

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



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

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. 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^a. Andréa Cristina Fogaça e Dr^a. 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^a. Dr^a. 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 α -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 α -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.

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).

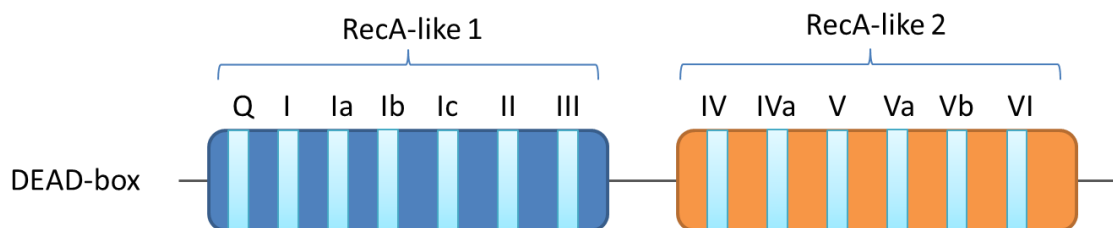


Figura 1 Helicase DEAD-box - Representação dos motivos de DEAD-box e estrutura de domínios conservada na família proteica. Modificado de Jarmoskaite & Russell, 2014

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).

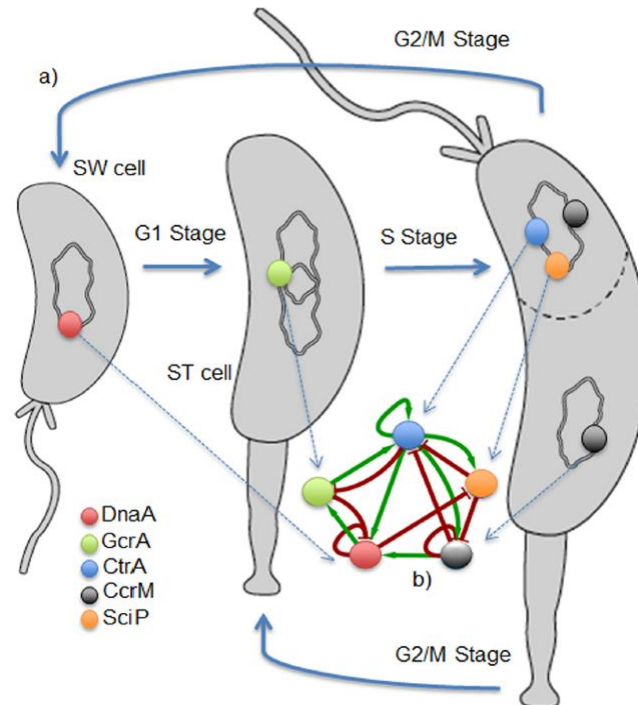


Figura 2 Ciclo celular de *C. crescentus* e suas principais proteínas regulatórias. Retirado de Quinones-Valles, 2014.

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.

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 β -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.
- Trubetskoy 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.