motif for *Caulobacter* cell cycle-controlled DNA replication genes. *J Mol Biol* 264: 412–425.
- Yamanaka K, Inouye M. Growth-phase-dependent expression of cspD, encoding a member of the CspA family in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 1997 Aug 1;179(16):5126-30.
- Yamanaka K, Mitani T, Ogura T, Niki H, Hiraga S. Cloning, sequencing, and characterization of multicopy suppressors of a mukB mutation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*. 1994 Jul;13(2):301-12.

Zimmermann L, Stephens A, Nam SZ, Rau D, Kübler J, Lozajic M, Gabler F, Söding J, Lupas AN, Alva V. A completely Reimplemented MPI bioinformatics toolkit with a new HHpred server at its Core. *Journal of Molecular Biology*. 2018 Jul 20;430(15):2237-43.