

HELOISE BALHESTEROS

**ANÁLISE DO PAPEL DO GENE *cspC* DE
Caulobacter crescentus E DE SUA REGULAÇÃO**

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

São Paulo

2009

HELOISE BALHESTEROS

**ANÁLISE DO PAPEL DO GENE *cspC* DE
Caulobacter crescentus E DE SUA REGULAÇÃO**

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

**Área de concentração:
Microbiologia**

**Orientador:
Profa. Dra. Marilis do Valle Marques**

São Paulo

2009

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

© reprodução total

Balhesteros, Heloise.

Análise do papel do gene *cspC* de *Caulobacter crescentus* e de sua regulação / Heloise Balhesteros. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Marilis do Valle Marques.

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

Versão do título para o inglês: Study of the role of the *cspC* gene from *Caulobacter crescentus* and its regulation.

Descritores: 1. Microbiologia 2. Biologia molecular 3. Regulação gênica 4. Resposta a estresse em bactérias 5. Proteínas de choque frio 6. *Caulobacter crescentus* I. Marques, Marilis do Valle II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós- Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB091/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Heloise Balhesteros.

Título da Dissertação: Análise do papel do gene *cspC* de *Caulobacter crescentus* e de sua regulação.

Orientador(a): Marilis do Valle Marques.

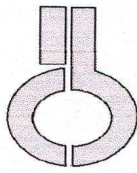
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../.....,

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

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



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

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

Comissão de Ética em Pesquisa

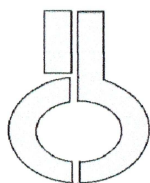
CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 210/07, referente ao projeto intitulado *Estudo do gene cspC de Caulobacter crescentus e seu papel na resposta a choque frio* sob a responsabilidade de **Heloise Balhesteros**, foi analisado na presente data pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por esta Comissão.

São Paulo, 09 de maio de 2007.

Prof. Dr. PAOLO M.A ZANOTTO

Vice-Coordenador da CEPsh-ICB/USP



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

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

São Paulo, 23 de junho de 2006.

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

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

À minha mãe, Rosa Maria Balhesteros,
por ter sempre confiado em meu potencial
e por me incentivar em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Marilis do Valle Marques pela orientação zelosa, pela confiança e, sobretudo, pelo profissionalismo e dedicação a seus alunos.

Aos colegas de laboratório André, Carolina, José, Ricardo, Valéria Italiani, Valéria Karla, Vânia e Ynés, pelo bom ambiente de trabalho, pela colaboração e principalmente pela amizade. Aos ex-colegas de laboratório Émerson, João, Letícia, Lígia, Rafael e Zuleta, e às colegas “ainda não oficiais” Juliana e Mirian, pelos mesmos motivos.

À Elza, por fornecer as bases para este trabalho e pelos ensinamentos valiosos desde minha Iniciação Científica, além da amizade.

Aos componentes da banca de qualificação pelas sugestões.

Aos professores, funcionários e colegas do Departamento de Microbiologia.

Às funcionárias Íris e Marlene pela eficiência, apoio técnico e amizade.

À Profa. Dra. Regina Lúcia Baldini e a Ana Laura pela ajuda prestada na obtenção de anticorpos.

Ao técnico Carlos, do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, pela ajuda na imunização de coelhos.

À FAPESP pelo auxílio financeiro.

Às secretárias Alice, Ana e Naíde pela ajuda sempre que foram solicitadas.

Às amigas e colegas de laboratório Carol e Val Karla, pelas conversas, pelos momentos divertidos e por toda a ajuda que me ofereceram, não só no laboratório como fora dele.

À minha mãe, Rosa Maria, pelo apoio, compreensão, amor e pelos valores transmitidos a mim.

Ao meu querido namorado Sergio, pela cumplicidade, pela compreensão, pelo afeto, pela empatia e por tornar meus dias mais felizes a seu lado.

RESUMO

BALHESTEROS, H. **Análise do papel do gene *cspC* de *Caulobacter crescentus* e de sua regulação.** 2009. 126 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

A resposta ao choque frio em bactérias envolve a indução de proteínas de choque frio de baixo peso molecular (CSPs), cuja principal função conhecida é a de desestabilizar estruturas secundárias do mRNA, permitindo sua tradução a baixas temperaturas. *Caulobacter crescentus* possui em seu genoma quatro genes codificando CSPs. Os produtos dos genes *cspA* e *cspB* têm sua expressão induzida sob choque frio, enquanto as proteínas codificadas pelos genes *cspC* e *cspD* são induzidas somente durante a fase estacionária. Procurou-se analisar a importância do gene *cspC* para a sobrevivência de *C. crescentus* em baixa temperatura e na fase estacionária, assim como estudar sua regulação e estabelecer os determinantes de sua indução durante a fase estacionária. Neste trabalho, foi determinada uma nova seqüência para a região codificadora do gene *cspC* de *C. crescentus*, revelando que a proteína CspC é composta de dois domínios CSD, assim como proposto para a outra CSP induzida durante a fase estacionária, CspD. Um mutante nulo para *cspC* foi construído e este mostrou ser sensível a baixa temperatura, apresentando queda na viabilidade em fase estacionária a 30 °C, e morfologia alterada. A região regulatória de *cspC* foi mapeada por fusões de transcrição com o gene repórter *lacZ*, identificando uma região responsável pela ativação da expressão de *cspC*, indicando que este gene possui regulação transcricional. Algumas condições nutricionais que dispararam a indução de *cspC* foram determinadas, indicando que a expressão do gene é induzida por carência de glicose no meio de cultura, mas não por carência de nitrogênio. Este perfil de indução não depende da região ativadora, que, por sua vez, se mostrou necessária para os máximos níveis de expressão do gene. Ainda, foram obtidos anticorpos policlonais contra as proteínas CspC e CspD, que auxiliaram na confirmação dos mutantes correspondentes e na corroboração do peso molecular das respectivas proteínas.

Palavras-chave: Microbiologia. Biologia molecular. Regulação gênica. Resposta a estresse em bactérias. Proteínas de choque frio. *Caulobacter crescentus*.

ABSTRACT

BALHESTEROS, H. **Study of the role of the *cspC* gene from *Caulobacter crescentus* and its regulation.** 2009. 126 f. Master thesis (Science) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

The cold shock response in bacteria involves the expression of low molecular weight cold shock proteins (CSPs), which contain a nucleic acid-binding domain called the Cold Shock Domain (CSD). The main known function of these proteins is to destabilize secondary structures on mRNAs, allowing their translation at low temperatures. *Caulobacter crescentus* is an alpha-proteobacterium whose genome possesses four genes encoding proteins containing CSDs. The expression of *cspA* and *cspB* is induced upon cold shock, while *cspC* and *cspD* are induced during stationary phase. The purpose of this work is to analyze the importance of the *cspC* gene for *C. crescentus* survival at low temperature and stationary phase, as well as to study its regulation and to establish the determinants of its induction during stationary phase. In this work, we describe the identification of a new sequence for the *cspC* coding region of *Caulobacter crescentus*, revealing that CspC is a protein containing two cold shock domains (CSD), as proposed for CspD. A null *cspC* mutant was constructed and it was sensitive to low temperature, showed reduced viability during stationary phase at 30 °C, and altered morphology. The regulatory region of *cspC* was mapped by transcriptional fusions with a *lacZ* reporter gene, identifying a region responsible for activation of *cspC* expression, suggesting that this gene is subject to transcriptional regulation. Some nutritional conditions triggering *cspC* induction were determined, indicating that its expression is induced upon glucose starvation, but *cspC* expression is not influenced by absence of nitrogen. This expression profile was not dependent on the activation region, which, in turn, was required for maximum levels of expression. Furthermore, polyclonal antibodies against CspC and CspD were obtained, which allowed confirmation of mutants and corroboration of the molecular weights of the corresponding proteins.

Keywords: Microbiology. Molecular biology. Gene regulation. Bacterial stress response. Cold shock proteins. *Caulobacter crescentus*.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5'-UTR: região 5' não traduzida
ATP: adenosina trifosfato
BCIP: 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*
CRP: proteína receptora de monofosfato de adenosina cíclico (*cAMP receptor protein*)
CSD: domínio de choque frio (*cold shock domain*)
CSP: proteína de choque frio (*cold shock protein*)
DNA: ácido desoxirribonucléico
dNTP: desoxirribonucleotídeos fosfatados
DO₆₀₀: densidade óptica a 600 nanômetros
DTT: ditioneitol
ECF: função extracitoplasmática
EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
ExPASy: *Expert Protein Analysis System*
IPTG: isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo
kb: quilobase(s)
kDa: quilodáton(s)
LB: Luria-Bertani
M: molar
mRNA: RNA mensageiro
NADP: nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
NBT: *nitro-blue tetrazolium chloride*
ONPG: orto-nitrofenil-β-galactosídeo
pb: pares de bases
PCR: reação em cadeia da polimerase
pI: ponto isoelétrico
PMSF: fluoreto de fenilmetilsulfonil
ppGpp: guanosina tetrafosfato
RNA: ácido ribonucléico
RNase: ribonuclease
rpm: rotações por minuto
rRNA: RNA ribossômico
SDS: dodecil sulfato de sódio
TCA: ácido tricloroacético
tRNA: RNA transportador
tRNA-Ala: RNA transportador carregando o aminoácido alanina
tRNA-Ile: RNA transportador carregando o aminoácido isoleucina
tRNA-Met: RNA transportador carregando o aminoácido metionina
U: unidade(s)
UFC: unidade formadora de colônia
x g: vezes a aceleração da gravidade
X-gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosídeo
Ωspec: cassete de resistência a espectinomicina e estreptomicina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo celular de <i>Caulobacter crescentus</i>	18
Figura 2. Representação esquemática dos efeitos do choque frio sobre a síntese protéica de <i>Escherichia coli</i>	24
Figura 3. Modelo da função das CSPs como chaperones de RNA	25
Figura 4. Modelos de regulação gênica mediada por ppGpp	32
Figura 5. Células de <i>C. crescentus</i> em fase exponencial (A) e diferentes estágios da fase estacionária (B-G)	34
Figura 6. Modelo do mecanismo de controle da resposta geral a estresses de <i>Methylobacterium extorquens</i>	35
Figura 7. Posição dos fragmentos amplificados por PCR neste trabalho, em relação à região do genoma de <i>C. crescentus</i> NA1000 que contém o gene <i>cspC</i>	67
Figura 8. Reação de PCR com os oligonucleotídeos C1 e CSPC-F	68
Figura 9. Resultados da busca por seqüências similares ao consenso de 1,5 kb com o programa BLAST	68
Figura 10. Alinhamento entre as regiões codificadoras dos genes <i>cspC</i> de <i>C. crescentus</i> NA1000 e Caul_3723 de <i>Caulobacter</i> sp. K31	69
Figura 11. Alinhamento entre as proteínas CspC e CspD de <i>C. crescentus</i> NA1000 e a proteína codificada pelo gene Caul_3723 de <i>Caulobacter</i> sp. K31	70
Figura 12. Determinação da seqüência de <i>cspC</i>	71
Figura 13. Estratégia resumida para a construção do mutante $\Delta cspC::\Omega spec$	73
Figura 14. Esquema dos possíveis eventos de recombinação homóloga	76
Figura 15. Mapa da região do genoma de <i>C. crescentus</i> NA1000 que contém o gene <i>cspC</i>	77
Figura 16. Reação de PCR para detecção da primeira recombinação	78
Figura 17. Reação de PCR para detecção da segunda recombinação	78
Figura 18. <i>Western blot</i> para confirmação da deleção do gene <i>cspC</i>	79
Figura 19. Curvas de crescimento a 30 °C	79
Figura 20. Avaliação do crescimento e sobrevivência a 10 °C	83
Figura 21. Microscopias ópticas durante o crescimento das células a 10 °C	84
Figura 22. Avaliação da sobrevivência em fase exponencial e estacionária a 30 °C	88
Figura 23. Microscopias ópticas durante o crescimento das células a 30 °C	89

Figura 24. Esquema da região regulatória do gene <i>cspC</i> de <i>C. crescentus</i>	93
Figura 25. Esquema das construções utilizadas para mapeamento da região regulatória de <i>cspC</i>	94
Figura 26. Ensaio de atividade de β -galactosidase para mapeamento da região regulatória do gene <i>cspC</i>	95
Figura 27. Avaliação do crescimento e estudo da atividade do promotor de <i>cspC</i> em meios com diferentes composições	98
Figura 28. Avaliação do crescimento e estudo da atividade do promotor de <i>cspC</i> sem a região ativadora em meios com diferentes composições	99
Figura 29. Avaliação do crescimento e estudo da atividade do promotor de <i>cspC</i> em condições de carência nutricional	100
Figura 30. Purificação da proteína CspD em <i>E. coli</i> e <i>Western blot</i> com soro anti-CspD	108
Figura 31. Indução e purificação da proteína CspC em <i>E. coli</i> DH5 α	108
Figura 32. <i>Western blot</i> com soro anti-CspD	109
Figura 33. <i>Western blot</i> com soro anti-CspC	109
Figura 34. Géis bidimensionais de extratos de culturas de NA1000 e ΔC incubadas a 30 °C por 48 horas	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho	41
Tabela 2. Variação da composição dos meios de cultura utilizados na avaliação da atividade da região promotora de <i>cspC</i> (item 3.9)	42
Tabela 3. Plasmídeos utilizados	42
Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados	44
Tabela 5. Programa de voltagens da focalização isoeletrica	62
Tabela 6. Indução relativa da expressão do gene <i>cspC</i> em ensaios de atividade de β -galactosidase, realizados com <i>C. crescentus</i> NA1000 portando as construções indicadas	95

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA	17
1.1 <i>Caulobacter crescentus</i>	17
1.2 Choque frio e adaptação ao frio	22
1.3 Fase estacionária	29
1.4 Os genes <i>csp</i> de <i>Caulobacter crescentus</i>	36
2 OBJETIVOS	39
3 MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Linhagens bacterianas e condições de crescimento	40
3.2 Plasmídeos utilizados	40
3.3 Oligonucleotídeos utilizados	40
3.4 Determinação da seqüência do gene <i>cspC</i> de <i>C. crescentus</i>	44
<u>3.4.1 Minipreparação de DNA cromossômico de bactérias Gram-negativas</u>	44
<u>3.4.2 Reação de PCR e clonagem da região contendo o gene <i>cspC</i></u>	45
<u>3.4.3 Transformação de <i>E. coli</i> DH5α por eletroporação</u>	46
<u>3.4.4 Minipreparação de DNA plasmidial</u>	46
<u>3.4.5 Seqüenciamento</u>	47
<u>3.4.6 Análise das seqüências</u>	48
3.5 Construção do mutante ΔC ($\Delta cspC::\Omega spec$)	48
<u>3.5.1 Isolamento das regiões flanqueadoras de <i>cspC</i></u>	48
<u>3.5.2 Subclonagem dos flanqueadores de <i>cspC</i> no vetor pBluescript KS</u>	49
<u>3.5.3 Ligação do $\Omega spec$ com pBluescript KS($\Delta cspC$)</u>	50
<u>3.5.4 Isolamento de DNA com papel de cromatografia e ligação no vetor pNPTS138</u>	50
<u>3.5.5 Transformação de <i>E. coli</i> S17-1 e conjugação com <i>C. crescentus</i> NA1000</u>	51
<u>3.5.6 Reação de PCR para detecção da primeira recombinação</u>	51
<u>3.5.7 Seleção da segunda recombinação</u>	52
3.6 Construção para complementação do mutante ΔC	52
3.7 Ensaios fenotípicos	53
<u>3.7.1 Ensaios de viabilidade</u>	53
<u>3.7.2 Avaliação do crescimento e análise morfológica</u>	53
3.8 Mapeamento da região regulatória de <i>cspC</i>	54
<u>3.8.1 Reação de PCR e clonagem no vetor pRK<i>lacZ</i>290</u>	54
<u>3.8.2 PCR para detectar insertos no vetor pRK<i>lacZ</i>290</u>	55
<u>3.8.3 Confirmação das construções e conjugação com <i>C. crescentus</i> NA1000</u>	55
<u>3.8.4 Ensaio de atividade de β-galactosidase</u>	55
3.9 Ensaios de atividade da região promotora em diferentes condições nutricionais	56
<u>3.9.1 Expressão de <i>cspC</i> em diferentes meios de cultura</u>	56
<u>3.9.2 Ensaios de carência nutricional</u>	56

3.10 Expressão de <i>cspC</i> e <i>cspD</i> em <i>E. coli</i>	57
3.10.1 Amplificação dos genes e clonagens	57
3.10.2 Indução da expressão de <i>cspC</i> e <i>cspD</i>	57
3.10.3 Purificação das proteínas CspC e CspD	58
3.11 Obtenção dos anticorpos policlonais anti-CspC e anti-CspD	59
3.12 Western blot	60
3.12.1 Extração de proteínas	60
3.12.2 Ensaio de <i>immunoblot</i>	60
3.13 Eletroforese bidimensional	61
3.13.1 Preparação das amostras	61
3.13.2 Focalização isoeletrica (primeira dimensão)	61
3.13.3 Segunda dimensão	62
3.13.4 Coloração dos géis	62
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	64
4.1 Análise da seqüência do gene <i>cspC</i> de <i>Caulobacter crescentus</i>	64
4.2 Construção do mutante $\Delta cspC::\Omega spec$	72
4.3 Ensaio fenotípicos	80
4.4 Mapeamento da região regulatória de <i>cspC</i>	90
4.5 Estudo da expressão do gene <i>cspC</i> em diferentes condições nutricionais	96
4.5.1 Expressão de <i>cspC</i> em diferentes meios de cultura	96
4.5.2 Análise da resposta do gene <i>cspC</i> a condições de carência nutricional	102
4.6 Detecção de CspC e CspD em diferentes linhagens de <i>C. crescentus</i>	105
4.7 Análise do padrão de expressão protéica de NA1000 e ΔC	110
5 CONCLUSÕES	114
REFERÊNCIAS	115

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 *Caulobacter crescentus*

O conceito de desenvolvimento geralmente é associado a organismos pluricelulares, não sendo naturalmente adotado no que se refere a organismos procarióticos. No entanto, algumas espécies de bactérias apresentam processos de desenvolvimento altamente elaborados, com diferenciação celular. O uso de técnicas citológicas e análises de genomas completos permitiram avançar nosso entendimento do desenvolvimento bacteriano. Trabalhos com vários sistemas modelo, como *Bacillus subtilis*, *Caulobacter crescentus*, *Myxococcus xanthus* e *Streptomyces* sp., permitiram uma maior compreensão sobre processos como esporulação, comportamento multicelular e ciclo celular bacteriano (FIGGE e GOBER, 2003).

A progressão do ciclo celular, em todos os organismos, requer a coordenação precisa de quatro processos: replicação do DNA, segregação dos cromossomos, divisão celular e crescimento celular. A bactéria não patogênica *Caulobacter crescentus* é considerada o principal sistema modelo para análise do ciclo celular em procariotos e sua regulação. A utilização deste modelo bacteriano tem permitido o estudo detalhado dos mecanismos moleculares que medeiam a geração e manutenção da assimetria espacial e a progressão do ciclo celular bacteriano (JENAL, 2000; SKERKER e LAUB, 2004; VIOLLIER e SHAPIRO, 2004).

Caulobacter crescentus é uma bactéria Gram-negativa aquática pertencente ao grupo das α -proteobactérias, sendo oligotrófica, de vida livre e apresentando uma divisão celular assimétrica, com a formação de duas células filhas distintas entre si quanto à estrutura, ao programa de desenvolvimento e à iniciação da replicação do DNA (Fig. 1). A célula-talo é sésil e adere a superfícies através de um polissacarídeo adesivo localizado na extremidade do talo, que é uma extensão do envelope celular. Este tipo celular é capaz de reiniciar imediatamente a replicação do cromossomo e a divisão celular. Já o outro tipo celular (célula móvel) não é sésil nem possui talo; em vez disso, possui um único flagelo, pili e quimiorreceptores, apresentando motilidade e atividade quimiotática. Nesta fase do ciclo, a replicação do cromossomo é silenciada, correspondendo à fase G1 do ciclo celular de eucariotos (Fig. 1). Para que estas células repliquem o DNA e reiniciem o ciclo, elas devem se diferenciar em células-talo, através da ejeção do flagelo, retração dos pili, degradação do aparato quimiotático e síntese de

um talo no mesmo pólo onde se encontrava o flagelo (JENAL, 2000; SKERKER e LAUB, 2004; VIOLLIER e SHAPIRO, 2004).

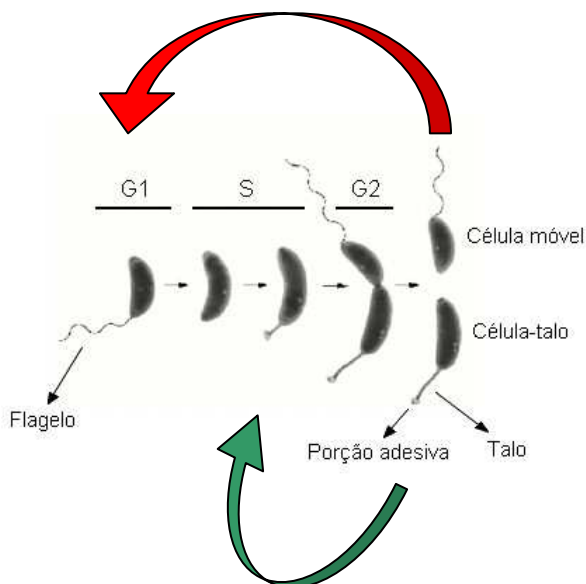


Figura 1. Ciclo celular de *Caulobacter crescentus*. A fase G1, correspondente à célula flagelada móvel, antecede a fase de replicação do material genético (a fase S). Durante a fase S, a célula móvel perde o flagelo e inicia a formação de um talo no mesmo pólo. A seguir, tem início a fase G2, caracterizada pela citocinese e formação de duas células filhas distintas, uma flagelada e móvel e outra séssil, portando o talo. A seta vermelha indica o reinício do ciclo para a célula móvel, enquanto a seta verde indica o mesmo para a célula-talo.

FONTE: Modificado de BRUN e JANAKIRAMAN, 2000.

Assim que a célula móvel começa a se diferenciar em uma célula-talo, a replicação pode ser iniciada e a célula aumenta de tamanho (fase S) (Fig. 1). Tem início a formação de um flagelo no pólo oposto ao talo, que originará uma nova célula móvel. Um cromossomo é distribuído para cada pólo da célula pré-divisional e, a seguir, ocorre a formação do septo e, finalmente, a divisão celular (fase G2) (JENAL, 2000; SKERKER e LAUB, 2004; VIOLLIER e SHAPIRO, 2004). O acúmulo de diferentes fatores determinantes do desenvolvimento de cada célula filha confere a heterogeneidade característica da célula pré-divisional (JUDD et al., 2003).

A assimetria na divisão celular é uma característica presente no ciclo celular de várias bactérias (SHAPIRO; MCADAMS; LOSICK, 2002). Um dos exemplos mais

conhecidos é *Bacillus subtilis*, que, sob certas condições de carência nutricional, pode se dividir assimetricamente como parte de uma via de desenvolvimento para produção de um esporo. Além disso, muitas bactérias, como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri* e *Listeria monocytogenes*, aparentam ser simétricas, mas, num olhar mais detalhado, possuem pólos assimétricos (SHAPIRO; MCADAMS; LOSICK, 2002). Os exemplos de assimetria mais facilmente reconhecidos envolvem estruturas na superfície, como flagelos, pili e talos, e estruturas sensoras, como quimiorreceptores, que se encontram preferencialmente em um dos pólos. A divisão celular gera um pólo novo e outro antigo, e este último é preferencialmente utilizado por *Bradyrhizobium* para adesão às raízes de plantas hospedeiras (LOH et al., 1993). *Shigella flexneri* e *Listeria monocytogenes*, patógenos intracelulares de mamíferos, agregam em um dos pólos da célula filamentos de actina do hospedeiro, de modo a formar uma estrutura propulsora para movimentar-se unidirecionalmente e penetrar células vizinhas (GOLDBERG et al., 1993; SMITH; PORTNOY; THERIOT, 1995). Esta agregação depende das proteínas IcsA em *S. flexneri* e ActA em *L. monocytogenes*, localizadas polarmente nestas bactérias.

O dimorfismo celular de *C. crescentus* pode ter relação com a adaptação às condições ambientais em que esta bactéria vive. Geralmente, bactérias vivem em ambientes dinâmicos e instáveis, e os ambientes aquáticos ou úmidos em que *C. crescentus* vive não fogem a este padrão. Para sobreviver nestes ambientes, muitas bactérias desenvolveram a habilidade de se adaptar rapidamente a uma grande gama de condições, através da transdução de sinais ambientais até o interior da célula, levando à expressão diferenciada de genes, que gera uma resposta celular adequada à situação em que a célula se encontra. No caso de *C. crescentus*, a transdução de sinais não só é utilizada desta maneira, como também no controle da organização interna e dos processos periódicos da replicação celular, agindo assim na própria progressão do ciclo celular (JENAL, 2000). Neste caso, muitos destes sistemas têm localização específica na célula, indicando que o desenvolvimento e a morfogênese polar estão diretamente conectados. Sendo assim, o dimorfismo de *C. crescentus* possibilita a exploração de ambientes mais favoráveis pela forma flagelada e a colonização do nicho pela forma sésil replicativa (HALLEZ et al., 2004), evidenciando a relação entre a percepção das condições ambientais, a diferenciação celular e a adaptação ao ambiente.

Muitos dos sistemas de transdução de sinais de *C. crescentus* envolvidos na progressão do ciclo celular consistem em sistemas de dois componentes (JENAL,

2000). O modelo deste sistema baseia-se na presença de um par específico de proteínas: um sensor, freqüentemente localizado na membrana citoplasmática, que monitora algum parâmetro ambiental; e um regulador de resposta citoplasmático, que promove algum tipo de resposta adaptativa, geralmente alteração na expressão de genes. O mecanismo de transmissão do sinal entre o sensor e o regulador de resposta consiste na transferência de fosfato. Os sensores possuem uma atividade de autoquinase em seus domínios transmissores; quando há o estímulo apropriado a um determinado sensor, seu domínio transmissor liga um grupo fosfato do ATP a um resíduo de histidina de sua estrutura. O sensor, então, transfere o grupo fosfato para um resíduo de aspartato do módulo receptor do regulador de resposta (PARKINSON, 1995).

A progressão do ciclo celular de *C. crescentus* é controlada por uma família de proteínas regulatórias, envolvidas na transferência de informação entre o ambiente e o interior da célula. O regulador de resposta CtrA controla vários eventos importantes para o ciclo celular, como o silenciamento da origem de replicação, metilação do DNA, inibição da divisão celular e biossíntese do flagelo, estando ativo em células móveis (LAUB et al., 2002; LAUB et al., 2000; SKERKER e LAUB, 2004). Além disso, a atividade deste regulador global está sujeita a um controle temporal e espacial que inclui regulação da transcrição, fosforilação e degradação, mediadas por diversas outras proteínas (JENAL, 2000). Um regulador global complementar, GcrA, mostra oscilação no tempo e no espaço com CtrA, regulando a expressão de fatores de replicação do DNA e proteínas necessárias para a morfogênese polar em células-talo (HOLTZENDORFF et al., 2004). CtrA e GcrA formam um circuito genético oscilatório, com CtrA exercendo controle negativo sobre a expressão de GcrA e esta, ativando CtrA (HOLTZENDORFF et al., 2004). Além destas, existem muitas outras proteínas regulatórias do ciclo, sendo boa parte delas integrantes de sistemas de dois componentes ou com estrutura e/ou função similares, como DivJ/DivK, CckA, FlbE/FlbD, PleC/PleD, entre outras (JENAL, 2000). Outras evidências da complexidade da regulação do ciclo são: a localização específica destas proteínas, que se altera durante as fases do ciclo; sua ativação e inativação ordenadas espacial e temporalmente; e até mesmo no posicionamento do cromossomo, com a origem de replicação voltada para o pólo flagelado e o término de replicação voltado para o pólo oposto, havendo correlação linear entre a posição dos loci no interior da célula e sua distância da origem (VIOLLIER et al., 2004). Acredita-se que este posicionamento característico do

cromossomo contribua para o controle espacial e temporal da expressão gênica durante o ciclo celular de *C. crescentus* (VIOLLIER e SHAPIRO, 2004).

O fato de *Caulobacter* ser uma bactéria com ciclo de vida complexo, que envolve diferenciação celular, ao mesmo tempo tendo que se adaptar ao meio ambiente, faz desta bactéria um modelo ideal para o estudo de genes de resposta a estresses ambientais e de como sua regulação é realizada em conjunto com o programa de desenvolvimento. Por exemplo, sabe-se que o comprimento do talo de células de *C. crescentus* aumenta linearmente com o número de divisões e, portanto, com a idade da célula; ao mesmo tempo, o comprimento do talo é inversamente proporcional à concentração de fosfato no meio (SCHMIDT e STANIER, 1966). Um regulador de resposta de um sistema de dois componentes (PhoB) controla o comprimento do talo em resposta a sinais enviados pelo sistema de tomada de fosfato Pts (GONIN et al., 2000), evidenciando a ligação entre a percepção de sinais ambientais e o desenvolvimento celular. Nota-se que o controle de eventos relacionados ao ciclo celular não depende somente da organização interna da célula, mas também das condições ambientais em que a célula se encontra, sendo necessária uma regulação fina do ciclo para que todos os estímulos sejam integrados e o ciclo seja iniciado em um momento propício. Até o momento, não se sabe quais estímulos desencadeiam a diferenciação de *C. crescentus* de célula móvel para célula-talo; no entanto, tendo em vista o complexo sistema de transdução de sinais envolvido no ciclo celular e a dispersão diferenciada das duas formas celulares, pode-se formular a hipótese de que sinais ambientais sejam levados em conta durante a progressão do ciclo.

Caulobacter crescentus possui um genoma de 4.016.942 pares de bases em um único cromossomo circular, codificando 3.767 genes, e foi a primeira α -proteobactéria de vida livre que teve o genoma seqüenciado (NIERMAN et al., 2001), possibilitando a investigação deste organismo por uma variedade de técnicas genéticas, bioquímicas e de biologia celular. Esta espécie pode servir como base de exploração da biologia das α -proteobactérias; estudos recentes têm mostrado que muitos dos componentes e mecanismos descobertos em *Caulobacter* são conservados evolutivamente entre membros das α -proteobactérias, como o regulador CtrA e parte de seu regulon (HALLEZ et al., 2004; SKERKER e LAUB, 2004). Foi sugerido que a presença de homólogos destas proteínas em outras α -proteobactérias estaria relacionada à ocorrência de divisão assimétrica em outras espécies; esta rede comum de regulação seria utilizada para adaptação a diferentes nichos ecológicos durante a evolução do grupo (HALLEZ et

al., 2004). Algumas das espécies deste grupo, como os simbioses de plantas *Sinorhizobium meliloti* e *Mesorhizobium loti*, o patógeno de plantas *Agrobacterium tumefaciens* e os patógenos de mamíferos *Rickettsia prowazekii* e *Brucella abortus*, têm papéis importantes em aplicações ambientais e médicas; portanto, o estudo de *Caulobacter* tem implicações de longo alcance, como, por exemplo, na identificação de novos alvos para drogas antibacterianas contra espécies patogênicas (SKERKER e LAUB, 2004).

1.2 Choque frio e adaptação ao frio

A adaptação a estresses ambientais, como flutuações na temperatura, é essencial para a sobrevivência de todos os organismos. Os mecanismos utilizados para superar os efeitos deletérios do choque frio são comuns a vários organismos procarióticos e eucarióticos. Os maiores efeitos do choque frio são a redução da fluidez da membrana e a estabilização de estruturas secundárias do RNA e do DNA, a qual pode afetar a eficiência de tradução, transcrição e replicação do DNA (PHADTARE; YAMANAKA; INOUE, 2000). A redução da fluidez da membrana é compensada pelo aumento da proporção de ácidos graxos insaturados nos lipídios de membrana, um fenômeno conhecido como adaptação homeoviscosa (SINENSKY, 1974). Os efeitos deletérios causados pela estabilização de estruturas secundárias no DNA e no RNA são superados pela indução de proteínas de choque frio, que ajudam a eliminar as estruturas secundárias dos ácidos nucleicos, mantendo sua integridade e restaurando a eficiência da tradução, transcrição e replicação (PHADTARE; YAMANAKA; INOUE, 2000).

Como a tradução do mRNA é prejudicada em baixas temperaturas, o estágio inicial da resposta ao frio caracteriza-se pela ausência da síntese protéica geral. Por causa deste bloqueio transitório da iniciação de tradução, o crescimento celular também cessa transitoriamente (PHADTARE; YAMANAKA; INOUE, 2000). Entretanto, há síntese de proteínas de choque frio, cujos mRNAs possuem estabilidade ótima para tradução a baixas temperaturas, sendo, em contrapartida, muito instáveis a 37 °C (PHADTARE; ALSINA; INOUE, 1999). Por exemplo, em *E. coli*, o mRNA codificando a principal proteína de choque frio, CspA, é dramaticamente estabilizado após uma queda na temperatura de 37 °C para 15 °C (GOLDENBERG et al., 1997). As proteínas de choque frio associadas aos ribossomos são expressas nestas condições e se ligam às subunidades e aos ribossomos 70S a fim de converter os ribossomos não-

funcionais sensíveis ao frio a um estado funcional resistente ao frio (JONES e INOUE, 1996). Desse modo, a ausência de síntese de proteínas no estágio inicial da resposta ao frio é seguida por uma retomada da síntese protéica e do crescimento celular.

Tem sido demonstrado que a resposta ao choque frio é induzida quando a função ribossomal é inibida: o bloqueio da função ribossomal por mutações ou por antibióticos como cloranfenicol resulta em uma indução da resposta a choque frio (THIERINGER; JONES; INOUE, 1998).

Notavelmente, durante a fase de inibição da síntese protéica, um grupo de proteínas de choque frio tem a expressão dramaticamente induzida (Fig. 2). Estas proteínas podem ser divididas em duas classes: a classe I é composta por proteínas expressas em um nível muito baixo a 37 °C e são abruptamente induzidas a níveis muito altos (> 10 vezes) após queda na temperatura. A classe II contém proteínas que estão presentes em um nível basal a 37 °C e são moderadamente induzidas (< 10 vezes) após queda na temperatura (THIERINGER; JONES; INOUE, 1998).

Em *E. coli*, as proteínas da classe I incluem CspA, a principal proteína de choque frio, e alguns de seus parálogos (CspB, CspG, CspI), NusA (envolvida na terminação e antiterminação da transcrição) e proteínas associadas ao ribossomo como CsdA e RbfA. A classe II inclui H-NS (proteína ligante de DNA, associada ao nucleóide), GyrA (subunidade da DNA girase), RecA (envolvida em recombinação) e IF2 (proteína associada ao ribossomo) (THIERINGER; JONES; INOUE, 1998; WANG; YAMANAKA; INOUE, 1999; YAMANAKA; FANG; INOUE, 1998). Todas estas proteínas estão envolvidas na manutenção da integridade do DNA cromossômico ou na eficiência da transcrição e tradução, processos afetados pelo frio.

Para superar os efeitos sobre a tradução, um dos mecanismos utilizados é a prevenção da formação de novas estruturas secundárias no mRNA, pela expressão de proteínas de choque frio de baixo peso molecular, ou CSPs (*cold shock proteins*), que se ligam ao RNA nascente (Fig. 3) (GRAUMANN et al., 1997; JIANG; HOU; INOUE, 1997).

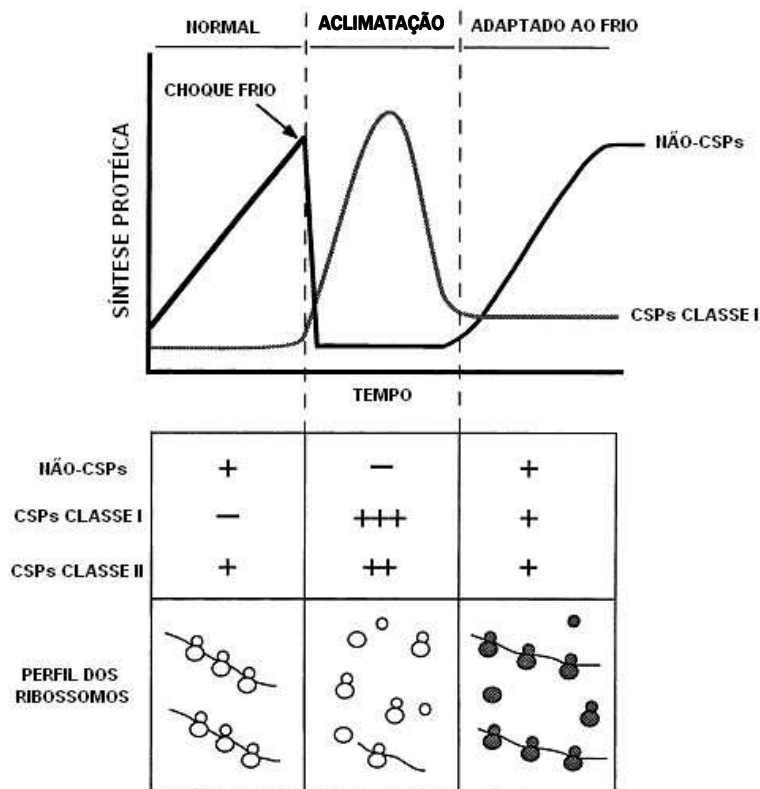


Figura 2. Representação esquemática dos efeitos do choque frio sobre a síntese proteica de *Escherichia coli*. A sigla CSP se refere a proteínas de choque frio (*cold shock proteins*). Durante a fase inicial do choque frio, a fase de aclimação, a síntese de proteínas não-CSPs é inibida, enquanto a de CSPs (principalmente da classe I) é dramaticamente induzida. Após as células terem se adaptado ao frio, a síntese de CSPs é reprimida e a de proteínas não-CSPs pode ser retomada. De acordo com o modelo de adaptação dos ribossomos ao choque frio, estes, quando se tornam adaptados (representados em preto) pela incorporação de fatores ribossômicos que alteram suas propriedades, tornam-se capazes de traduzir mRNAs codificando proteínas não-CSPs, retomando a síntese proteica normal.

FONTE: Modificado de THIERINGER; JONES; INOUE, 1998.

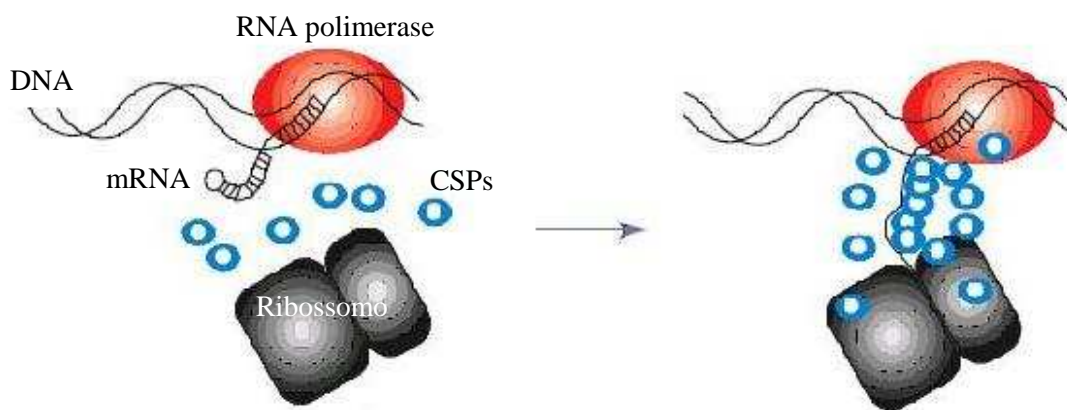


Figura 3. Modelo da função das CSPs como chaperones de RNA. Durante o choque frio, as estruturas secundárias formadas no mRNA prejudicam sua tradução. Com o aumento da síntese de CSPs, estas se ligam ao mRNA nascente e o mantêm na forma linear, permitindo seu acesso aos ribossomos. O ribossomo, então, desloca as CSPs, que possuem baixa afinidade pelo mRNA, e inicia a tradução.

FONTE: Modificado de GRAUMANN e MARAHIEL, 1998.

A primeira CSP a ser descrita foi CspA de *Escherichia coli* (GOLDSTEIN; POLLITT; INOUE, 1990), uma chaperone de RNA que ajuda a desestabilizar as estruturas secundárias do RNA, permitindo sua tradução e tornando-o mais suscetível à degradação por RNase (JIANG; HOU; INOUE, 1997). Oito parálogos foram identificados em *E. coli* (CspB a CspI), sendo CspA, CspB, CspG e CspI induzidas no choque frio (WANG; YAMANAKA; INOUE, 1999; YAMANAKA; FANG; INOUE, 1998), CspC e CspE expressas constitutivamente (YAMANAKA et al., 1994) e CspD induzida em fase estacionária e carência de nutrientes (YAMANAKA; FANG; INOUE, 1998; YAMANAKA e INOUE, 1997). CspA também possui propriedades de ativador transcricional (BRANDI; PON; GUALERZI, 1994). Estas proteínas mostram-se importantes para a viabilidade celular, uma vez que deleções de até três genes *csp* provocam um aumento compensatório dos genes *csp* remanescentes (XIA; KE; INOUE, 2001), e a deleção de quatro desses genes em *E. coli* causa defeitos no crescimento em baixas temperaturas, com diminuição da viabilidade, crescimento mais lento e impedimento da formação do septo na divisão celular, formando células alongadas (XIA; KE; INOUE, 2001).

A proteína CspD de *E. coli*, induzida durante a fase estacionária, forma dímeros que se ligam a DNA simples fita e RNA sem especificidade de seqüência, inibindo tanto

a iniciação quanto a alongação no processo de replicação (YAMANAKA et al., 2001). Apesar de não ser um gene essencial, a superexpressão de CspD em *E. coli* causa mudanças morfológicas semelhantes às observadas quando a replicação do DNA é inibida (YAMANAKA et al., 2001), sendo caracterizado como um inibidor da replicação do DNA e possuindo papel regulatório na replicação cromossômica de células em carência nutricional. Este papel na inibição da replicação de *E. coli* é evidenciado pela localização preferencial de CspD na região do nucleóide, ao contrário de CspA, que possui localização polar (GIANGROSSI et al., 2001).

Em *Bacillus subtilis*, três CSPs foram identificadas (CspB, CspC e CspD), todas induzidas pelo frio e CspC e CspD induzidas também na fase estacionária (GRAUMANN e MARAHIEL, 1998, 1999). A presença de pelo menos uma cópia de um desses genes é essencial para esta bactéria, tanto no choque frio quanto em condições ótimas de crescimento (GRAUMANN et al., 1997).

As CSPs possuem um domínio de choque frio (*cold shock domain*, CSD) contendo dois motivos de ligação a ácidos nucleicos, denominados RNP1 e RNP2 (BANDZIULIS; SWANSON; DREYFUSS, 1989; SCHRÖDER et al., 1995). O domínio CSD das proteínas de choque frio bacterianas apresenta similaridade de sequência e de propriedades de ligação a RNA e DNA com proteínas ligantes de ácidos nucleicos de eucariotos, o que sugere que esses domínios se originaram muito cedo na escala evolutiva (GRAUMANN e MARAHIEL, 1998). O domínio CSD está envolvido na regulação transcricional e traducional e se liga ao motivo Y-box, contendo a sequência ATTGG, através de sua superfície rica em aminoácidos aromáticos e básicos (SCHRÖDER et al., 1995). O motivo Y-box foi encontrado na região promotora de diversos genes eucarióticos, e dois genes de *E. coli* cuja transcrição é ativada por CspA (*hns* e *gyrA*) contêm o motivo Y-box em seus promotores, sendo ambos os genes pertencentes ao regulon de choque frio (JONES et al., 1992; LA TEANA et al., 1991; SCHRÖDER et al., 1995). CspA poderia auxiliar na estabilização dos complexos abertos para a transcrição destes genes, como sugerido por Graumann e Marahiel (1996). O domínio CSD é universal e está envolvido na regulação da transcrição e da tradução em diversos organismos eucarióticos, e a função proposta das proteínas contendo CSD em bactérias é atuar como chaperones de RNA.

Em eucariotos, geralmente, as funções realizadas por proteínas contendo domínios CSD não estão diretamente relacionadas à resposta ao choque frio ou à adaptação ao frio. No entanto, estudos têm evidenciado a conservação funcional de

domínios CSD. Karlson et al. (2002) caracterizaram uma proteína de trigo (WCSP1) contendo um domínio CSD associado a domínios *zinc-finger* e domínios ricos em glicina. WCSP1 é regulada positivamente durante a adaptação ao frio, ligando-se a DNA simples fita e RNA através de seu domínio CSD e a DNA dupla fita através dos domínios *zinc-finger* (KARLSON et al., 2002). O domínio CSD de WCSP1 também se mostrou responsável pela separação das fitas de DNA dupla fita, como observado para CspA de *E. coli* (NAKAMINAMI; KARLSON; IMAI, 2006). A expressão de WCSP1 no mutante quádruplo para CSPs de *E. coli* complementou o fenótipo de sensibilidade ao frio, evidenciando que esta proteína compartilha funções com as CSPs de *E. coli* (NAKAMINAMI; KARLSON; IMAI, 2006). Além disso, WCSP1 mostrou atividade de antiterminação de transcrição em *E. coli*, como CspA, CspC e CspE desta bactéria (BAE et al., 2000), sendo também considerada uma chaperone de RNA que auxilia na desestabilização de estruturas secundárias, permitindo a tradução sob baixas temperaturas (NAKAMINAMI; KARLSON; IMAI, 2006).

Ortólogos das CSPs foram detectados em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, incluindo linhagens psicofílicas, mesofílicas e termofílicas, mas não foram encontrados em Archaea (GRAUMANN e MARAHIEL, 1998; PHADTARE; ALSINA; INOUE, 1999). Cianobactérias possuem uma família de pequenas proteínas induzidas por choque frio com domínios de ligação a RNA diferentes de CSD (SATO, 1995). Os ortólogos de CSPs são importantes não só durante a adaptação ao choque frio, mas também durante as condições normais de crescimento.

Ao contrário da resposta ao choque de calor, até o momento, não foi identificado um fator sigma específico para a resposta ao choque frio, fato que sugere que essa resposta é predominantemente pós-transcricional (GIULIODORI et al., 2004; GUALERZI; GIULIODORI; PON, 2003; WEBER e MARAHIEL, 2002) e organizada num complexo *stimulon* (WEBER e MARAHIEL, 2003). Fatores sigma são subunidades da holoenzima RNA polimerase necessárias para a iniciação da transcrição dos genes em um dado promotor, e a maioria das bactérias possui múltiplos fatores sigma, que permitem o reconhecimento de diferentes conjuntos de promotores (DOI e WANG, 1986). Geralmente, existe um fator sigma principal, responsável pelo reconhecimento da maioria dos promotores, e vários fatores sigma alternativos, que se acumulam em resposta a estresses específicos, direcionando a RNA polimerase para outros conjuntos de promotores, de modo que os genes agora expressos auxiliem a

célula a enfrentar o estresse em questão (DOI e WANG, 1986; MAGNUSSON; FAREWELL; NYSTRÖM, 2005).

Apesar de não ter sido identificado um fator sigma específico para a resposta ao choque frio, o fator sigma de resposta geral a estresses de *Listeria monocytogenes* (σ^B) contribui para a adaptação ao frio de modo dependente da fase do crescimento, sendo também necessário para o acúmulo eficiente de betaína e carnitina como crioprotetores (BECKER et al., 2000). Em *Bacillus subtilis*, o fator sigma de resposta geral a estresses σ^B é ativado durante o crescimento contínuo a 15 °C, e uma linhagem mutante que não produz σ^B (*sigB*) tem o crescimento prejudicado nesta temperatura (BRIGULLA et al., 2003). Porém, ao contrário de *L. monocytogenes*, a adição de crioprotetores restaurou o crescimento do mutante *sigB* em *B. subtilis*, indicando que a indução do regulon geral de estresses e o acúmulo de crioprotetores são maneiras independentes desta bactéria lidar com o estresse por frio (BRIGULLA et al., 2003). Ao contrário de todos os outros estímulos ativadores de σ^B já descritos para *B. subtilis*, a indução por baixas temperaturas não depende exclusivamente das proteínas regulatórias RsbV, RsbU e RsbP (BRIGULLA et al., 2003), indicando a existência de uma via desconhecida de ativação de σ^B por baixas temperaturas em *B. subtilis*.

A resposta de *Caulobacter crescentus* ao choque frio e adaptação a baixas temperaturas tem sido estudada recentemente (MAZZON et al., 2008), revelando que esta bactéria é extremamente resistente ao congelamento a -80 °C sem adição de crioprotetores. A viabilidade é aumentada quando *C. crescentus* é incubada em baixas temperaturas antes do congelamento a -20 °C, possuindo assim uma capacidade de adquirir criotolerância. Mutações em genes codificando DNA e RNA helicases tornam *C. crescentus* sensível ao congelamento a -80 °C (MAZZON et al., 2008), evidenciando que o enovelamento dos ácidos nucléicos durante o choque frio é um dos principais problemas durante o crescimento das células em baixas temperaturas, impedindo a replicação, transcrição e tradução.

1.3 Fase estacionária

Bactérias possuem uma capacidade reprodutiva infinita enquanto viverem em um ambiente que suporte o crescimento. No entanto, o crescimento rápido e o metabolismo eficiente destes microrganismos resultam no esgotamento das fontes nutricionais e ocasionalmente na alta concentração de produtos metabólicos tóxicos, e a população de células entra em uma fase definida como a fase estacionária do crescimento. Nesta fase, a reprodução e o crescimento cessam, e a habilidade reprodutiva é gradualmente perdida (NYSTRÖM, 2004).

A fase estacionária do crescimento bacteriano é um dos melhores exemplos de regulação gênica global, em que vários fatores de regulação agem de modo coordenado para estabelecer um novo padrão de expressão gênica. Este padrão depende da situação em que a célula se encontrava ao entrar em fase estacionária; por exemplo, células que entram nesta fase por carência de fosfato diferem em composição e padrão de expressão gênica de células em carência de glicose (NYSTRÖM, 2004). As proteínas sintetizadas durante a fase estacionária estão, em sua maioria, envolvidas na manutenção da viabilidade durante longos períodos de carência nutricional. No entanto, ocorre também a expressão de genes envolvidos na resistência a diversos estresses ambientais, como choque de calor, estresse oxidativo e alta osmolaridade (NYSTRÖM, 2004). De fato, células de *E. coli* submetidas a alta osmolaridade, altas temperaturas ou pH ácido apresentam fenótipos típicos de fase estacionária, como células menores e resistência a múltiplos estresses (HENGGE-ARONIS, 1993; SANTOS et al., 1999).

Em *E. coli* e outras bactérias, o principal regulador desta fase é o fator sigma S (σ^S), responsável pela indução de diversos genes necessários nesta fase e também pela proteção cruzada a diversos estresses (HENGGE-ARONIS, 1993; LANGE e HENGGE-ARONIS, 1991). Em *E. coli*, durante condições de carência ou estresse, há acúmulo do fator σ^S , que se liga à RNA polimerase e a direciona para a transcrição de mais de 50 genes (HENGGE-ARONIS, 2000). Os membros deste regulon têm funções relacionadas a estresses, metabolismo central, rearranjo da morfologia celular e virulência (HENGGE-ARONIS, 2000). Outros reguladores globais de transcrição, como fatores sigma de choque de calor e os reguladores de resposta a estresse oxidativo OxyR e SoxRS, atuam em conjunto com σ^S (NYSTRÖM, 2004). Apesar de σ^S ser o principal regulador da expressão gênica durante a fase estacionária em *E. coli*, muitos genes não dependem deste fator para aumento da expressão durante a fase estacionária, indicando

que o regulon de σ^S constitui apenas uma fração dos genes expressos nesta fase em *E. coli* (SCHELLHORN et al., 1998). Algumas CSPs, como CspC e CspE de *E. coli*, estão envolvidas na regulação de σ^S , estabilizando o mRNA deste, e na regulação de UspA, uma proteína induzida em uma variedade de estresses (PHADTARE e INOUYE, 2001).

A fase estacionária apresenta muitos efeitos de regulação gênica dependentes de ppGpp. ppGpp é um nucleotídeo (guanosina tetrafosfato) que age como regulador global da expressão gênica em bactérias, causando um redirecionamento da transcrição para que a expressão de genes importantes para sobrevivência em carência nutricional e outros estresses seja favorecida em detrimento da expressão de genes necessários para o crescimento e proliferação (MAGNUSSON; FAREWELL; NYSTRÖM, 2005). Este nucleotídeo é produzido em resposta à limitação de nutrientes, principalmente aminoácidos, e a outras circunstâncias que causam parada no crescimento. Assim, em *E. coli*, a carência de aminoácidos causa a ocupação do sítio A dos ribossomos com tRNAs não carregados, o que estimula a produção de ppGpp pelas proteínas RelA e SpoT. O nucleotídeo se liga às subunidades β e β' da RNA polimerase (ARTSIMOVITCH et al., 2004) e desestabiliza os complexos abertos da RNA polimerase com os promotores de genes de rRNA e tRNA, que são intrinsecamente instáveis (GRALLA, 2005; MAGNUSSON; FAREWELL; NYSTRÖM, 2005). Com isso, a transcrição destes genes, necessários à proliferação celular, é prejudicada, e a RNA polimerase é direcionada para outros genes cujo complexo aberto é mais estável, que são em geral genes relacionados à resistência a estresses e à fase estacionária (Fig. 4A). Outro mecanismo proposto para a ação de ppGpp é que ele favorece fatores sigma alternativos em detrimento do fator sigma principal, na competição destes pelo cerne da RNA polimerase (Fig. 4B) (MAGNUSSON; FAREWELL; NYSTRÖM, 2005). No entanto, mutantes que não produzem ppGpp apresentam fenótipos mais abrangentes do que a ausência de reprogramação gênica e menor sobrevivência sob estresses ou em fase estacionária; em *E. coli*, a ausência de ppGpp causa redução na expressão de genes dependentes do fator σ^S (NYSTRÖM, 2004) e falha na produção da forma esférica da célula, com formação de células filamentosas (XIAO et al., 1991). Também foram descritos fenótipos de redução da virulência em *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. coelicolor* e *S. antibioticus* (BALZER e MCLEAN, 2002; PIZARRO-CERDA e TEDIN, 2004).

Ao contrário de *E. coli*, *C. crescentus* e outras α -proteobactérias possuem apenas um ortólogo de *spoT*, responsável tanto pela produção quanto pela hidrólise de ppGpp (LESLEY e SHAPIRO, 2008). SpoT é necessária para a ativação da produção de ppGpp

em células de *C. crescentus* em carência de carbono. O mutante $\Delta spoT$ de *C. crescentus* não exibe defeitos no crescimento em meio rico, nem auxotrofia em meio mínimo, mas exibe uma fase *lag* estendida quando é passado de meio rico para meio mínimo, indicando que SpoT é importante para a adaptação à carência nutricional abrupta (LESLEY e SHAPIRO, 2008). A retirada da glicose como única fonte de carbono causa inibição da replicação e bloqueio da diferenciação celular em *C. crescentus*, sendo a primeira dependente de ppGpp (LESLEY e SHAPIRO, 2008). Foi proposto que ppGpp é necessário para a proteólise de DnaA, a proteína iniciadora da replicação, durante condições de carência de carbono. Este mecanismo é importante para impedir a iniciação da replicação quando as células não dispõem dos recursos necessários para completar esta tarefa (GORBATYUK e MARCZYNSKI, 2005). Na ausência de SpoT, células móveis de *C. crescentus* tiveram a replicação iniciada inapropriadamente em carência de carbono (LESLEY e SHAPIRO, 2008). Além disso, o mutante $\Delta spoT$ apresenta viabilidade muito reduzida quando se retira a glicose como única fonte de carbono, provavelmente por causa das replicações inconvenientes, que geram forquilhas de replicação que colapsam e ocasionam morte celular (LESLEY e SHAPIRO, 2008). Ainda não se sabe como o sinal de carência nutricional é propagado para SpoT; foi proposto que o sinal seja transmitido a um fator que interaja com SpoT, alterando sua conformação e aumentando a razão entre síntese e hidrólise de ppGpp (LESLEY e SHAPIRO, 2008).

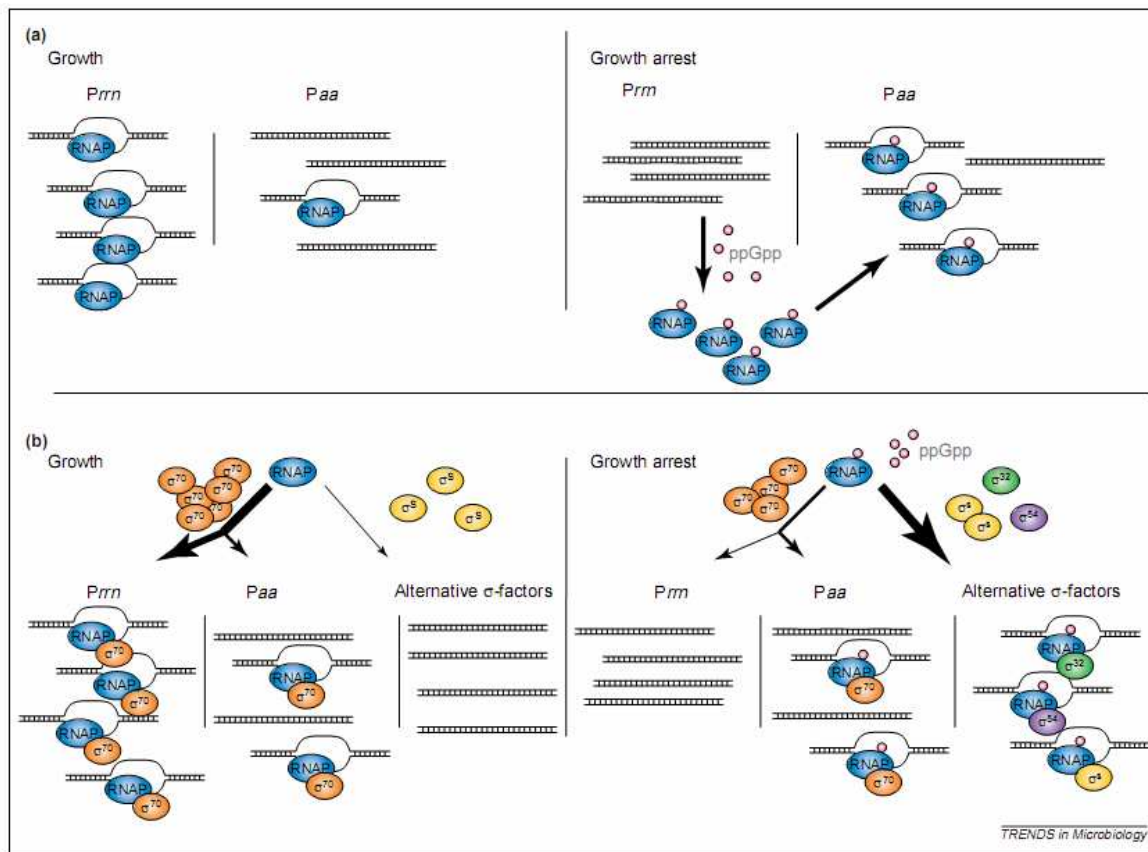


Figura 4. Modelos de regulação gênica mediada por ppGpp. (A) Durante o crescimento normal, a RNA polimerase encontra-se predominantemente ligada a promotores fortes de complexo aberto instável, como promotores de genes codificando RNAs ribossômicos e transportadores (*Prrn*). Durante a carência nutricional, ppGpp estimula a destabilização de complexos abertos intrinsecamente instáveis, aumentando os níveis de RNA polimerase livre e permitindo que promotores mais fracos, como promotores de genes envolvidos na biossíntese e transporte de aminoácidos (*Paa*), recrutem-na. (B) Durante o crescimento, a RNA polimerase encontra-se predominantemente associada ao fator sigma principal (σ^{70}), transcrevendo os promotores dependentes deste sigma. Com a carência nutricional e aumento da síntese de ppGpp, há aumento na competição entre fatores sigma, afetando a disponibilidade de RNA polimerase livre para interagir com σ^{70} .

FONTE: Retirado de MAGNUSSON; FAREWELL; NYSTRÖM, 2005.

Ao entrar na fase estacionária, a maioria das células de *C. crescentus* apresenta o ciclo celular interrompido no estágio pré-divisional. Se as células são mantidas nessa condição por um tempo prolongado, elas se tornam alongadas (comprimento 15-20 vezes maior do que na fase exponencial) e com morfologia helicoidal (Fig. 5) (WORTINGER; QUARDOKUS; BRUN, 1998). Diferentemente de *E. coli*, ainda não se sabe qual é o principal regulador da expressão gênica durante a fase estacionária de *C. crescentus*, pois nenhuma seqüência homóloga ao gene que codifica o fator σ^S foi encontrada no genoma desta bactéria (NIERMAN et al., 2001). É sabido que células de *C. crescentus* em fase estacionária exibem uma maior resistência a estresses ambientais do que células em fase exponencial (WORTINGER; QUARDOKUS; BRUN, 1998), como em *E. coli*, mas não se sabe se isso é devido à indução de um *stimulon* de fase estacionária.

Algumas proteínas induzidas nesta fase foram identificadas em *Caulobacter*, como a protease dependente de ATP FtsH (FISCHER et al., 2002), o maquinário proteolítico ClpXP (OSTERAS e JENAL, 2000) e proteínas envolvidas na resposta a estresse oxidativo, como catalase/peroxidase e superóxido dismutase (SCHNELL e STEINMAN, 1995). A indução de proteases na fase estacionária está relacionada à degradação de proteínas e peptídeos endógenos para reciclagem de aminoácidos e síntese *de novo* de proteínas (NYSTRÖM, 2004). Alguns mutantes de *C. crescentus* que apresentam falhas na adaptação à fase estacionária foram identificados, e os genes interrompidos estão envolvidos no metabolismo de aminoácidos e em recombinação e reparo de DNA (ITALIANI e MARQUES, 2003), indicando que estes dois sistemas são importantes para manutenção da viabilidade durante a fase estacionária.

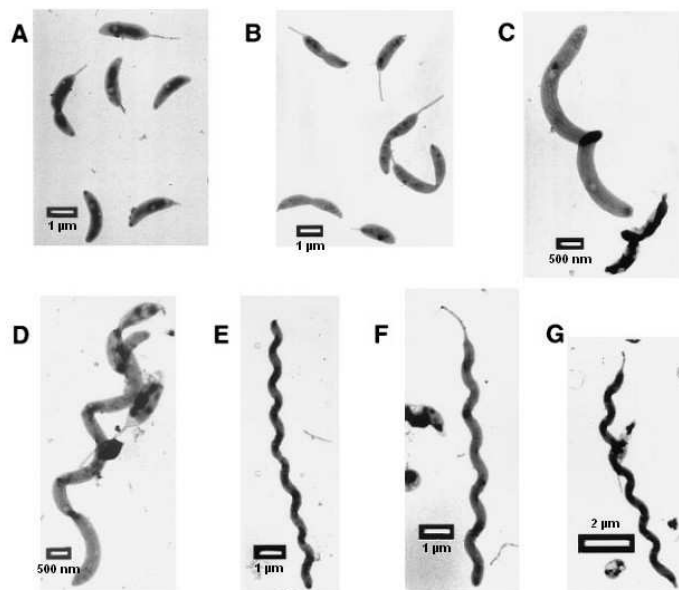


Figura 5. Células de *C. crescentus* em fase exponencial (A) e diferentes estágios da fase estacionária (B-G). B, 16 horas em fase estacionária; C, cultura de 4 dias; D, 6 dias; E-G, 16 dias.

FONTE: Modificado de WORTINGER; QUARDOKUS; BRUN, 1998.

Em *Methylobacterium extorquens*, uma α -proteobactéria colonizadora de plantas, foi identificado PhyR, um regulador da resposta geral a estresses (GOURION; ROSSIGNOL; VORHOLT, 2006). PhyR apresenta uma estrutura diferenciada, combinando um domínio receptor de regulador de resposta de sistema de dois componentes e um domínio amino-terminal semelhante a um fator sigma de função extracitoplasmática (fator sigma ECF, de *extracytoplasmic function*) (Fig. 6). A mutação do gene que codifica PhyR resulta em fenótipos drásticos na presença de várias situações de estresse, como mudanças na temperatura, estresse oxidativo e dessecação (GOURION; FRANCEZ-CHARLOT; VORHOLT, 2008; GOURION; ROSSIGNOL; VORHOLT, 2006). Curiosamente, PhyR é conservado dentre as α -proteobactérias (GALPERIN, 2006; GOURION; ROSSIGNOL; VORHOLT, 2006), as quais, ao mesmo tempo, não possuem homólogos de *rpoS*, o gene que codifica o fator σ^S . Isto poderia indicar que as α -proteobactérias utilizam homólogos de PhyR para regular a resposta geral a estresses (FRANCEZ-CHARLOT et al., 2009), e, possivelmente, a expressão gênica durante a fase estacionária. NepR, uma proteína identificada como um regulador negativo de PhyR, também é um fator anti-sigma, que mantém o fator σ^{EctG1}

em um estado inativo (FRANCEZ-CHARLOT et al., 2009) (Fig. 6). Em outras α -proteobactérias, o gene *nepR* está à frente de um gene que codifica um fator sigma ECF verdadeiro; em *Sinorhizobium meliloti* e *Caulobacter crescentus*, estes fatores sigma ECF (RpoE2 e SigT, respectivamente) estão envolvidos na resposta geral a estresses (ALVAREZ-MARTINEZ et al., 2007; SAUVIAC et al., 2007). Em *Methylobacterium extorquens*, PhyR não atua como um fator sigma verdadeiro, mas controla a expressão gênica indiretamente através da interação com outras proteínas: sob estresse, PhyR dissocia a interação entre o fator σ^{EcfG1} e seu anti-sigma NepR, seqüestrando NepR através de seu domínio semelhante a fator sigma ECF (Fig. 6). Trata-se do primeiro mecanismo descoberto de mimetização de um fator sigma (FRANCEZ-CHARLOT et al., 2009).

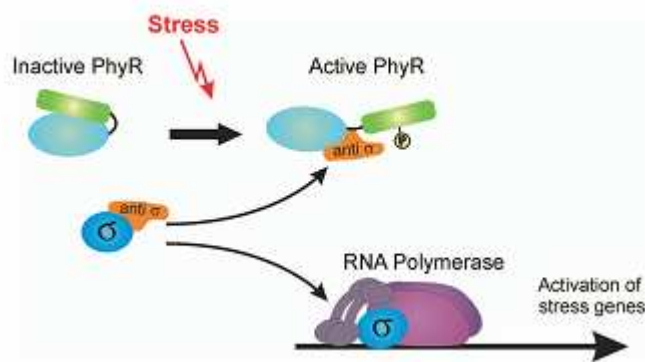


Figura 6. Modelo do mecanismo de controle da resposta geral a estresses de *Methylobacterium extorquens*. Em condições normais, PhyR se encontra inativo, e o fator σ^{EcfG1} é sequestrado pelo seu anti-sigma, NepR. Em resposta a estresses, PhyR é fosforilado e interage com NepR, liberando o fator σ^{EcfG1} e permitindo sua ligação com a RNA polimerase a fim de transcrever genes de resposta ao estresse.

FONTE: Retirado de FRANCEZ-CHARLOT et al., 2009.

É notável a quantidade de genes *csp* descritos como sendo induzidos durante a fase estacionária do crescimento bacteriano: *cspB* e *cspC* em *B. subtilis* (GRAUMANN e MARAHIEL, 1999); *cspD* em *E. coli* (YAMANAKA e INOUE, 1997); e *cspC* e *cspD* em *C. crescentus* (LANG e MARQUES, 2004). Um fato muito interessante em processos como o choque frio e a fase estacionária é que ambos possuem em comum, pelo menos em *E. coli*, uma rápida inativação da função ribossomal e diminuição da fidelidade de tradução (NYSTRÖM, 2004), que em *E. coli* e *B. subtilis* são

considerados possíveis sinais que disparam a indução de CSPs (GRAUMANN et al., 1997; JONES e INOUE, 1996; VANBOGELEN e NEIDHARDT, 1990; WEBER e MARAHIEL, 2002). Por esse motivo, pode-se especular que genes *csp* não induzidos pelo frio teriam sua função redirecionada para a fase estacionária.

Uma grande proporção do repertório genético de bactérias está envolvida na adaptação à carência nutricional ou a outros estímulos relacionados à fase estacionária (SCHELLHORN et al., 1998). Considerando-se que não há muitos trabalhos sobre a regulação gênica durante a fase estacionária em *C. crescentus*, o estudo da regulação de *cspC*, um gene *csp* induzido durante a fase estacionária (LANG e MARQUES, 2004), pode fornecer informações interessantes sobre este assunto.

1.4 Os genes *csp* de *Caulobacter crescentus*

Caulobacter crescentus é uma bactéria amplamente distribuída, encontrada em terras úmidas e em praticamente todo ambiente aquático, inclusive em corpos de água que congelam completamente no inverno (ABYZOV et al., 2001), portanto certamente está adaptada a sobreviver em temperaturas extremamente baixas. Trata-se de uma bactéria mesófila, cuja temperatura ótima de crescimento é ao redor de 30 °C (POINDEXTER, 1981), porém é extremamente resistente ao congelamento a -80 °C sem adição de crioprotetores (MAZZON et al., 2008), possuindo genes *csp* no genoma que codificam quatro peptídeos contendo CSD (NIERMAN et al., 2001). Dois deles (CspA e CspB) possuem massa molecular de 7 kDa e apresentam alto grau de similaridade entre si e com a família CspA de *E. coli*, possuindo um único CSD (LANG e MARQUES, 2004). A proteína CspC foi anotada como também possuindo um domínio CSD. A proteína CspD, de 21,5 kDa, possui dois CSDs, arranjo que foi identificado apenas em proteínas de proteobactérias da subdivisão alfa, na qual *C. crescentus* está incluída (LANG e MARQUES, 2004). A expressão dos genes *cspA* e *cspB* de *C. crescentus* é aumentada em baixas temperaturas (10 °C-20 °C), enquanto *cspC* e *cspD* são mais expressos somente na fase estacionária (LANG e MARQUES, 2004).

A construção de linhagens mutantes mostrou que os genes *cspA*, *cspB* e *cspD* de *Caulobacter* não são essenciais a 30 °C (LANG e MARQUES, 2004; MAZZON,

2008¹). É provável que haja um mecanismo compensatório em mutantes $\Delta cspD$ pela presença do gene *cspC*, pois, embora *cspD* seja induzido na fase estacionária, este gene não é essencial nesta fase (LANG e MARQUES, 2004). A deleção de *cspD* também não prejudica a viabilidade de *C. crescentus* a 10 °C, ao contrário do observado com a deleção de *cspA* (o principal gene *csp* induzido pelo frio em *C. crescentus*) (LANG e MARQUES, 2004). Porém, o fenótipo não é severo, indicando que a falta de um único gene *csp* não é muito deletéria para a célula e que esta falta pode estar sendo compensada pela presença dos outros genes *csp*.

O gene *cspD* de *Caulobacter* é regulado no nível transcricional, uma vez que deleções progressivas do promotor indicaram que a presença de uma região ativadora é necessária para os máximos níveis de expressão, tanto na fase exponencial quanto na estacionária (LANG e MARQUES, 2004). Uma seqüência similar a essa está também presente na região regulatória do gene *cspC* (LANG e MARQUES, 2004), mas não foi encontrada em outro gene induzido na fase estacionária, *katG* (STEINMAN; FAREED; WEINSTEIN, 1997). A indução de *cspD* observada na fase estacionária não depende desta região ativadora, podendo ser resultante de outro tipo de regulação transcricional ou do aumento da estabilidade do mRNA.

O papel dos genes *cspC* e *cspD* é provavelmente voltado para a adaptação e sobrevivência da célula a longos períodos em fase estacionária. Os sinais ambientais que estimulam a expressão desses genes ainda não foram determinados, mas eles podem responder ao estado nutricional da célula, como descrito para *cspA* e *cspD* de *E. coli* (YAMANAKA e INOUE, 2001; YAMANAKA e INOUE, 1997).

Deleções individuais dos genes *cspA* ou *cspD* em *C. crescentus* causam pequena diminuição na taxa de sobrevivência ao congelamento a -80 °C, mas a mortalidade aumenta quando os dois genes são deletados (LANG, 2005). Isso indica que os genes *csp* desempenham papel na sobrevivência de *C. crescentus* em baixas temperaturas, e que, embora CspD não seja induzida em baixas temperaturas, esta proteína também é importante na sobrevivência da célula nestas condições.

Estas observações acerca do padrão de expressão e de efeitos de mutações em genes *csp* de *Caulobacter crescentus* levantam questões importantes sobre a relevância fisiológica da expressão destes genes para a célula, como: qual a importância dos genes *csp* não induzidos pelo choque frio? A que sinais eles respondem? Existe sobreposição

¹ MAZZON, R. R. São Paulo, 2008 (comunicação pessoal).

de funções entre as CSPs de frio e de fase estacionária? CspC e CspD têm funções redundantes ou partilham a mesma via de regulação? Todos estes questionamentos levaram à proposição e ao desenvolvimento deste trabalho.

2 OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivo determinar os sinais e seqüências responsáveis pela regulação do gene *cspC* de *Caulobacter crescentus*, bem como estudar seu papel durante o choque frio e a fase estacionária. Para isso, as estratégias utilizadas foram as seguintes:

- a) deleção do gene *cspC* e análise das mudanças fenotípicas decorrentes, tanto em condições normais de crescimento quanto em baixas temperaturas (10°C);
- b) mapeamento da região regulatória do gene *cspC* e comparação com a de *cspD*;
- c) determinação de sinais nutricionais e fatores envolvidos na indução do gene *cspC*;
- d) obtenção de anti-soro contra as proteínas CspC e CspD e análise do acúmulo destas proteínas em diferentes linhagens.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Linhagens bacterianas e condições de crescimento

A tabela 1 lista as linhagens utilizadas neste trabalho. Células de *Caulobacter crescentus* foram cultivadas a 30 °C em meio complexo PYE ou meio mínimo M2 (ELY, 1991) contendo ou não glicose, NH₄Cl ou peptona 0,2% (Tabela 2; ver item 3.9). Quando necessário, os meios foram suplementados com ácido nalidíxico (20 µg/ml), tetraciclina (1 µg/ml), canamicina (5 µg/ml), estreptomicina (0,5 µg/ml) ou espectinomicina (20 µg/ml).

Células de *Escherichia coli* DH5α (HANAHAN, 1983) foram utilizadas nos procedimentos de clonagem. *E. coli* foi cultivada a 37 °C em meio Luria-Bertani (LB) (AUSUBEL et al., 1995) suplementado com ampicilina (100 µg/ml), tetraciclina (12,5 µg/ml), canamicina (50 µg/ml), estreptomicina (5 µg/ml), ou espectinomicina (50 µg/ml) quando necessário. Os plasmídeos utilizados foram introduzidos em *C. crescentus* através de conjugação com *E. coli* S17-1 (SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983).

Os meios sólidos continham 1,5% de ágar.

3.2 Plasmídeos utilizados

A tabela 3 lista os plasmídeos utilizados neste trabalho.

3.3 Oligonucleotídeos utilizados

Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho estão listados na tabela 4.

Tabela 1. Linhagens bacterianas utilizadas neste trabalho.

	Linhagens	Genótipo e/ou fenótipo	Referência
<i>Escherichia coli</i>	S17-1	294::RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)	SIMON; PRIEFER; PÜHLER, 1983
	DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> (Φ 80 <i>lacZ</i> Δ M15) <i>hsdR17 recA1</i> <i>endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	HANAHAN, 1983
<i>Caulobacter crescentus</i>	NA1000	Linhagem sincronizável utilizada como padrão	EVINGER e AGABIAN, 1977
	ΔC	NA1000 Δ <i>cspC</i> :: Ω spec	Este trabalho
	ΔC (pMR20- <i>cspC</i>)	NA1000 Δ <i>cspC</i> :: Ω spec complementada com pMR20- <i>cspC</i>	Este trabalho
	NA1000(pMR20)	NA1000 portando o plasmídeo pMR20 sem inserto	Este trabalho
	ΔC (pMR20)	ΔC portando o plasmídeo pMR20 sem inserto	Este trabalho
	NA1000(P _{H3} / <i>lacZ</i>)	NA1000 portando pRK <i>lacZ</i> 290 com fragmento de 170 pb correspondente à deleção completa da região regulatória de <i>cspC</i>	Este trabalho
	NA1000(P _{H2} / <i>lacZ</i>)	NA1000 portando pRK <i>lacZ</i> 290 com fragmento de 240 pb correspondente à deleção parcial da região regulatória de <i>cspC</i>	Este trabalho
	NA1000(P <i>cspC</i> / <i>lacZ</i>)	NA1000 portando pRK <i>lacZ</i> 290 com a região regulatória íntegra de <i>cspC</i> clonada	LANG e MARQUES, 2004
	ΔD	NA1000 Δ <i>cspD</i>	LANG e MARQUES, 2004
	ΔABD	NA1000 Δ <i>cspA</i> Δ <i>cspB</i> :: Ω spec <i>cspD</i>	R. R. Mazzon
$\Delta spoT$	NA1000 Δ <i>spoT</i>	C. A. P. T. Silva e R. R. Mazzon	

Tabela 2. Variação da composição dos meios de cultura utilizados na avaliação da atividade da região promotora de *cspC* (item 3.9).

Meio de cultura	Glicose (0,2%)	NH ₄ Cl (9,35 mM)	Peptona (0,2%)
M2G (= M2)	X	X	-
M2P	-	X	X
M2P(-N)	-	-	X
M2GP	X	X	X
M2GP(-N)	X	-	X
PYE + G ^a	X	-	X

^a Meio rico acrescentado de glicose.

Tabela 3. Plasmídeos utilizados.

Plasmídeo	Características ^a	Fonte ou referência
pGEM	Vetor de clonagem, Ap ^r	Promega ^b
pGEM + 1,5 kb	pGEM contendo fragmento de 1,5 kb, compreendendo a região do genoma de NA1000 que contém o gene <i>cspC</i> íntegro	Este trabalho
TOPO + 1,2 kb	Vetor de clonagem, <i>neo</i> (Km ^r), Ap ^r (Invitrogen ^c), com fragmento de 1,2 kb da região do genoma de NA1000 contendo o gene <i>cspC</i> truncado	E. A. S. Lang
pBluescript KS	Replicon ColE1, Ap ^r	Stratagene ^d
pBluescript KS(Δ <i>cspC</i>)	pBluescript KS contendo os flaqueadores do gene <i>cspC</i> ligados <i>in tandem</i>	Este trabalho
pBluescript KS(Δ <i>cspC</i> :: Ω spec)	pBluescript KS contendo os flaqueadores do gene <i>cspC</i> e substituição deste por cassete de resistência a espectinomicina e estreptomicina	Este trabalho
pHP45 Ω	Derivado do pBR322, Ap ^r , cassete Ω spec (Sm ^r / Sp ^r)	PRENTKI e KRISCH, 1984
pNPTS138	Replicon ColE1, <i>oriT</i> , <i>npt</i> (Km ^r), <i>sacB</i>	D. Alley

(Continua)

Tabela 3. Plasmídeos utilizados. (Continuação)

Plasmídeo	Características^a	Fonte ou referência
pNPTS138($\Delta cspC::\Omega spec$)	pNPTS138 contendo os flaqueadores do gene <i>cspC</i> e substituição deste por cassete de resistência a espectinomicina e estreptomicina	Este trabalho
pMR20	Vetor de baixo número de cópia e ampla gama de hospedeiros, Tc^r , <i>oriT</i>	ROBERTS et al., 1996
pMR20- <i>cspC</i>	pMR20 contendo a região do gene <i>cspC</i> íntegro de NA1000	Este trabalho
pRK <i>lacZ</i> 290	Vetor de fusão de transcrição <i>lacZ</i> , Tc^r , replicon IncP1, <i>oriT</i>	GOBER e SHAPIRO, 1992
$P_{H3}/lacZ$	pRK <i>lacZ</i> 290 com fragmento de 170 pb correspondente à deleção completa da região regulatória de <i>cspC</i>	Este trabalho
$P_{H2}/lacZ$	pRK <i>lacZ</i> 290 com fragmento de 240 pb correspondente à deleção parcial da região regulatória de <i>cspC</i>	Este trabalho
$P_{cspC}/lacZ$	pRK <i>lacZ</i> 290 com a região regulatória íntegra de <i>cspC</i> clonada	LANG e MARQUES, 2004
pProEX HT	Vetor de expressão que adiciona 6 resíduos de histidina à extremidade amino-terminal da proteína cuja sequência codificadora foi clonada	Invitrogen
pProEX HTa(<i>cspC</i>)	pProEX com o gene <i>cspC</i> clonado em fase	Este trabalho
pProEX HTc(<i>cspD</i>)	pProEX com o gene <i>cspD</i> clonado em fase	Este trabalho

(Conclusão)

^a Ap^r , marca de resistência a ampicilina; Km^r , marca de resistência a canamicina; Sm^r , a estreptomicina; Sp^r , a espectinomicina; Tc^r , a tetraciclina.

^b Promega Co., Madison, WI, E.U.A.

^c Invitrogen Brasil, São Paulo, SP, Brasil.

^d Stratagene Co., La Jolla, CA, E.U.A.

Tabela 4. Oligonucleotídeos utilizados.

Nome	Seqüência (5'-3') ^a
C1	AAT <u>GGG</u> CCCGCACCGTCGCAGCCTCCATGC ⁽¹⁾
C2	AAAGAATTCTGCGCATCCTCTAAGACGCC ⁽²⁾
C3	AAAGAATTCACACCGTTCGCCATATTATCC ⁽²⁾
C4	AAACTGCAGATGTCTTCTTCACAATCTCCG ⁽³⁾
CSPC-C	GATA <u>AAGCTT</u> GCGGTGAATCAGGCGG ⁽⁴⁾
CSPC-E	GCACCGTCGCAGCCTCCATGCTCCTG
CSPC-F	CGGGGTTTTTTGCGGTGCAATATCGC
CSPC-G	TTAGGATCCTGGCCGCCGTCCTCGGG ⁽⁵⁾
H1	AGAATTCATGGCGAACGGTGTTCGTTAAG ⁽²⁾
H2	AGAATTCGAAGCGCGAATTTTTCTGCC ⁽²⁾
H3	AGAATTCAGCGCGTCTCGAGGTTTTGCG ⁽²⁾
H4	CGTGCTGCGCGCCGTACAGACC
M13 Forward (-20)	GTAAAACGACGGCCAG
M13 Reverse	CAGGAAACAGCTATGAC
LacZup	TGACGGCTACCATCA

^a Nucleotídeos sublinhados indicam sítios de restrição incorporados aos oligonucleotídeos: ⁽¹⁾*Apa*I; ⁽²⁾*Eco*RI; ⁽³⁾*Pst*I; ⁽⁴⁾*Hind*III; ⁽⁵⁾*Bam*HI.

3.4 Determinação da seqüência do gene *cspC* de *C. crescentus*

3.4.1 Minipreparação de DNA cromossômico de bactérias Gram-negativas

O DNA cromossômico foi preparado como descrito por Chen e Kuo (1993) para ser utilizado como molde nas reações de PCR. Células de *C. crescentus* NA1000 foram inoculadas em 2 ml de meio PYE e incubadas a 30 °C durante a noite, com agitação constante de 200 rpm. Transferiu-se 1,5 ml da cultura para tubo Eppendorf e centrifugou-se por 3 minutos a 13000 x g. As células foram ressuspendidas em 200 µl de tampão de lise (Tris-acetato 40 mM pH 7,8; acetato de sódio 20 mM; EDTA 1 mM; SDS 1%) e pipetadas vigorosamente. Em seguida, foram adicionados 66 µl de uma solução de NaCl 5 M, para remover proteínas e debris celulares, seguido de agitação,

até a mistura ficar viscosa. Esta mistura foi então centrifugada a 4 °C por 10 minutos a 13000 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo, e foi adicionado o mesmo volume de clorofórmio. O tubo foi invertido gentilmente até a mistura ficar leitosa e sem apresentar separação de fases. Esta mistura foi centrifugada por 3 minutos a 4 °C e 13000 x g, e o sobrenadante foi transferido para outro tubo. Foi adicionado, então, o dobro do volume de etanol e em seguida a mistura foi centrifugada por 10 minutos a 4 °C e 13000 x g. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% por duas vezes, seco e ressuspenso em 50 µl de TE (Tris-HCl pH 8,0 10 mM; EDTA pH 8,0 1 mM) contendo RNase A (20 µg/ml).

3.4.2 Reação de PCR e clonagem da região contendo o gene *cspC*

A reação de PCR foi realizada com 0,5 µl de DNA genômico de NA1000 digerido com *Pst*I (previamente fervido por 3 minutos para separar as fitas do DNA), 25 pmol de cada oligonucleotídeo (C1 e C5PC-F), 0,2 mM de uma mistura de dNTPs (Invitrogen), 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 10% de dimetilsulfóxido e 1 X tampão de PCR fornecido com a enzima. As condições de PCR foram de 95 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 68 °C por 30 segundos e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos. Após os ciclos, a reação permaneceu a 72 °C por 7 minutos e foi mantida a 4 °C.

Paralelamente, foi feita uma reação de PCR com enzima de alta fidelidade (FideliTaq™ DNA Polymerase, USB Co., Cleveland, OH, E.U.A.): os reagentes e suas concentrações foram os mesmos da reação anterior, exceto o tampão (próprio da enzima) e MgCl₂ (0,75 mM). As condições de PCR foram de 95 °C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 66 °C por 30 segundos e 68 °C por 1 minuto e 30 segundos. Após os ciclos, a reação permaneceu a 68 °C por 5 minutos e foi mantida a 4 °C.

Os produtos de PCR, de 1,5 kb, tiveram suas ampliações confirmadas por visualização em gel de agarose 1%, em tampão de corrida TBE 1 X (Tris base 90 mM; ácido bórico 88 mM; EDTA 0,1 M), utilizando como marcador de peso molecular o 1 kb Plus DNA Ladder (Invitrogen). As reações de amplificação foram purificadas com o QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN Biotecnologia Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) e clonadas no vetor pGEM T-Easy (Promega), segundo instruções do fabricante.

3.4.3 Transformação de *E. coli* DH5 α por eletroporação

Com auxílio de uma alça de platina, células da linhagem DH5 α de *Escherichia coli* foram inoculadas em 5 ml de meio LB. Esta cultura cresceu durante uma noite a 37 °C, e foi diluída para uma densidade óptica a 600 nm (DO₆₀₀) de 0,1 em 500 ml de meio LB. Ao atingir uma absorvância de 0,5-0,6, a cultura foi resfriada em gelo por 15 minutos, transferida para tubos de centrífuga previamente resfriados e centrifugada por 40 minutos a 4 °C e 5000 x g. O meio de cultura foi desprezado e as células, ressuspensas em 100 ml de água destilada estéril gelada, centrifugando-se por 40 minutos a 4 °C e 5000 x g. Desprezado o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 40 ml de água destilada estéril gelada e centrifugadas por 10 minutos a 4 °C e 5000 x g. A seguir, as células foram ressuspensas em 5 ml de glicerol 10% gelado e transferidas para um único tubo, centrifugadas por 10 minutos a 4 °C e 5000 x g e ressuspensas em 500 μ l de glicerol 10% gelado. As células foram distribuídas em tubos Eppendorf (alíquotas de 40 μ l), congeladas em gelo seco e armazenadas a -80 °C.

Para cada transformação, foram utilizados 40 μ l de *E. coli* DH5 α e 1 μ l da clonagem no vetor pGEM, indicada no item anterior. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação gelada e, então, as células foram eletroporadas a 200 Ω , 25 μ F e 1,8 kV. Imediatamente, foi adicionado às células 1 ml de meio LB, transferindo-se para um tubo de vidro estéril e incubando por 1 hora a 37 °C. Em seguida, alíquotas da cultura foram semeadas em meio LB ágar acrescido de ampicilina, X-gal (250 μ g) e IPTG (25 μ l de um estoque 100 mM).

3.4.4 Minipreparação de DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi preparado pelo método de lise alcalina (AUSUBEL et al., 1995). Colônias brancas de *E. coli* DH5 α , transformadas com o vetor pGEM contendo a região do gene *cspC*, foram inoculadas em 2 ml de meio LB contendo ampicilina e incubadas a 37 °C durante a noite, com agitação constante de 200 rpm.

Foi transferido 1,5 ml de cada cultura para tubos Eppendorf, centrifugando-se por 5 minutos a 13000 x g. As células foram ressuspensas em 100 μ l de solução I (glicose 50 mM; EDTA 10 mM; Tris-HCl 25 mM pH 8,0) gelada e em seguida foram adicionados 200 μ l de solução II (NaOH 0,2 N; SDS 1%). Após homogeneização por inversão, adicionaram-se 150 μ l de solução III (acetato de potássio 3 M; ácido acético

glacial 11,5%) gelada e agitou-se por 10 segundos. Os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 4 °C e 13000 x g e os sobrenadantes, transferidos para outro tubo. Adicionou-se o mesmo volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1), e centrifugou-se por 5 minutos a 4 °C e 13000 x g. A fase aquosa foi precipitada com 2 volumes de etanol gelado por 5 minutos e centrifugada por 5 minutos a 4 °C e 13000 x g. Os precipitados foram lavados com etanol 70%, secos e ressuspensos em 50 µl de TE contendo 20 µg/ml de RNase A.

3.4.5 Seqüenciamento

Após confirmação da clonagem do inserto nos plasmídeos (através da digestão destes com *EcoRI* ou *NotI*), o DNA plasmidial foi extraído com o QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) para o seqüenciamento automático com o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems do Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Juntamente com estes, foi seqüenciado um plasmídeo construído por Elza Akie Sakamoto Lang (TOPO + 1,2 kb), consistindo no vetor de clonagem TOPO (Invitrogen) contendo um fragmento de 1,2 kb amplificado do genoma de NA1000 com os oligonucleotídeos CSPC-E e CSPC-F. Para o seqüenciamento, foram utilizados tanto oligonucleotídeos do vetor [M13 Forward (-20) e M13 Reverse] quanto oligonucleotídeos internos ao inserto (H1 e CSPC-C).

Aproximadamente 1 µg de cada minipreparação de DNA plasmidial foi transferido para um tubo contendo 3,2 pmol de um dos oligonucleotídeos, adicionando-se 2 µl do tampão 5 X e 1 µl do “Cycle Sequencing Mix”, em um volume final de 10 µl. Os seqüenciamentos foram realizados através da seguinte reação de PCR: 95 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 52 °C por 20 segundos e 60 °C por 4 minutos.

Aos 10 µl de cada reação, foram adicionados 50 µl de isopropanol 75% para precipitação. Esta mistura foi homogeneizada e mantida à temperatura ambiente por 10 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 50 minutos a 1500 x g e 20 °C. Os precipitados foram lavados duas vezes com etanol 70% e o DNA foi seco a 37 °C por 30 minutos e ressuspensado em 2,5 µl de tampão apropriado. As amostras foram deixadas por 2 horas em temperatura ambiente ou durante a noite a 4 °C, e então foram desnaturadas por calor para serem aplicadas no aparelho de seqüenciamento ABI-377-36 Autosequencer (Perkin-Elmer Biosystems Inc., Foster City, CA, E.U.A.).

3.4.6 Análise das seqüências

Os fragmentos seqüenciados foram comparados com o banco de dados de seqüências de DNA (GenBank), usando o programa BLAST (ZHANG e MADDEN, 1997). O agrupamento das seqüências para obtenção de consenso foi realizado com o programa SeqManTMII do pacote de software para análise de seqüências Lasergene DNASTAR (DNASTAR Inc., Madison, WI, E.U.A.). Contidos no mesmo pacote, os programas EditSeqTM e MapDrawTM foram utilizados para manipulação das seqüências e conversão entre DNA e proteína, e o programa MegAlignTM, para alinhamento entre as seqüências de genes *csp*. A análise comparativa das seqüências protéicas de diferentes CSPs foi realizada com o programa ClustalW2 (LARKIN et al., 2007), e o alinhamento foi processado com o programa GeneDoc (NICHOLAS; NICHOLAS JR.; DEERFIELD II, 1997). O peso molecular e o ponto isoelétrico (pI) da proteína CspC foram calculados por meio do servidor ExPASy (GASTEIGER et al., 2003).

3.5 Construção do mutante ΔC ($\Delta cspC::\Omega spec$)

Para deletar a região codificadora do gene *cspC*, as regiões flanqueadoras a montante e a jusante do gene foram amplificadas por PCR com os pares de oligonucleotídeos C3/C4 ou C1/C2, clonadas *in tandem* e o gene foi substituído por um cassete de resistência a espectinomicina e estreptomicina. Os fragmentos obtidos foram ligados ao vetor pNPTS138, gerando a construção pNPTS138($\Delta cspC::\Omega spec$) (ver Fig. 13). Este vetor foi introduzido em *C. crescentus* NA1000 por conjugação, e a deleção do gene ocorreu após dupla recombinação homóloga. As etapas para construção do mutante estão detalhadas a seguir.

3.5.1 Isolamento das regiões flanqueadoras de *cspC*

A reação de PCR e a clonagem das regiões flanqueadoras de *cspC* no vetor TOPO foram previamente realizadas em nosso laboratório por Elza Akie Sakamoto Lang. Cada um dos fragmentos flanqueadores de *cspC* foi isolado para subclonagem no vetor pBluescript KS. Um micrograma de uma minipreparação do vetor TOPO contendo o flanqueador a jusante de *cspC* (810 pb) foi digerido com *ApaI/EcoRI*. A digestão foi feita primeiramente com 10 U de *ApaI*, em tampão fornecido pelo

fabricante, a 30 °C por 2 horas, em um volume final de 60 µl. A seguir, foram adicionadas 10 U de *EcoRI* em tampão fornecido pelo fabricante, incubando-se a 37 °C por 2 horas. Oitocentos nanogramas de uma minipreparação do vetor TOPO contendo o flaqueador a montante do gene *cspC* (570 pb) foram digeridos com 10 U de *EcoRI* e 10 U de *PstI*, em tampão próprio da enzima *PstI*, num volume final de 60 µl. A digestão ocorreu a 37 °C por 2 horas.

Ambas as reações de digestão tiveram suas enzimas inativadas a 80 °C por 20 minutos, e foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TBE 1 X. O gel foi corado com brometo de etídeo e os fragmentos desejados foram cortados do gel e eletroeluídos em tampão TBE 0,5 X, a 100 V por 1 hora em membrana de diálise (Pierce Protein Research Products, Rockford, IL, E.U.A.). Os fragmentos foram purificados com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e precipitados com etanol, na presença de acetato de sódio 0,3 M e 10 µg de tRNA de levedura, a -20 °C por 16 horas ou a -80 °C por 1 hora. Os DNAs foram lavados com etanol 70%, secos e ressuspensos em 20 µl de TE contendo RNase A (20 µg/ml).

3.5.2 Subclonagem dos flaqueadores de *cspC* no vetor pBluescript KS

O vetor pBluescript KS foi digerido primeiramente com *ApaI* e *EcoRI* (5 U de cada), em um volume final de 20 µl, e as enzimas foram inativadas como acima. Foi realizada a ligação de 80 ng do vetor digerido com 160 ng do fragmento *ApaI/EcoRI* eletroeluído, com 1 U de T4 DNA ligase (Invitrogen) em tampão fornecido pelo fabricante. A reação de ligação foi feita à temperatura ambiente por 16 horas, e a seguir foi introduzida por eletroporação em *E. coli* DH5α, como no item 3.4.3, e as células foram semeadas em placa com meio LB ágar acrescido de ampicilina, X-gal e IPTG. Os clones tiveram os insertos confirmados através de digestão do DNA plasmidial com *ApaI/EcoRI*. Uma minipreparação positiva (500 ng) foi digerida com *EcoRI/PstI* (5 U de cada enzima, no tampão próprio de *PstI*), a fim de se efetuar a ligação com o fragmento eletroeluído do outro flaqueador do gene *cspC*.

A ligação foi realizada com 300 ng do vetor contendo o flaqueador a jusante de *cspC* e 600 ng do fragmento *EcoRI/PstI* eletroeluído (570 pb), e a reação ocorreu a 23 °C durante 1 hora. Esta ligação foi eletroporada em *E. coli* DH5α e as células foram semeadas como descrito acima.

Para confirmação dos clones positivos, foram realizadas minipreparações de DNA plasmidial de colônias brancas obtidas, com posterior digestão com *ApaI/PstI* a fim de identificar em gel de agarose a presença do inserto de 1380 pb (união do flankeador de 810 pb com o de 570 pb). Esta construção foi denominada pBluescript KS($\Delta cspC$).

3.5.3 Ligação do Ω spec com pBluescript KS($\Delta cspC$)

Oitocentos nanogramas do vetor pBluescript KS($\Delta cspC$) e do vetor pHP45 Ω foram digeridos com 5 U de *EcoRI* em tampão fornecido pelo fabricante, durante 2 horas a 37 °C. O cassete de resistência a estreptomicina e espectinomicina (Ω spec) foi isolado da digestão do vetor pHP45 Ω por eletroeluição (item 3.5.1). A ligação entre o vetor linearizado e o Ω spec foi feita com 480 ng e 900 ng, respectivamente, com 1 U de T4 DNA ligase (Invitrogen) em tampão fornecido pelo fabricante, na presença de ATP (0,5 mM). A reação de ligação foi feita à temperatura ambiente por 16 horas e foi utilizada para transformar *E. coli* DH5 α , como descrito no item 3.4.3. A cultura foi semeada em meio LB ágar acrescido de ampicilina, espectinomicina, estreptomicina, X-gal e IPTG. Os clones tiveram os insertos confirmados através de digestão do DNA plasmidial com *ApaI/PstI*. Uma destas digestões foi utilizada para isolar o fragmento contendo os flankeadores de *cspC* com o Ω spec inserido entre eles ($\Delta cspC::\Omega$ spec).

3.5.4 Isolamento de DNA com papel de cromatografia e ligação no vetor pNPTS138

A digestão acima foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8% e o gel foi corado com brometo de etídeo. Logo abaixo da banda que se desejava eluir, o gel foi cortado e foi colocado um pedaço de papel de cromatografia DE-81 (Whatman International Ltd., Maidstone, Kent, Reino Unido), e a eletroforese prosseguiu por mais 10 minutos, a fim de reter o DNA no papel. O DNA foi eluído do papel por 16 horas em uma solução de NaCl 1 M, Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) e EDTA 1 mM.

A eluição foi purificada com o mesmo volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1) e tratada com clorofórmio/álcool isoamílico (24:1) para retirar o excesso de fenol. O DNA foi precipitado com etanol a -80 °C por 1 hora e lavado com etanol 70%, seco e ressuspenso em 20 μ l de TE contendo RNase A (20 μ g/ml).

Novecentos nanogramas do fragmento isolado foram utilizados em uma ligação com 200 ng do vetor pNPTS138 digerido com *ApaI/PstI*, da mesma forma que o descrito no item 3.5.3. A cultura foi semeada em meio LB ágar acrescido de canamicina, espectinomicina e estreptomicina. Os transformantes foram confirmados através de digestão de seus DNAs plasmidiais com *ApaI/PstI* e visualização em gel de agarose.

3.5.5 Transformação de *E. coli* S17-1 e conjugação com *C. crescentus* NA1000

A minipreparação de pNPTS138($\Delta cspC::\Omega spec$) foi inserida em células de S17-1 por eletroporação, da mesma forma que no item 3.4.3, sendo semeadas em LB ágar acrescido de canamicina.

Células de *C. crescentus* NA1000 foram coletadas com alça de platina e semeadas em placas com meio PYE, incubando-se a 30 °C por 3 dias. As células de S17-1 transformadas foram misturadas a esta massa de células de NA1000, com o auxílio de uma alça de platina. A conjugação ocorreu durante 16 horas. Então, as células foram semeadas em placa PYE ágar contendo canamicina, espectinomicina, estreptomicina e ácido nalidíxico (o qual impede o crescimento de *E. coli*), e as placas foram incubadas a 30 °C durante cinco dias.

3.5.6 Reação de PCR para detecção da primeira recombinação

Colônias obtidas da conjugação acima tiveram seu DNA cromossômico extraído conforme o item 3.4.1. Estas minipreparações foram digeridas com *PstI* e 3 µl destas digestões foram utilizados como molde na reação de PCR. A reação foi feita com os oligonucleotídeos H3 e H4 (25 pmol de cada), 0,2 mM de uma mistura de dNTPs (Invitrogen), 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 5% de dimetilsulfóxido e 1 X tampão de PCR fornecido com a enzima. As condições de PCR foram de 95 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 70 °C por 30 segundos e 72 °C por 3 minutos. Após os ciclos, a reação permaneceu a 72 °C por 7 minutos e foi mantida a 4 °C. Em seguida, as reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em tampão de corrida TBE 1 X. O gel foi corado com brometo de etídeo.

3.5.7 Seleção da segunda recombinação

As linhagens obtidas na primeira recombinação foram inoculadas em meio PYE líquido sem antibiótico e foram incubadas durante 48 horas, a 30 °C, para permitir um segundo evento de recombinação homóloga. Alíquotas foram retiradas e semeadas em meio PYE ágar contendo sacarose (3%). Das colônias obtidas, 1200 foram passadas para PYE ágar contendo espectinomicina e estreptomicina para obter mais células e selecionar as colônias resistentes a estes antibióticos. Por fim, estas foram semeadas em PYE ágar contendo canamicina para selecionar aquelas que fossem sensíveis ao antibiótico.

Um recombinante sensível a canamicina teve seu DNA genômico extraído, digerido com *Pst*I e analisado por PCR, juntamente com amostras de DNA genômico de NA1000 e de um primeiro recombinante. A reação foi realizada como no item anterior, com os oligonucleotídeos C1 e CSPC-F, 10% de dimetilsulfóxido e temperatura de anelamento de 68 °C. A deleção no gene *cspC* também foi avaliada por *Western blot* (ver item 3.12).

3.6 Construção para complementação do mutante ΔC

O vetor pGEM contendo o fragmento de 1,5 kb com a região do gene *cspC* (descrito no item 3.4.4) foi digerido (750 ng) com *Eco*RI, num volume final de 60 μ l. A digestão foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1% e a banda de 1,5 kb foi isolada do gel como no item 3.5.4.

Setecentos nanogramas do vetor pMR20 foram digeridos com 5 U de *Eco*RI em tampão fornecido pelo fabricante, durante 2 horas a 37 °C. A ligação entre o vetor linearizado e o fragmento de 1,5 kb foi feita com 70 ng e 200 ng, respectivamente, como no item 3.5.3, e introduzida em *E. coli* DH5 α . A cultura foi semeada em meio LB ágar acrescido de tetraciclina, X-gal e IPTG. O clone positivo foi identificado por digestão do DNA plasmidial com *Eco*RI, o qual foi introduzido em *E. coli* S17-1 por eletroporação. Estas células transformadas foram misturadas com células de ΔC para ocorrer a conjugação. Após incubação da mistura de células em PYE ágar por 16 horas, estas foram semeadas em placas de PYE com tetraciclina e ácido nalidíxico e incubadas por cinco dias. As colônias obtidas foram passadas para meio PYE com tetraciclina, espectinomicina e estreptomicina.

As linhagens NA1000 e ΔC também foram conjugadas com o vetor pMR20 sem inserto, para fins de comparação com $\Delta C(\text{pMR20-}cspC)$ (mutante complementado) nos ensaios fenotípicos.

3.7 Ensaios fenotípicos

3.7.1 Ensaios de viabilidade

A determinação do efeito da baixa temperatura e da permanência em fase estacionária no crescimento e na sobrevivência das linhagens construídas foi realizada através de ensaios de viabilidade. Para o ensaio em fase estacionária, as linhagens NA1000(pMR20), $\Delta C(\text{pMR20})$ e $\Delta C(\text{pMR20-}cspC)$ foram crescidas em temperatura ótima (30 °C), sob agitação, em meio PYE com tetraciclina por uma noite. A seguir, as culturas foram diluídas num volume de 30 ml e, ao chegar a uma DO_{600} próxima a 0,15 (início da fase exponencial), tirou-se a primeira alíquota para contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs): em meio sólido PYE com tetraciclina, foram semeadas diluições seriadas das culturas (10^{-1} a 10^{-7}). As placas foram incubadas a 30 °C para crescimento das colônias, que foram contadas. Calculou-se a sobrevivência relativa como sendo a razão entre o número de UFCs obtido e o número de UFCs inicial, para evitar discrepâncias entre as linhagens quanto ao número inicial de UFCs. Além do ponto inicial, foram coletados pontos de 3, 6 e 9 horas de crescimento e também de 1, 2, 3, 4, 7, 10 e 14 dias de crescimento.

Para os ensaios de viabilidade sob choque frio, as linhagens NA1000(pMR20), $\Delta C(\text{pMR20})$ e $\Delta C(\text{pMR20-}cspC)$ foram diluídas para uma DO_{600} de 0,1 e incubadas a 30 °C até atingirem uma DO_{600} de aproximadamente 0,5. Neste momento, foi tomado o primeiro ponto para contagem de UFCs. As culturas, então, foram passadas para a temperatura de 10 °C e foram coletados pontos de 1, 2, 3, 6, 7 e 8 dias de crescimento a 10 °C.

3.7.2 Avaliação do crescimento e análise morfológica

O monitoramento do crescimento de culturas de NA1000 e ΔC , portando ou não o vetor pMR20, e $\Delta C(\text{pMR20-}cspC)$ foi feito através de medidas de absorbância a 600 nm, com o ponto inicial a uma DO_{600} próxima a 0,15 e pontos de 3, 6, 9, 24 e 48 horas

de crescimento. Para as linhagens sem plasmídeo, o monitoramento foi feito em meio líquido PYE; para aquelas portando o plasmídeo pMR20 (com ou sem inserto), em meio PYE líquido acrescido de tetraciclina.

A cada ponto de contagem de UFCs a 30 °C (ver item acima), foram preparadas lâminas de microscópio com amostras das culturas analisadas. Sobre uma lâmina de vidro, foram aplicados 15 µl de água MilliQ e acrescentou-se 0,5 µl da cultura apropriada. As lâminas foram colocadas em estufa para secagem da amostra e fixadas por calor. A observação foi feita em microscópio óptico (Eclipse E800, Nikon Instruments Inc., Melville, NY, E.U.A.), sob aumento de 40 X. Lâminas também foram preparadas desta forma para as linhagens incubadas a 10 °C, com um ponto de 2 horas e pontos de 1, 2, 3, 4, 7 e 8 dias.

3.8 Mapeamento da região regulatória de *cspC*

3.8.1 Reação de PCR e clonagem no vetor pRK*lacZ*290

A fim de amplificar fragmentos contendo deleções sucessivas da provável região regulatória de *cspC*, foi realizada uma reação de PCR com os pares de oligonucleotídeos H2/CSPC-G e H3/CSPC-G. Como molde, foram utilizados 800 ng do vetor TOPO + 1,2 kb. As reações continham 50 pmol de cada oligonucleotídeo, 0,2 mM de uma mistura de dNTPs (Invitrogen), 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 5% de dimetilsulfóxido e 1 X tampão PCR fornecido com a enzima. As condições de PCR foram de 94 °C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 54 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. Após os ciclos, a reação permaneceu a 72 °C por 7 minutos e foi mantida a 4 °C. Os produtos de PCR foram purificados com o QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), segundo instruções do fabricante.

Os produtos de PCR foram clonados no vetor pGEM e a clonagem foi introduzida em células de *E. coli* DH5α, as quais foram semeadas em meio LB ágar contendo ampicilina, X-gal e IPTG. Os clones tiveram os insertos confirmados através de digestão do DNA plasmidial com *Bam*HI/*Eco*RI e seqüenciamento. O fragmento H3/CSPC-G foi isolado como no item 3.5.4 e 300 ng foram utilizados em uma ligação com o vetor pRK*lacZ*290 digerido com *Bam*HI/*Eco*RI (50 ng), como descrito em 3.5.3. O vetor pGEM contendo o fragmento H2/CSPC-G foi digerido com as mesmas enzimas e utilizado diretamente em uma ligação com pRK*lacZ*290 digerido (1 µg e 200 ng,

respectivamente). As ligações foram introduzidas em *E. coli* DH5 α e as células foram semeadas em LB ágar acrescido de tetraciclina.

3.8.2 PCR para detectar insertos no vetor pRKlacZ290

Nesta reação de PCR, os oligonucleotídeos utilizados [LacZup e M13 Forward (-20)] amplificam o sítio múltiplo de clonagem do vetor pRKlacZ290. Quando não há fragmento clonado, o resultado da reação de PCR é um fragmento de 150 pb. Quando há inserto clonado, o resultado da reação é um fragmento de 150 pb mais o tamanho do inserto.

O DNA plasmidial de cada colônia obtida com as transformações acima foi extraído para servir como molde no PCR. A reação foi realizada com os oligonucleotídeos acima, como no item 3.4.2, alterando-se somente a concentração de dimetilsulfóxido (5%) e a temperatura de anelamento (55 °C).

3.8.3 Confirmação das construções e conjugação com *C. crescentus* NA1000

A confirmação das construções no vetor pRKlacZ290 ($P_{cspC}/lacZ$, $P_{H2}/lacZ$ e $P_{H3}/lacZ$) foi obtida através do seqüenciamento de DNA do fragmento clonado. Os clones tiveram seus DNAs plasmidiais extraídos com o Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) para reação de seqüenciamento de DNA com os oligonucleotídeos M13 Forward (-20) ou LacZup.

As construções corretas foram introduzidas em *E. coli* S17-1, para conjugação desta com NA1000. As células foram semeadas em meio PYE ágar acrescido de tetraciclina e ácido nalidíxico.

3.8.4 Ensaio de atividade de β -galactosidase

O ensaio de atividade de β -galactosidase foi realizado segundo Miller (1972). Células da linhagem NA1000, contendo o plasmídeo pRKlacZ290 com inserto com a região promotora de interesse e pRKlacZ290 sem inserto, foram inoculadas em meio PYE contendo tetraciclina e incubadas a 30 °C durante a noite. Estas culturas foram diluídas para uma DO₆₀₀ inicial de 0,1 e incubadas a 30 °C até uma DO₆₀₀ de aproximadamente 0,5.

Em um tubo, foram adicionados 800 µl de tampão Z (Na₂HPO₄.7H₂O 60 mM; NaH₂PO₄.H₂O 40 mM; KCl 10 mM; MgSO₄.7H₂O 1 mM; β-mercaptoetanol 50 mM), 50 µl de cada cultura e 100 µl de clorofórmio, sendo o tubo agitado brevemente e incubado por 5 minutos a 30 °C. A seguir, foram adicionados 200 µl de ONPG (O-nitrofenil-β-D-galactosídeo 4 mg/ml; tampão fosfato de potássio pH 7,0 100 mM) ao tubo, que foi agitado e incubado a 30 °C por 5 minutos exatos. Em seguida, a reação foi interrompida com 400 µl de Na₂CO₃ 1 M e a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 13000 x g. A fase aquosa foi retirada para leitura da absorbância a 420 nm e a absorbância das culturas foi lida a 600 nm. As unidades de atividade de β-galactosidase foram calculadas da seguinte forma: Unidades = 1000 x [A₄₂₀ / (T x V x A₆₀₀)], onde T = tempo em minutos e V = volume de células em ml.

Os ensaios de cada cultura foram realizados em triplicata, e foram repetidos após 24 e 48 horas em fase estacionária.

3.9 Ensaios de atividade da região promotora em diferentes condições nutricionais

3.9.1 Expressão de *cspC* em diferentes meios de cultura

Para se avaliar a expressão do gene em diferentes meios de cultura, células de NA1000(*P_{cspC}/lacZ*) e NA1000(*P_{H2}/lacZ*) foram inoculadas nos meios indicados na tabela 2, diluídas para uma DO₆₀₀ de 0,1 e, ao chegar a uma DO₆₀₀ próxima a 0,5, tiveram a expressão do gene *cspC* avaliada por ensaios de atividade de β-galactosidase. Os ensaios foram repetidos após 6, 24 e 48 horas.

3.9.2 Ensaios de carência nutricional

A expressão do gene *cspC* também foi avaliada frente à carência total de glicose ou nitrogênio. Culturas de NA1000(*P_{cspC}/lacZ*) foram crescidas em meio M2 durante a noite, diluídas para uma DO₆₀₀ de 0,05 e, ao chegar a uma DO₆₀₀ igual a 0,3 (meio da fase exponencial), foram submetidas à carência de nitrogênio ou glicose. Para isso, as culturas foram centrifugadas e ressuspendidas em meio M2 (controle), M2 sem glicose e M2 sem NH₄Cl e crescidas durante 24 horas. A atividade do promotor de *cspC* à frente do gene repórter *lacZ* foi determinada através de ensaios de atividade de β-galactosidase, nas primeiras 3 horas de crescimento.

3.10 Expressão de *cspC* e *cspD* em *E. coli*

3.10.1 Amplificação dos genes e clonagens

O vetor pGEM contendo o fragmento de 1,5 kb com a região do gene *cspC* (descrito no item 3.4.4) foi utilizado como molde para amplificar somente o gene. Aos 25 ng de molde, foram adicionados 25 pmol de cada oligonucleotídeo (H1 e CSPC-C), 0,2 mM de uma mistura de dNTPs (Invitrogen), 1,25 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen), 1,5 mM de MgCl₂, 5% de dimetilsulfóxido e 1 X tampão PCR fornecido com a enzima. As condições de PCR foram de 95 °C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 65 °C por 30 segundos e 72 °C por 3 minutos. Após os ciclos, a reação permaneceu a 72 °C por 7 minutos e foi mantida a 4 °C.

O fragmento amplificado foi purificado com o QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN), subclonado no vetor pGEM e introduziu-se a clonagem em *E. coli* DH5 α como no item 3.4.3. Os clones positivos foram determinados por digestão com *EcoRI/HindIII* e o fragmento foi isolado conforme o item 3.5.4, para ligação com o vetor de expressão pProEX HTa digerido com as mesmas enzimas (400 ng e 50 ng, respectivamente).

O gene *cspD* foi amplificado e isolado por Elza Akie Sakamoto Lang. Foi realizada a subclonagem do fragmento no vetor pGEM e os positivos foram determinados por digestão com *BamHI/EcoRI*. A ligação no vetor pProEX HTc digerido com as mesmas enzimas foi feita com 200 ng deste e 600 ng de fragmento, conforme o item 3.5.3.

3.10.2 Indução da expressão de *cspC* e *cspD*

As construções pProEX HTa(*cspC*) e pProEX HTc(*cspD*) foram utilizadas para indução da expressão dos respectivos genes, através da adição de IPTG ao meio de cultura. Culturas de *E. coli* DH5 α contendo uma construção ou outra foram incubadas durante a noite a 37 °C, sendo diluídas para uma DO₆₀₀ de 0,15. Ao atingir uma densidade óptica de aproximadamente 0,5, uma alíquota de cada cultura (1 ml) foi retirada como controle e foi adicionado IPTG ao restante da cultura (para concentração final de 0,5 mM). A indução ocorreu a 30 °C durante 3 horas, sendo retirada uma alíquota da cultura (1 ml) ao final deste período.

As alíquotas retiradas foram centrifugadas por 5 minutos para baixar as células, e estas foram ressuspensas em solução O 2 X (Tris base 0,62 mM; SDS 10%; DTT 0,01 mM; glicerol 0,2%; azul de bromofenol 0,01%; pH 6,8). O volume de solução O 2 X foi 50 µl para o ponto inicial e, para o ponto de indução, o volume foi calculado com base na densidade óptica que a cultura atingiu no ponto considerado.

As amostras acima foram fervidas por 3 minutos para desnaturação das proteínas e centrifugadas por 5 minutos para separação das impurezas. Do sobrenadante, foram retirados 10 µl para aplicação em gel de poliacrilamida-SDS 12%, e procedeu-se à eletroforese com voltagem constante a 200 V, por 45 minutos. Utilizou-se o padrão de peso molecular Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen). As proteínas foram visualizadas após coloração do gel com solução de Coomassie Blue R-250 0,05% em metanol 50% e ácido acético 10%, e descoloração do fundo com solução Destain (ácido acético 7%; metanol 5%).

3.10.3 Purificação das proteínas CspC e CspD

Culturas de 500 ml de *E. coli* DH5α superexpressando *cspC* ou *cspD* foram centrifugadas, e o precipitado foi ressuspendido em 12 ml de tampão de lise para sonicação (Tris-HCl pH 8,5 50 mM; β-mercaptoetanol 5 mM; PMSF 1 mM). As amostras foram então submetidas a sonicação, com 7 pulsos de 15 segundos cada. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 9000 x g e 4 °C, por 30 minutos. O sobrenadante foi separado do precipitado e ambos foram armazenados a -20 °C. Dez microlitros do sobrenadante foram misturados ao mesmo volume de solução O 2 X, fervendo-se por 3 minutos e centrifugando-se por 5 minutos. O precipitado foi ressuspendido em 30 µl de solução O 2 X e igualmente fervido e centrifugado. Ambos foram aplicados em gel de poliacrilamida-SDS 12% (10 µl) para avaliar a localização da proteína superexpressa.

As proteínas foram purificadas através de cromatografia de afinidade em resina de níquel. A resina (QIAGEN) foi equilibrada quatro vezes, no dobro de volume de tampão A (Tris-HCl pH 8,5 20 mM; KCl 100 mM; β-mercaptoetanol 5 mM; glicerol 10%) com 20 mM de imidazol, homogeneizada no gelo por 5 minutos e centrifugada por 1 minuto a 4 °C e 10000 x g. A resina equilibrada foi adicionada ao sobrenadante obtido da sonicação (1 ml para cada 250 ml da cultura original). A suspensão foi incubada a 4 °C sob agitação, por no mínimo 20 minutos, e centrifugada por 1 minuto a

4 °C e 10000 x g. A resina foi transferida para outro tubo e lavada com tampão A com 50 mM de imidazol por 4 vezes. A seguir, as proteínas foram eluídas da suspensão com tampão A com concentrações sucessivamente maiores de imidazol (100, 200, 300, 400 e 500 mM).

3.11 Obtenção dos anticorpos policlonais anti-CspC e anti-CspD

Foram utilizadas duas coelhas fêmeas de aproximadamente dois meses de idade, da raça Nova Zelândia. Após 2-3 semanas de observação e a constatação de não haver nenhum processo inflamatório ou infeccioso com os coelhos, foram previamente retirados 5 ml de sangue pela veia marginal da orelha para a obtenção dos soros pré-ímmunes. Os coelhos foram imunizados através de injeções subcutâneas das proteínas purificadas (item 3.10.3), com 1,5 ml de adjuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil) na primeira dose e 1,5 ml de adjuvante incompleto de Freund (Sigma) nas doses seguintes, totalizando 3 ml por dose.

Foram aplicadas três injeções subcutâneas da proteína CspC purificada: a primeira dose continha 800 µg de proteína. Aplicou-se a segunda dose após 28 dias, com 550 µg de CspC. A terceira dose foi dada após oito dias, com 320 µg de CspC. A coleta para teste do soro foi realizada três dias após a última injeção.

A proteína CspD purificada foi aplicada em quatro doses no segundo coelho: a primeira continha 50 µg, a segunda 320 µg (após 29 dias), a terceira 230 µg (após 7 dias) e a quarta 210 µg (após 6 dias). As coletas para teste do soro foram realizadas 3-4 dias após as últimas injeções.

Quando o título do soro imune mostrou-se satisfatório em ensaios de *Western blot* (item 3.12), foi feita a sangria total do coelho. O soro proveniente da sangria foi alíquotado e congelado a -80 °C.

Todos os procedimentos foram realizados conforme as normas do Comitê de Ética Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

3.12 *Western blot*

3.12.1 Extração de proteínas

Culturas de NA1000, ΔC , $\Delta C(pMR20-cspC)$, ΔD (LANG e MARQUES, 2004), ΔABD (R. R. Mazzon, resultados não publicados) e $\Delta spoT$ (C. A. P. T. Silva e R. R. Mazzon, resultados não publicados) foram crescidas a 30 °C em meio PYE. Todas as culturas foram diluídas para uma DO_{600} igual a 0,1, e tiveram as proteínas totais extraídas ao chegar a uma DO_{600} próxima de 0,5 e após 48 horas de crescimento.

Para a extração, foi adicionado diretamente a alíquotas da cultura ácido tricloroacético (TCA), numa concentração final de 12,5%. Após 30 minutos incubando-se no gelo, as amostras foram centrifugadas a 4 °C por 30 minutos e 10000 x g, sendo o precipitado de proteínas lavado com acetona por três vezes para remoção do excesso de TCA. O precipitado foi seco e armazenado a -20 °C. A quantificação das proteínas foi feita pelo método de Bradford (1976), em solução O 2 X sem azul de bromofenol.

3.12.2 Ensaios de *immunoblot*

As proteínas extraídas e quantificadas no item acima foram ressuspendidas em solução O 2 X, e 25 µg de cada amostra foram aplicados em gel de poliacrilamida-SDS 12%, utilizando o padrão de peso molecular Bench Mark Prestained Protein Ladder (Invitrogen). A eletroforese ocorreu a 200 V, por 45 minutos. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para filtros de nitrocelulose por 1 hora a 4 °C, aplicando-se uma corrente de 250 mA.

O procedimento de *Western blot* utilizado foi o descrito por Towbin; Staehelin; Gordon (1979). Os filtros de nitrocelulose foram corados por 10 minutos com solução de Ponceau (Ponceau S 0,1% em ácido acético 10%) e incubados sob agitação suave por uma hora em TBS (Tris-HCl pH 8,0 10 mM; NaCl 150 mM) contendo 5% de leite desnatado para saturar possíveis ligações inespecíficas. Os filtros foram então incubados por aproximadamente 16 horas com o anti-soro diluído (1:1000 para anti-CspC; 1:50 para anti-CspD) em TBSTT (Tris-HCl pH 8,0 10 mM; NaCl 150 mM; Tween 20 0,03%; Triton X-100 0,02%), sem adição de leite. Em seguida, foram lavados por 30 minutos, trocando-se a solução a cada 5 minutos. As quatro primeiras lavagens foram feitas em TBST (Tris-HCl pH 8,0 10 mM; NaCl 150 mM; Tween 20 0,05%) e a última

em TBS. Os filtros foram então incubados por 16 horas a 4 °C com o anticorpo anti-coelho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma), com diluição de 1:5000 em TBS contendo 5% de leite, e os filtros foram lavados como acima. A revelação foi feita utilizando-se NBT 0,5 mg/ml e BCIP 0,15 mg/ml em tampão de fosfatase alcalina (Tris-HCl pH 9,5 100 mM; MgCl₂ 5 mM; NaCl 100 mM), e a reação foi interrompida com a adição de TE. Todos os filtros de um mesmo experimento foram revelados durante o mesmo tempo.

3.13 Eletroforese bidimensional

3.13.1 Preparação das amostras

Culturas de NA1000 e ΔC incubadas em PYE por uma noite a 30 °C foram diluídas para uma DO₆₀₀ próxima a 0,15, e uma alíquota de 10 ml de cada cultura foi retirada após 48 horas de crescimento. Estas alíquotas foram centrifugadas e cada precipitado de células foi ressuspenso em 3 ml de tampão de lise para sonicação contendo coquetel inibidor de protease (Sigma). As amostras foram submetidas a sonicação, com 3-4 pulsos de 15 segundos cada. As amostras foram centrifugadas a 5000 x g e 4 °C, por 45 minutos.

Os sobrenadantes foram precipitados com acetona para maior concentração das proteínas. Para isso, acrescentaram-se três volumes de acetona gelada às amostras, que permaneceram a 4 °C por quatro horas. Em seguida, elas foram centrifugadas como acima, e cada precipitado de proteínas foi seco e ressuspenso em 600 µl de tampão de solubilização (uréia 6 M; Triton X-100 0,1%; Tris base 40 mM) para quantificação de proteínas pelo método de Bradford (1976).

3.13.2 Focalização isoeétrica (primeira dimensão)

Foram coletados 200 µg de cada amostra para re-hidratar as tiras de gel de primeira dimensão (Immobiline DryStrip Gels, pH 4-7 linear, 13 cm, GE Healthcare do Brasil Ltda., São Paulo, SP, Brasil). O volume de amostra para re-hidratação foi completado para 250 µl com DeStreak Rehydration Solution (GE Healthcare) contendo DTT 20 mM e IPG Buffer (GE Healthcare) da mesma faixa de pH das tiras, numa

concentração de 2%. As tiras de gel foram imersas na solução contendo a amostra e re-hidratadas por 16 horas.

A focalização isoeétrica ocorreu a temperatura constante (20 °C), utilizando-se da unidade de eletroforese Multiphor II (GE Healthcare) e respectivos acessórios. A focalização seguiu o programa indicado na tabela 5, em modo de gradiente.

Tabela 5. Programa de voltagens da focalização isoeétrica.

Fase	Voltagem	Amperagem	Watts	Tempo
Fase 1	150 V	2 mA	5 W	2h
Fase 2	300 V	2 mA	5 W	30min
Fase 3	3500 V	2 mA	5 W	1h 30min
Fase 4	3500 V	2 mA	5 W	4h 20min

3.13.3 Segunda dimensão

Logo antes da separação das proteínas por massa molecular (segunda dimensão), as tiras de gel de primeira dimensão foram tratadas à temperatura ambiente com tampão de equilíbrio (Tris-HCl pH 8,8 50 mM; uréia 6 M; glicerol 30%; SDS 2%) contendo DTT (10 mg/ml) por 15 minutos, seguido de incubação em tampão de equilíbrio contendo iodoacetamida (25 mg/ml).

As tiras de primeira dimensão foram aplicadas sobre géis homogêneos de poli(acrilamida)-SDS 12,5% de 0,8 mm de espessura. Utilizou-se o marcador de peso molecular Page Ruler Unstained Protein Ladder (Fermentas International Inc., Burlington, Ontario, Canadá). A eletroforese seguiu a 30 mA constantes para cada gel.

3.13.4 Coloração dos géis

A coloração dos géis foi feita com Coomassie Blue G-250. Os géis foram incubados três vezes em solução fixadora (etanol 30%; ácido fosfórico 2%), por 30 minutos, e então lavados três vezes com ácido fosfórico 2%, por 20 minutos. A seguir,

foi adicionada solução pré-revelação (ácido fosfórico 2%; etanol 18%; sulfato de amônio 15%), por 30 minutos, e então se adicionou 1% de solução de Coomassie Blue G-250 (Coomassie Blue G-250 2%; azida sódica 0,02%). Os géis foram corados durante 24-48 horas e o fundo foi descorado com água destilada. O volume das soluções utilizadas para cada gel foi de 250 ml.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Análise da seqüência do gene *cspC* de *Caulobacter crescentus*

De acordo com a anotação do GenBank, o quadro aberto de leitura correspondente ao gene *cspC* de *C. crescentus* NA1000 (CCNA_02705) teria 210 nucleotídeos. Nesse caso, a amplificação da região do genoma compreendida entre os oligonucleotídeos C1 e CSPC-F geraria um produto de cerca de 1,2 kb (Fig. 7). Porém, ao se tentar amplificar esta região do DNA genômico da linhagem NA1000, foi obtida reprodutivelmente uma banda de aproximadamente 1,5 kb (Fig. 8). Este fragmento foi clonado no vetor pGEM e cinco clones foram seqüenciados, revelando que se tratava realmente da região compreendendo o gene *cspC*, sendo que este mostrou possuir uma seqüência maior do que a originalmente anotada.

Na figura 9, está representado o resultado de uma busca no programa BLAST pelo consenso das seqüências obtidas. A região que apresentou maior similaridade foi realmente a do gene *cspC* de *C. crescentus* NA1000, e a segunda maior similaridade foi com a mesma região de *C. crescentus* CB15, linhagem da qual NA1000 é derivada (EVINGER e AGABIAN, 1977). No entanto, em ambos os casos, existe uma falha de similaridade no meio da seqüência, condizente com a existência de um novo elemento nesse local. A terceira maior similaridade foi com um gene que codifica uma proteína de domínio de choque frio de *Caulobacter* sp. K31 (MÄNNISTÖ et al., 1999), anotado no GenBank com o nome Caul_3723. A anotação desta proteína apresenta um arranjo duplo de CSDs, o que foi visto, em eubactérias, apenas em proteobactérias da subdivisão alfa, como descrito para CspD de *C. crescentus* (LANG e MARQUES, 2004). A similaridade da região de *cspC* com a de Caul_3723 não apresenta falhas, sendo uma forte evidência de que CspC também apresentaria dois CSDs, o que não era previsto pela anotação existente do gene.

A comparação da nova seqüência de *cspC* com a seqüência de Caul_3723 está apresentada na figura 10. Existe um alto grau de identidade entre os dois genes, e estes só apresentam grandes diferenças entre si na região do *linker*, entre os dois domínios CSD da proteína codificada por Caul_3723. Pode-se estabelecer, portanto, que CspC também possui dois domínios CSD, em vez de um. Baseando-se na seqüência de DNA proposta para o gene *cspC* de *C. crescentus* NA1000, foi obtida uma nova estrutura primária para a proteína CspC, muito similar à codificada por Caul_3723 e menos

similar à paróloga CspD (Fig. 11). Entretanto, os domínios são conservados entre as três proteínas, ao contrário da região do *linker*, que possivelmente apresenta menor pressão seletiva para sua conservação. Trata-se de mais uma evidência do alto grau de conservação dos domínios CSD, como revisto por Graumann e Marahiel (1998). Ainda se desconhece a razão da ocorrência do arranjo duplo de CSDs em α -proteobactérias; tendo em vista que algumas proteínas de choque frio bacterianas formam dímeros *in vitro* (YAMANAKA et al., 2001; SCHINDELIN; MARAHIEL; HEINEMANN, 1993), pode-se especular que a dimerização seria assegurada codificando-se os dois CSDs no mesmo polipeptídeo. Em eucariotos, proteínas contendo domínios CSD geralmente possuem outros domínios distintos associados, mas existe uma proteína de mamíferos, denominada UNR, que contém exclusivamente cinco domínios CSD (GRAUMANN e MARAHIEL, 1998). Esta estrutura modular de UNR permite a interação com RNA e com um fator de transcrição, sendo que este último tipo de interação requer no mínimo dois CSDs (JACQUEMIN-SABLON et al., 1994; LESHKOWITZ et al., 1996).

A figura 12 mostra o novo consenso proposto para a região codificadora do gene *cspC*. Comparando-se a seqüência proposta com a seqüência anotada, percebe-se que a anotada corresponde a uma proteína com apenas um domínio CSD. A seqüência proposta, no entanto, mostra que CspC possui realmente dois domínios CSD unidos por um *linker*, além de duas repetições diretas perfeitas, sendo que apenas uma delas aparece na seqüência anotada. Pode-se presumir, portanto, que seria possível ocorrer recombinação homóloga internamente ao gene *cspC*, resultando na perda da seqüência codificadora do segundo domínio CSD e fazendo com que o gene possua apenas 210 nucleotídeos, em vez de 531. A anotação do gene, assim, pode ter sido feita com o gene recombinante, em vez do gene íntegro. A presença das repetições pode também ter ocasionado problemas na montagem das seqüências pelos programas de análise utilizados, quando do seqüenciamento do genoma completo das linhagens CB15 e NA1000 de *C. crescentus*.

Deve-se ressaltar que as tentativas de construção do mutante $\Delta cspC::\Omega spec$ (descritas abaixo) foram iniciadas quando ainda se acreditava que o gene possuía 210 nucleotídeos, em vez de 531. Assim, procurou-se, primeiramente, padronizar as reações de PCR para detecção da primeira recombinação de forma a amplificar bandas de tamanho esperado menor do que o real. Foram testadas várias temperaturas de anelamento, quantidades de ciclos, concentrações de dimetilsulfóxido e tempos de extensão, porém sempre era obtida uma banda maior do que o esperado (dados não

mostrados). Com isso, surgiu a hipótese de que o gene teria uma seqüência maior, o que foi confirmado por seqüenciamento e análise comparativa com outras proteínas de arranjo duplo de CSDs. Entretanto, em algumas reações de PCR utilizando os oligonucleotídeos CSPC-E e CSPC-F e DNA genômico de NA1000 como molde, houve amplificação de uma banda minoritária de 1,2 kb, como o esperado para o gene *cspC* recombinante, além da banda de 1,5 kb (dados não mostrados). Esta observação também ocorreu em estudos anteriores (LANG, 2007²), quando se confirmou por seqüenciamento que a banda de tamanho menor correspondia ao gene *cspC* assim como está anotado. Logo, corrobora-se a hipótese de que as repetições existentes dentro do gene *cspC* possam promover a recombinação deste, de forma a produzir uma seqüência aproximadamente 300 bases menor do que a real.

A possibilidade de recombinação intragênica em *cspC* de *C. crescentus* pode ter paralelo com o gene *cspC* de *E. coli*, que apresenta um alto grau de diversidade genética. Esta diversidade inclui um amplo espectro de variações possíveis que incluem elementos de inserção, deleção e mutação pontual (RATH e JAWALI, 2006). Um aumento do *fitness* é observado nas linhagens de *E. coli* que perderam a expressão de *cspC* por qualquer uma das variações citadas acima, em relação à linhagem selvagem. Estas observações são interpretadas como uma evidência de seleção para a perda da expressão de *cspC* em *E. coli*, já que genes similares como *cspA* e *cspE* não apresentam a mesma variabilidade genética. Tendo em vista que *cspC* de *E. coli* está envolvido na regulação da expressão do fator σ^S (PHADTARE e INOUE, 2001), Faure et al. (2004) argumentaram que mutações em genes que regulam σ^S podem promover uma vantagem seletiva, já que alelos não funcionais de σ^S conferem vantagens no crescimento e proliferação das células. Estas vantagens no crescimento, entretanto, seriam contrabalançadas por uma redução na sobrevivência em condições nutricionais limitantes e na resistência a estresses, fenômeno denominado pleiotropia antagônica (NYSTRÖM, 2004). Entretanto, deve-se ressaltar que o gene *cspC* de *E. coli* não possui a estrutura de dois CSDs, e não se sabe se este gene e *cspC* de *C. crescentus* são ortólogos funcionais.

² LANG, E. A. S. São Paulo, 2007 (comunicação pessoal).

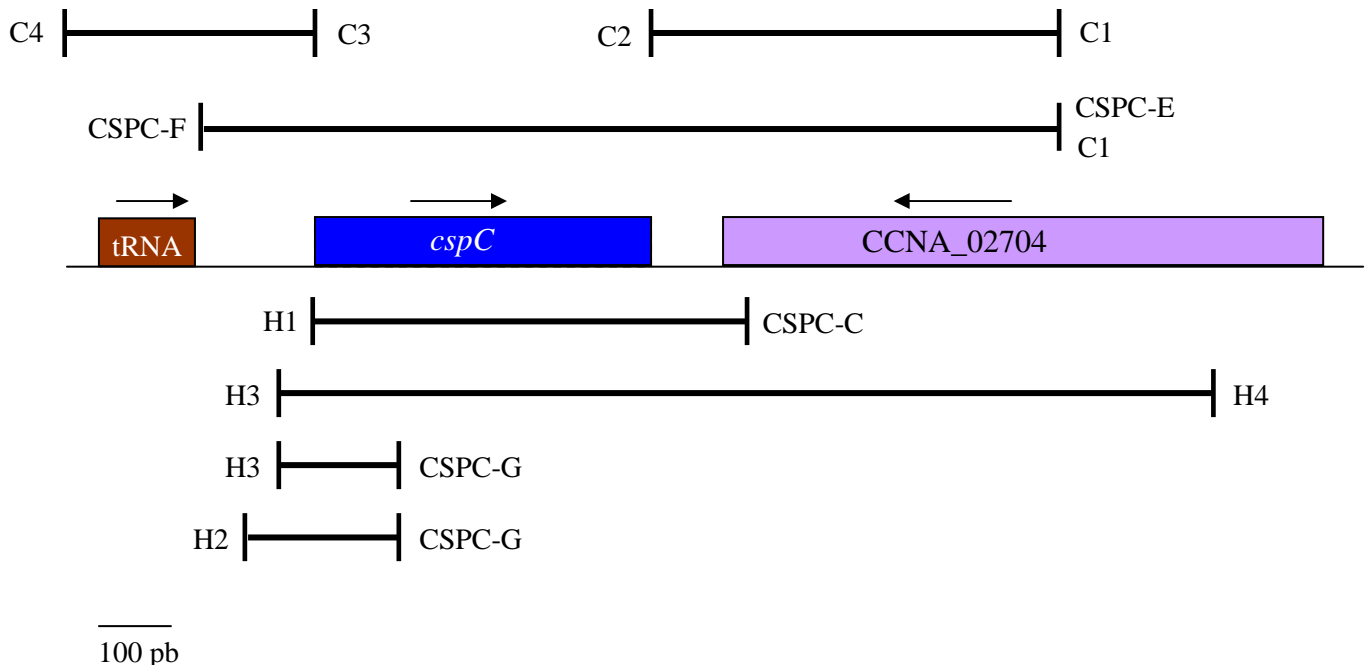


Figura 7. Posição dos fragmentos amplificados por PCR neste trabalho, em relação à região do genoma de *C. crescentus* NA1000 que contém o gene *cspC*. As setas indicam o sentido de transcrição dos genes. O gene *cspC* está indicado pela caixa azul. As caixas marrom e lilás representam genes codificando um RNA transportador e uma enzima málica dependente de NADP, respectivamente. As barras indicam o tamanho relativo e a posição dos fragmentos amplificados por PCR em relação a esta porção do genoma de NA1000. De cada lado das barras, estão os oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos: C1, C2, C3 e C4 foram os oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos flancos de *cspC*; CSPC-E e CSPC-F foram aqueles utilizados para clonagem da região contendo o gene *cspC* no vetor TOPO. C1 e CSPC-F foram os oligonucleotídeos mais externos utilizados para determinação da sequência real de *cspC*, avaliação da ocorrência da segunda recombinação homóloga e complementação do mutante ΔC ; H1 e CSPC-C, os oligonucleotídeos mais internos utilizados para determinação da sequência real de *cspC* e clonagem em fase no vetor pProEX; H3 e H4, para detecção da primeira recombinação; H2, H3 e CSPC-G, para mapeamento da região promotora de *cspC*.

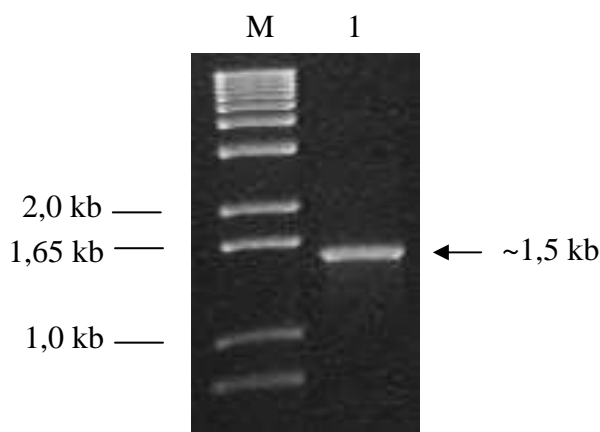


Figura 8. Reação de PCR com os oligonucleotídeos C1 e CSPC-F. De acordo com o quadro aberto de leitura de *cspC* anotado no GenBank, a amplificação da região entre C1 e CSPC-F, a partir de DNA genômico de *C. crescentus* NA1000, resultaria em um fragmento de cerca de 1,2 kb. Porém, foi obtida uma clara banda de aproximadamente 1,5 kb utilizando os mesmos oligonucleotídeos (canaleta 1). Este fragmento foi clonado no vetor pGEM para seqüenciamento. Ver texto para maiores detalhes. M indica o marcador de peso molecular.

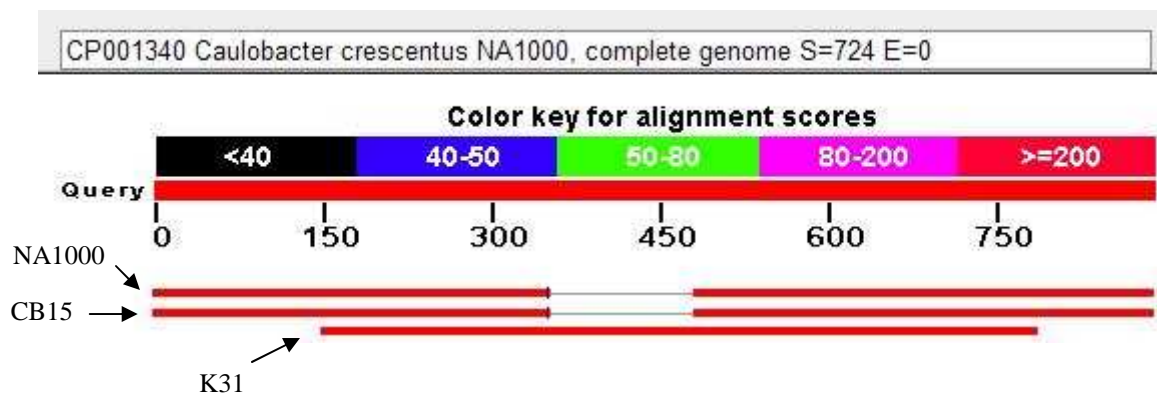


Figura 9. Resultados da busca por seqüências similares ao consenso de 1,5 kb com o programa BLAST. O consenso obtido pelo seqüenciamento do fragmento de 1,5 kb corresponde realmente à região do gene *cspC* de *C. crescentus* NA1000. A falha de similaridade, no meio da seqüência, indica a presença de um elemento novo, inserido no fim da seqüência anotada de *cspC*. O mesmo padrão de similaridade é observado com relação ao gene *cspC* de *C. crescentus* CB15. A terceira maior similaridade, denotada por K31, é com um gene codificando uma proteína de domínio de choque frio de *Caulobacter* sp. K31, que apresenta dois CSDs.

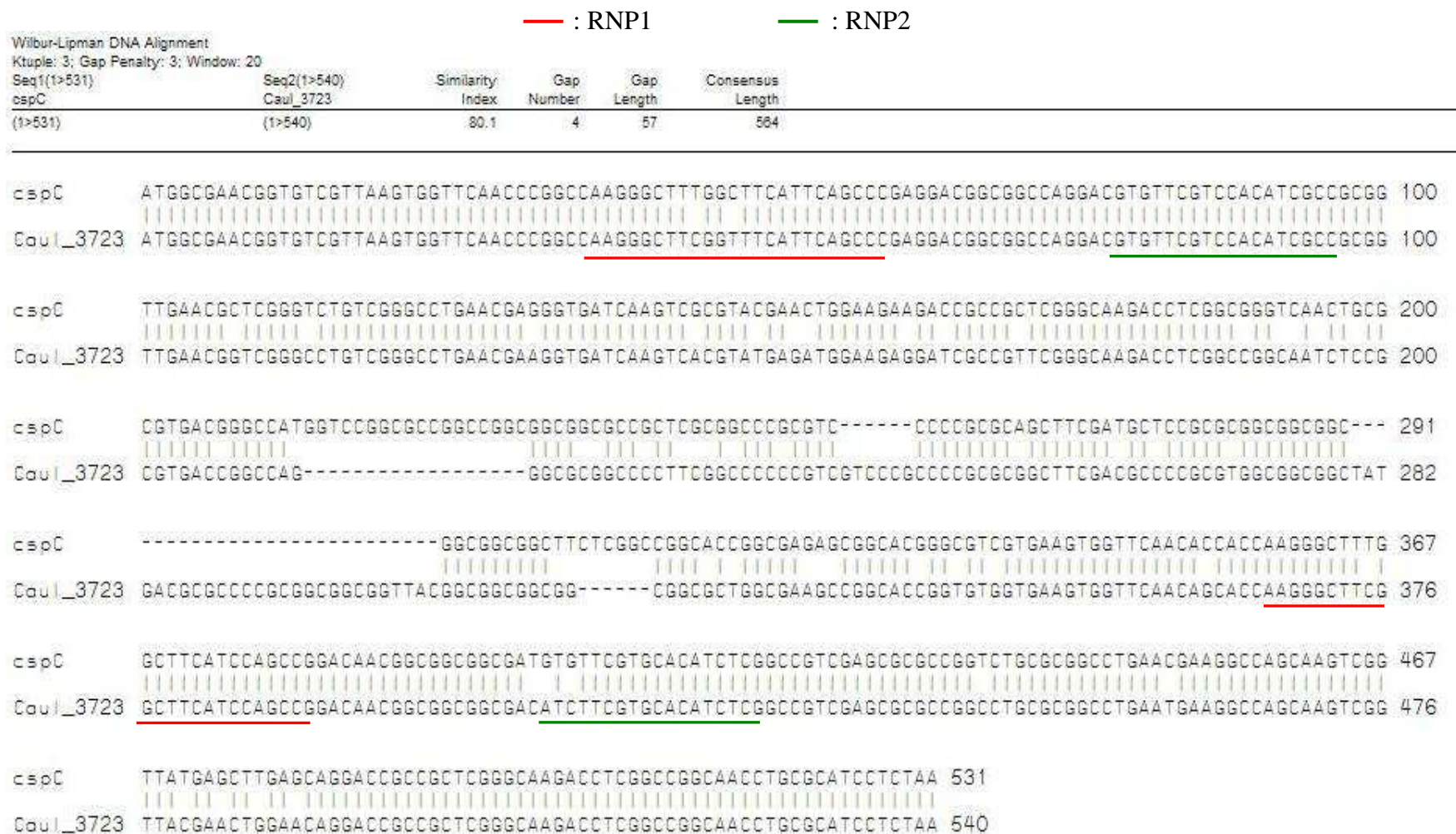


Figura 10. Alinhamento entre as regiões codificadoras dos genes *cspC* de *C. crescentus* NA1000 e *Caul_3723* de *Caulobacter* sp. K31. Os traços verticais indicam os nucleotídeos idênticos presentes nos dois genes. Os traços horizontais indicam regiões de espaçamento no alinhamento dos dois genes. As seqüências correspondentes aos motivos de ligação a ácidos nucléicos, RNP1 e RNP2, de cada domínio CSD de *Caul_3723* estão demarcados em vermelho e verde, respectivamente. Os genes foram alinhados utilizando o programa MegAlign™.

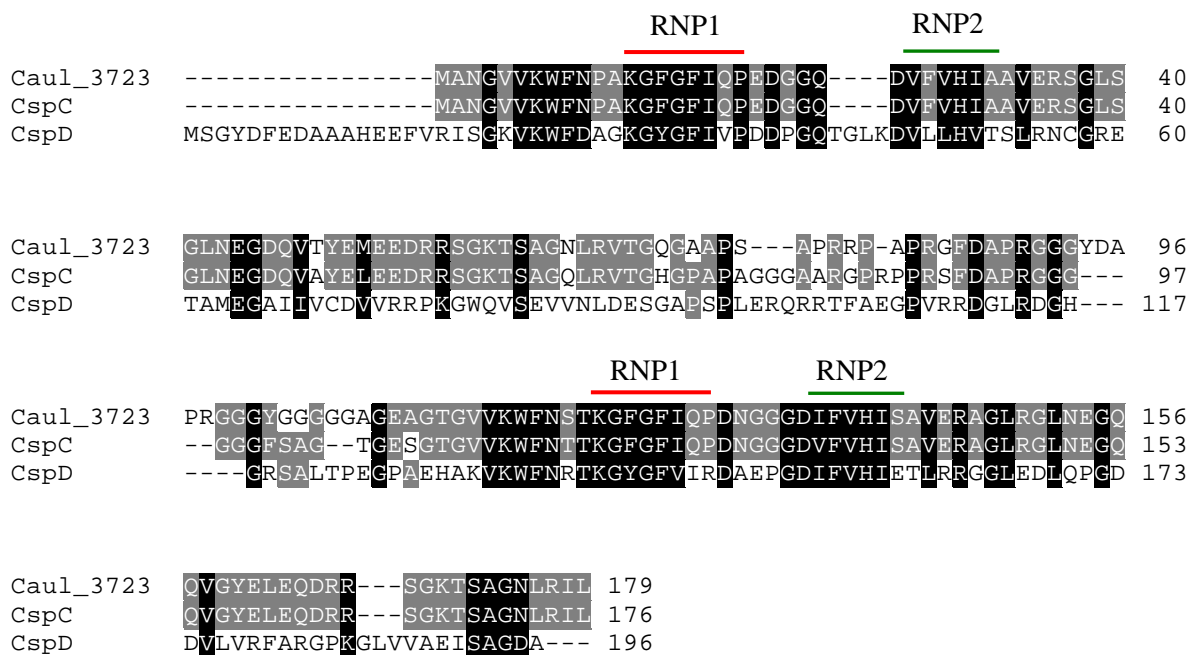


Figura 11. Alinhamento entre as proteínas CspC e CspD de *C. crescentus* NA1000 e a proteína codificada pelo gene Caul_3723 de *Caulobacter* sp. K31. Os resíduos de aminoácidos em fundo preto indicam aqueles conservados em todas as proteínas comparadas. Os resíduos de aminoácidos sombreados em cinza indicam aqueles conservados em duas das três proteínas. Os motivos RNP1 e RNP2 de cada domínio CSD estão demarcados em vermelho e verde, respectivamente. O alinhamento foi realizado utilizando o programa ClustalW2.

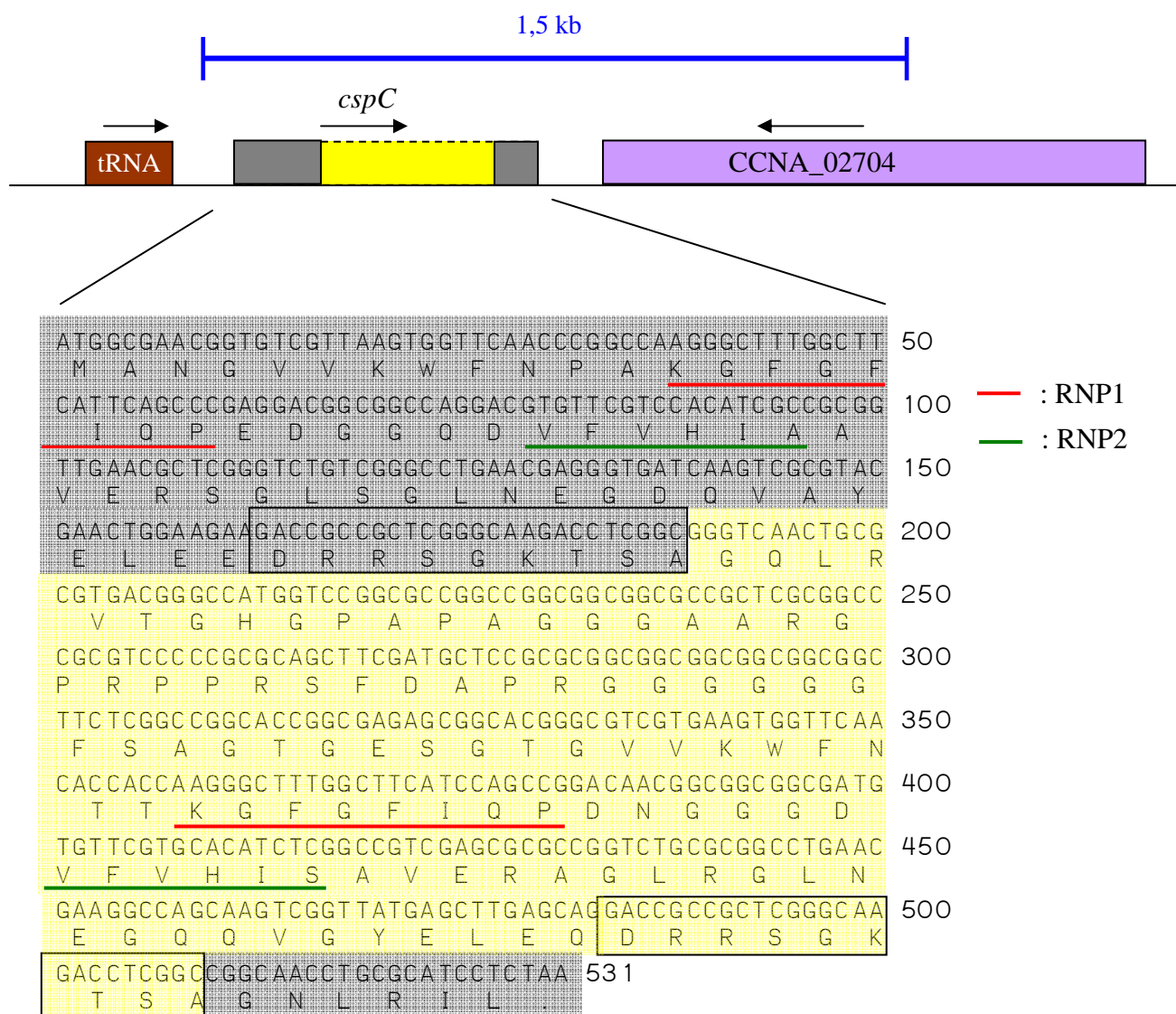


Figura 12. Determinação da seqüência de *cspC*. Acima, o esquema mostra a região do genoma que contém o gene *cspC*, indicando a seqüência previamente anotada (caixas cinzas) e a nova porção do gene, equivalente ao segundo domínio CSD (caixa amarela). A barra azul indica a região amplificada por PCR com os oligonucleotídeos C1 e C5PC-F, que originou um fragmento de 1,5 kb. As setas indicam o sentido da transcrição de cada gene. Abaixo, o consenso obtido através do seqüenciamento do fragmento de 1,5 kb. Em cinza, estão mostrados os nucleotídeos presentes na seqüência originalmente anotada de *cspC*. Em amarelo, estão indicados os nucleotídeos que não foram incluídos na anotação. Demarcados por caixas, estão duas repetições diretas perfeitas dentro do gene. Sublinhados em vermelho e verde, estão, respectivamente, os motivos RNP1 e RNP2, presentes em cada domínio CSD.

Um fato interessante observado na seqüência proposta de CspC é a grande quantidade de glicinas (G) presentes na região do *linker* (Fig. 11 e 12). Domínios ricos em glicina foram encontrados na proteína de choque frio de trigo WCSP1, interligando o domínio CSD amino-terminal com domínios *zinc-finger*, e estes entre si (KARLSON et al., 2002). Estes domínios ricos em glicina, juntamente com os domínios *zinc-finger*, foram descritos como responsáveis pela localização de WCSP1 no retículo endoplasmático e na região do núcleo (NAKAMINAMI; KARLSON; IMAI, 2006), e mostraram ser necessários para a ligação a RNA em uma proteína do tabaco (HANANO; SUGITA; SUGIURA, 1996). Regiões ricas em glicina são encontradas interligando os dois domínios CSD de CspC e da proteína codificada por Caul_3723 em *Caulobacter* sp. K31; entretanto, não se sabe se estas regiões constituem um domínio verdadeiro, já que os domínios ricos em glicina não possuem seqüências consenso fixas (KARLSON et al., 2002), nem sua provável função em CSPs, uma vez que estas regiões não são encontradas em CspD de *C. crescentus*.

4.2 Construção do mutante $\Delta cspC::\Omega spec$

Para deletar a região codificadora do gene *cspC*, os flaqueadores a montante e a jusante do gene (570 e 810 pb, respectivamente) foram amplificados por PCR com os pares de oligonucleotídeos C3/C4 ou C1/C2, clonados *in tandem* e o gene foi substituído por um cassete de resistência a espectinomicina e estreptomicina ($\Omega spec$) (Fig. 13). O cassete utilizado originou-se da digestão do plasmídeo pHP45 Ω com *EcoRI*, isolando um fragmento de aproximadamente 2,0 kb contendo marca de resistência a espectinomicina e estreptomicina, que foram os antibióticos que permitiram uma melhor seleção de transformantes durante o processo de obtenção do mutante. Após subclonagem dos insertos nos vetores TOPO e pBluescript KS, originou-se o inserto *Apal/PstI* $\Delta cspC::\Omega spec$, de aproximadamente 3,4 kb, o qual foi isolado e clonado no vetor pNPTS138, gerando a construção pNPTS138($\Delta cspC::\Omega spec$) (Fig. 13). Este vetor foi introduzido em S17-1, uma linhagem de *E. coli* com capacidade conjugativa, tendo por objetivo a transferência deste vetor suicida a *C. crescentus* NA1000 e a substituição do gene pelo $\Omega spec$ após dupla recombinação homóloga.

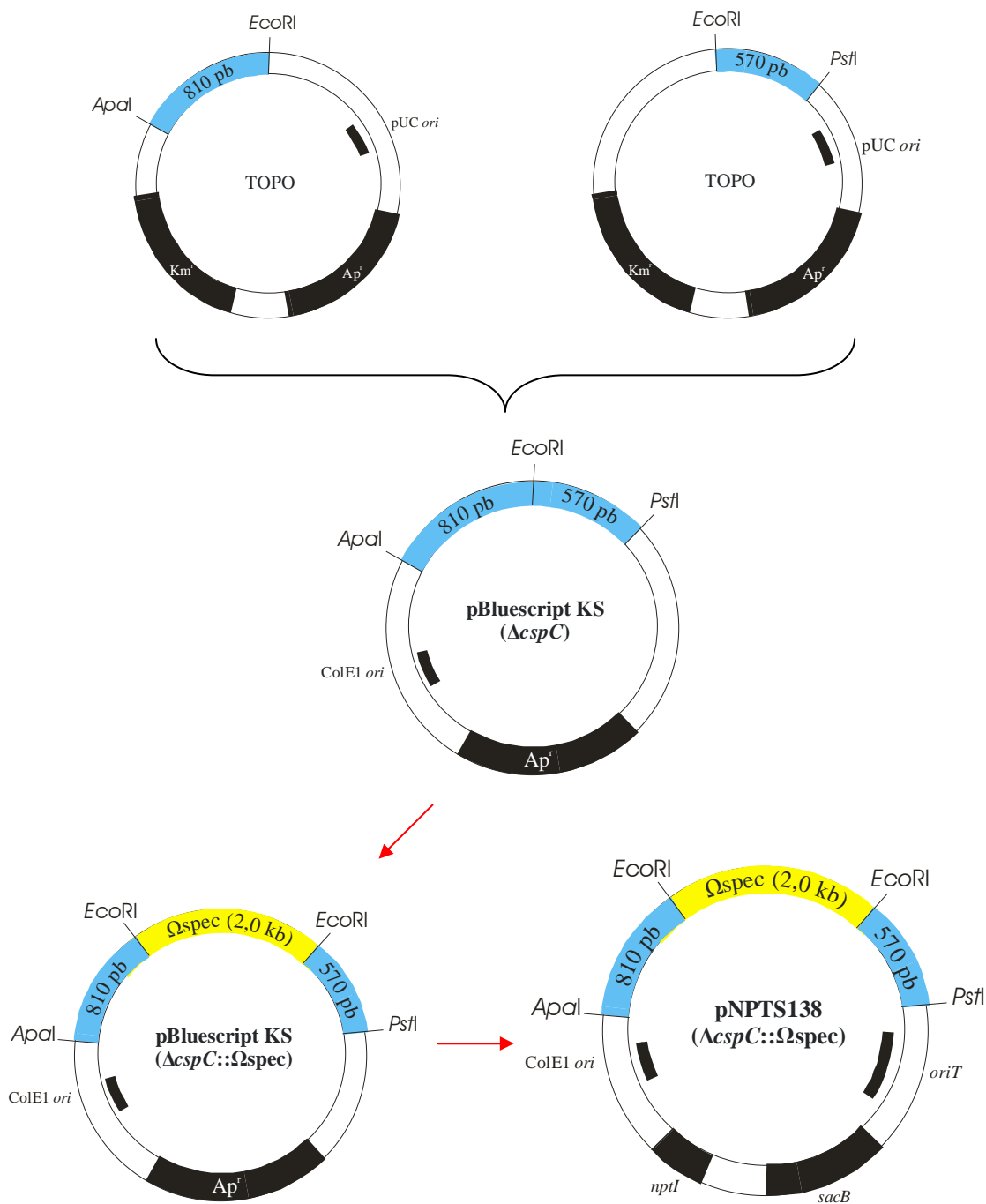


Figura 13. Estratégia resumida para a construção do mutante $\Delta cspC::\Omega spec$. Cada flaqueador clonado no vetor TOPO foi isolado, e os dois fragmentos foram ligados *in tandem* no vetor *pBluescript KS*, originando um fragmento *ApaI/PstI* de aproximadamente 1,4 kb. Em seguida, o cassete de resistência $\Omega spec$ foi inserido no sítio de *EcoRI* criado, substituindo o gene *cspC*. O inserto *ApaI/PstI* de cerca de 3,4 kb resultante foi passado para o vetor *pNPTS138*, gerando a construção *pNPTS138(ΔcspC::Ωspec)*.

Com a introdução do plasmídeo recombinante acima, pelo fato de ser um vetor suicida que não replica em *C. crescentus*, ocorreria sua inserção no gene *cspC* por recombinação homóloga, sendo a deleção do gene oriunda de um segundo evento de recombinação. Assim, após a segunda recombinação, a seqüência clonada no plasmídeo (contendo Ω_{spec}) ficaria integrada no genoma, sendo trocada pelo gene íntegro, que ficaria no plasmídeo suicida.

A figura 14 mostra as duas maneiras possíveis para a primeira recombinação ocorrer. O primeiro evento de recombinação corresponde à integração do plasmídeo no genoma, estando presentes, portanto, a versão íntegra do gene *cspC* e a versão deletada. A ocorrência da integração do vetor foi averiguada através de uma reação de PCR com os oligonucleotídeos H3 e H4. De acordo com o esquema de recombinação mostrado na figura 14B, esta reação amplificaria uma banda de 1,6 kb, equivalente àquela que seria obtida em NA1000 sem integração do vetor; por isso, procurou-se o esquema de recombinação mostrado na figura 14A, em que a mesma reação de PCR amplificaria uma banda de 3 kb, facilmente distinguível de NA1000 sem integração do vetor. Ainda, outro motivo para não se buscar o esquema de recombinação mostrado na figura 14B consistiu na existência de vários genes codificando para RNAs transportadores e ribossômicos a montante de *cspC* (Fig. 15). A transcrição intensa e as repetições desta região poderiam impedir ou prejudicar a disponibilidade das seqüências corretas para recombinação nesta região, necessária para se obter a integração do plasmídeo como mostrado na figura 14B. Pelos motivos apresentados, o esquema buscado para a primeira recombinação foi o mostrado na figura 14A.

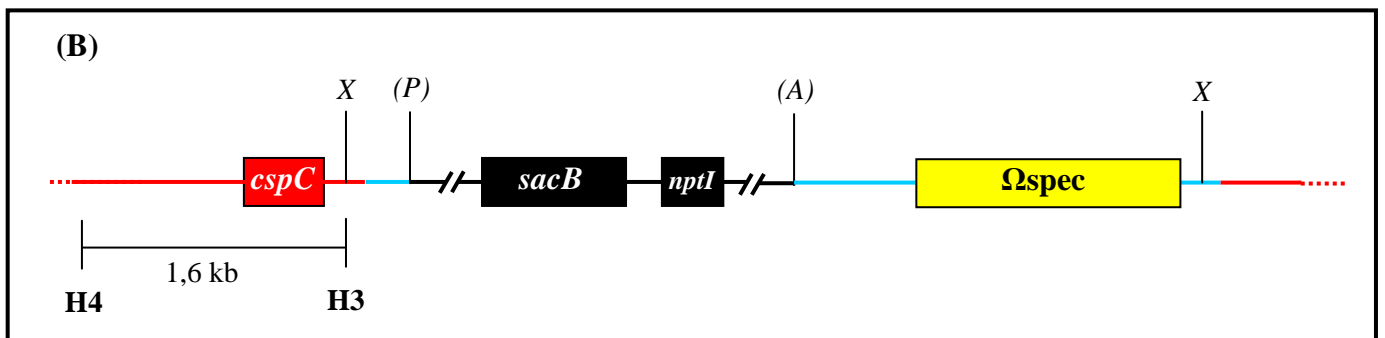
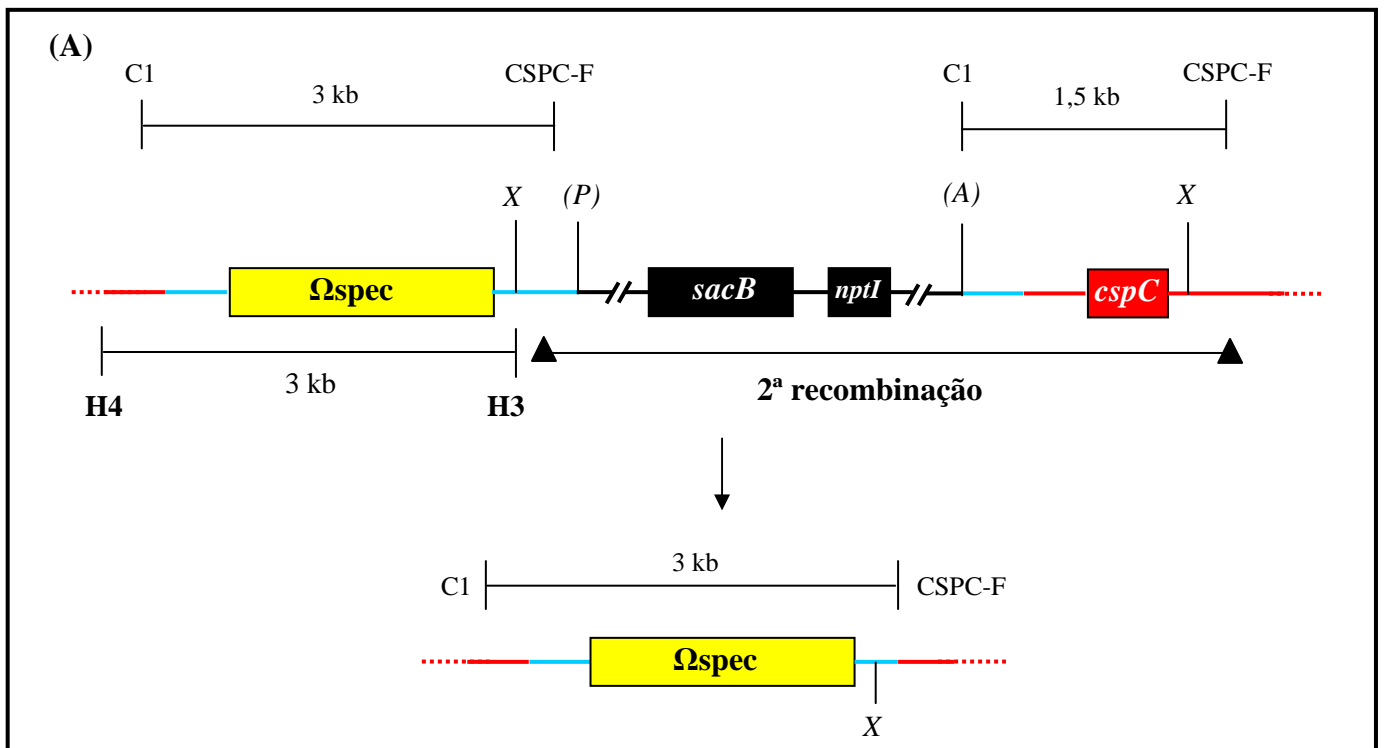
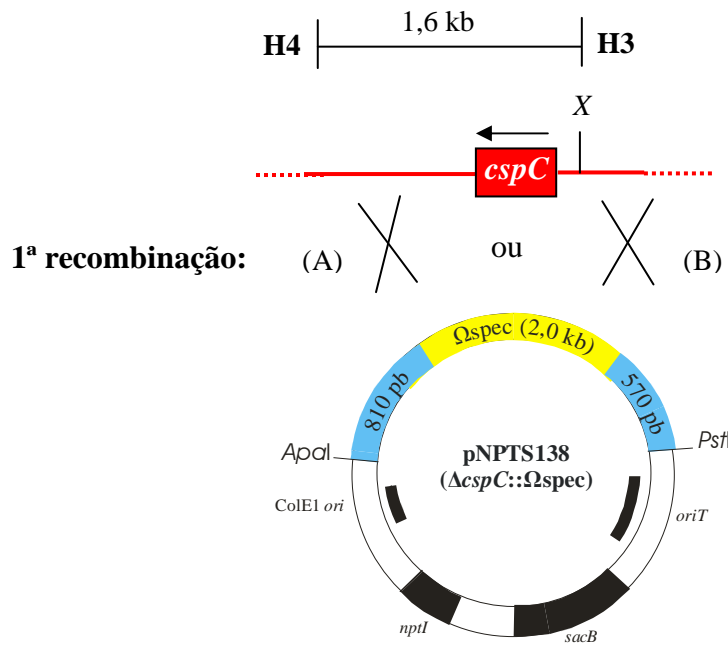
Mesmo com a ocorrência de dois sítios distintos de hibridização do oligonucleotídeo H3 nestes esquemas de recombinação (sobre o sítio de *XhoI*), apenas uma banda seria amplificada na reação de PCR, porque a distância entre H4 e o sítio de *XhoI* mais distal de H4 seria muito grande (> 10 kb) para que a DNA polimerase utilizada conseguisse estender e sintetizar o fragmento inteiro.

Duas colônias resultantes da conjugação tiveram a integração do plasmídeo no genoma (primeira recombinação) confirmada por PCR (Fig. 16). Estes clones foram cultivados em PYE por tempo longo para permitir a segunda recombinação, ou seja, a perda do plasmídeo carregando a cópia íntegra de *cspC*. Em seguida, estas culturas foram semeadas em PYE ágar com sacarose para selecionar os indivíduos que perderam o plasmídeo, através da toxicidade conferida pelo gene *sacB* do mesmo (WEST; YANG; STEPHENS, 2002). Das colônias obtidas, 1200 foram semeadas em PYE ágar

com espectinomicina e estreptomicina para confirmação da presença do cassete de resistência a estes antibióticos integrado no genoma. Aproximadamente 400 colônias foram obtidas, as quais foram passadas para placas de PYE com canamicina para selecionar aquelas sensíveis ao antibiótico, confirmando a perda do plasmídeo carregando o gene *cspC*. Esta seleção indicou apenas um clone sensível a canamicina. Este resultado foi inesperado pela baixa frequência de obtenção de mutantes; provavelmente, a seleção por sacarose não teve eficiência suficiente para impedir que colônias portando o plasmídeo integrado crescessem, apesar de ter sido utilizada a concentração padrão (3%).

O clone sensível a canamicina teve seu DNA genômico extraído e utilizado como molde numa reação de PCR para confirmação da deleção do gene, em paralelo com NA1000 e um primeiro recombinante (Fig. 17). Porém, não foi obtida a banda esperada para o suposto mutante. Alguns parâmetros da reação de PCR foram alterados para permitir a visualização da banda esperada no suposto mutante (como, por exemplo, a concentração de dimetilsulfóxido e a temperatura de anelamento), porém não houve sucesso nestas tentativas (dados não mostrados). Para uma confirmação mais direta da mutação, foi realizado um ensaio de *Western blot* com soro anti-CspC obtido por imunização de coelho (ver item 4.6), para indicar a presença da proteína em NA1000 e a ausência desta no suposto mutante, avaliando-se também se a banda reconhecida em NA1000 não seria a de outra(s) CSP(s), com extrato de ΔABD . O filtro de nitrocelulose após a revelação das bandas é mostrado na figura 18, no qual foi confirmada a deleção do gene *cspC*, além da especificidade do anti-soro obtido contra a proteína CspC. Ainda, corroborou-se a hipótese de que o gene é maior do que o originalmente anotado, pois a proteína corresponderia a 7 kDa se contivesse um único domínio CSD; porém, ela aparece como uma proteína de aproximadamente 18 kDa, condizente com a seqüência proposta para o gene.

Figura 14. Esquema dos possíveis eventos de recombinação homóloga. Ao se introduzir o vetor pNPTS138($\Delta cspC::\Omega spec$) em *C. crescentus* NA1000, a homologia de seqüência entre os flaqueadores de *cspC* clonados e os do cromossomo possibilita a recombinação nesta região (acima), promovendo a integração do vetor no genoma. A seta acima do gene *cspC* indica o sentido de sua transcrição. Os possíveis eventos da primeira recombinação homóloga são mostrados em (A) e (B). Em vermelho, estão representadas as seqüências do cromossomo; em azul, as seqüências correspondentes aos flaqueadores de *cspC* clonados no vetor; em amarelo, o cassete de resistência a espectinomicina e estreptomicina no lugar do gene *cspC*; e em preto, as demais seqüências plasmidiais. Em negrito, estão representadas as posições de hibridização dos oligonucleotídeos H3 e H4, utilizados em reação de PCR para confirmar a integração do plasmídeo no cromossomo. Em (A), esta reação de PCR amplificaria uma banda de aproximadamente 3 kb, distinguível da banda em NA1000 sem integração do vetor (1,6 kb); em (B), a banda amplificada de 1,6 kb não permitiria distinção de NA1000 sem integração do vetor, sendo (A) o esquema de recombinação procurado. Em (A), estão indicados os tamanhos dos fragmentos amplificados com os oligonucleotídeos C1 e CSPC-F, utilizados em reação de PCR para detecção da segunda recombinação e confirmação da presença da cópia deletada (3 kb) e da cópia íntegra (1,5 kb) de *cspC* nos primeiros recombinantes. A barra delimitada por triângulos indica a região que deveria ser perdida com o plasmídeo para que ocorresse a deleção de *cspC*. Abaixo da seta em (A), está representado um modelo para a ocorrência da segunda recombinação homóloga. Em itálico, são mostrados sítios de restrição, com parênteses indicando aqueles inseridos por PCR: A, *Apa*I; P, *Pst*I; X, *Xho*I. A posição de hibridização do oligonucleotídeo H3 se encontra sobreposta ao sítio de restrição *Xho*I, sendo representada apenas uma vez em cada esquema.



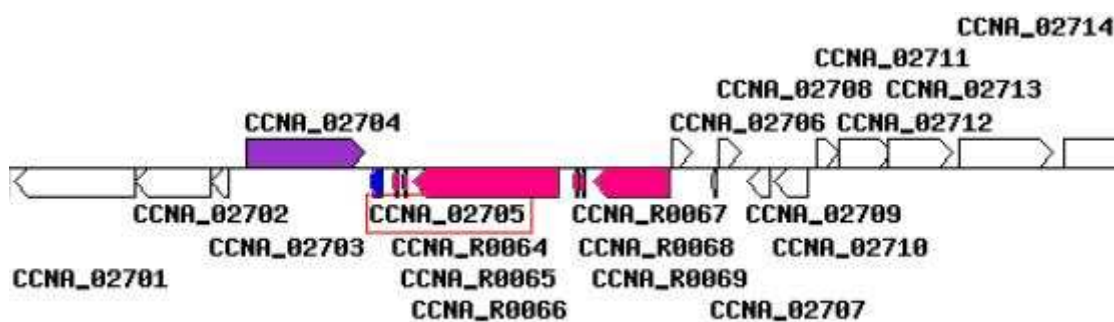


Figura 15. Mapa da região do genoma de *C. crescentus* NA1000 que contém o gene *cspC*. O gene *cspC* (CCNA_02705) está indicado pela caixa e representado por uma seta azul. As setas de cor rosa indicam genes envolvidos na tradução. CCNA_R0064, CCNA_R0067 e CCNA_R0068 representam genes que codificam para RNAs transportadores (respectivamente, tRNA-Met, tRNA-Ala e tRNA-Ile); CCNA_R0065, CCNA_R0066 e CCNA_R0069 indicam genes que codificam para RNAs ribossômicos (respectivamente, subunidade 5S, 23S e 16S). A seta roxa representa o gene de uma enzima málica dependente de NADP. As setas brancas indicam genes não categorizados.

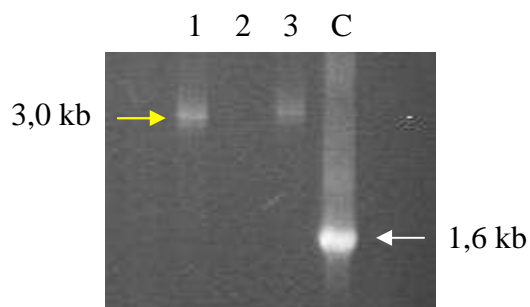


Figura 16. Reação de PCR para detecção da primeira recombinação. A reação foi feita com os oligonucleotídeos H3 e H4. As canaletas de 1 a 3 referem-se a reações cujos moldes são DNAs genômicos de clones portando o plasmídeo pNPTS138($\Delta cspC::\Omega spec$). A canaleta C indica o controle com DNA genômico de NA1000. A seta amarela indica a banda de 3,0 kb esperada para os primeiros recombinantes, observada nas canaletas 1 e 3; a seta branca indica a banda de 1,6 kb esperada para o controle NA1000.

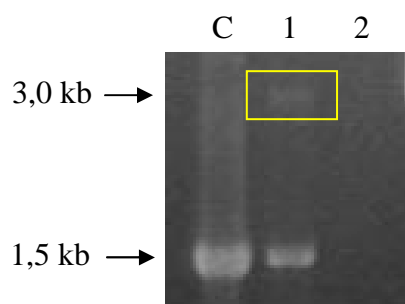


Figura 17. Reação de PCR para detecção da segunda recombinação. Foram utilizados os oligonucleotídeos C1 e CSPC-F. A canaleta demarcada com C indica o controle com DNA genômico de NA1000. As canaletas 1 e 2 representam reações com DNAs genômicos de um primeiro recombinante e do suposto mutante ΔC , respectivamente. A banda esperada para NA1000 é a de 1,5 kb indicada; para o primeiro recombinante, a de 1,5 kb e a de 3,0 kb (indicada pela caixa amarela). A banda esperada para o mutante, de 3,0 kb, não foi observada na canaleta correspondente.

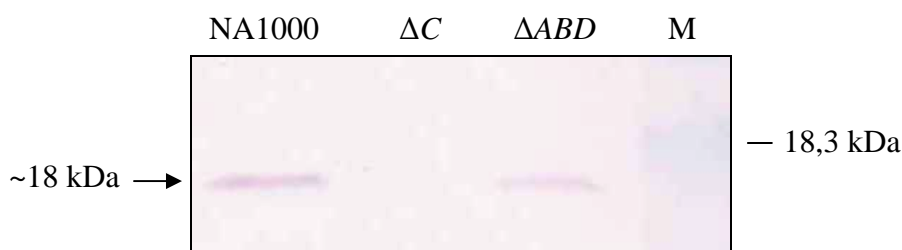


Figura 18. *Western blot* para confirmação da deleção do gene *cspC*. Culturas em fase estacionária tiveram suas proteínas totais extraídas e aplicadas em gel de poliácridamida-SDS 12%. Após a transferência destas para filtro de nitrocelulose, foi feito um ensaio de *immunoblot* com soro anti-CspC (1:1000) para reconhecimento da banda de ~18 kDa, correspondente à nova estrutura proposta de CspC com dois domínios CSD. A banda é reconhecida em extratos de NA1000 e ΔABD , mas não em ΔC . M indica o marcador de peso molecular.

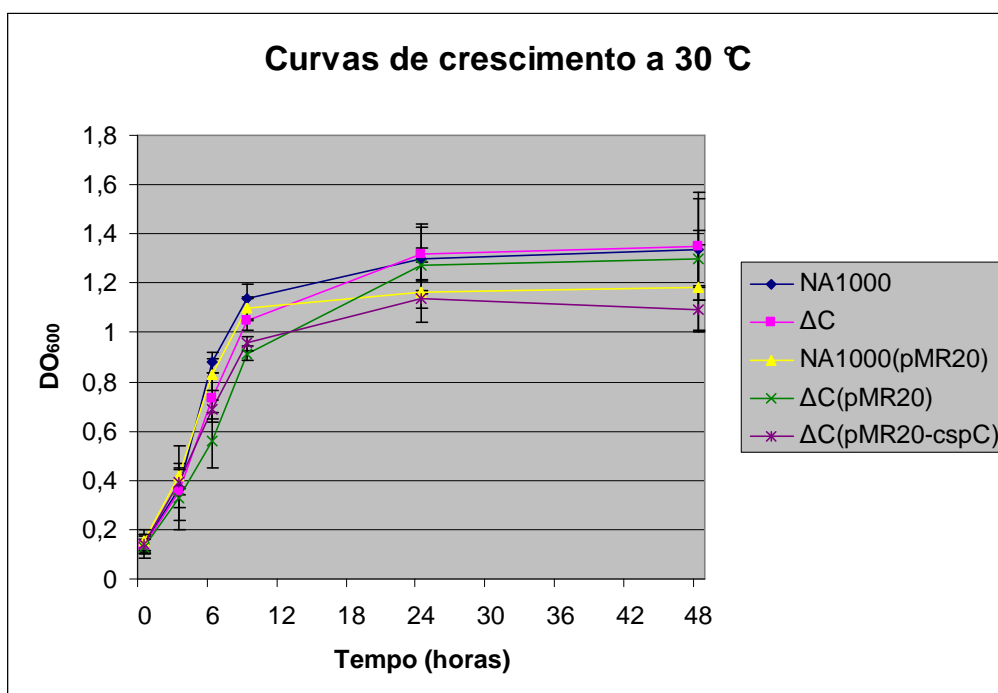


Figura 19. Curvas de crescimento a 30 °C. As linhagens NA1000 e ΔC foram cultivadas em meio PYE líquido, enquanto as linhagens contendo o vetor pMR20 (com ou sem inserto) foram cultivadas em meio PYE líquido acrescido de tetraciclina. A taxa de crescimento foi avaliada nos pontos indicados, através do monitoramento da densidade óptica das culturas a 600 nm (DO₆₀₀). Os valores representam a média de medidas com duas replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam o desvio padrão.

Apesar de a deleção do gene não ter sido confirmada por PCR, outros fatores indicaram que este clone possui realmente a substituição de *cspC* pelo cassete de resistência a espectinomicina e estreptomicina: o perfil de sensibilidade e resistência a diferentes antibióticos; a ausência de reconhecimento da proteína CspC no ensaio de *Western blot*; as alterações fenotípicas apresentadas por esta linhagem e a restauração dos fenótipos selvagens com a introdução de uma cópia de *cspC* em plasmídeo (ver item abaixo). Por estes motivos, confirmou-se que a linhagem $\Delta cspC::\Omega spec$ foi obtida com êxito.

Houve dois agravantes que dificultaram a obtenção do mutante: um foi a anotação incorreta do gene no GenBank, o que levou à obtenção de resultados que diferiam daqueles esperados anteriormente (por exemplo, em reações de PCR para detecção das recombinações), atrasando a obtenção do mutante. O outro agravante pode ter sido uma baixa frequência da segunda recombinação, devida provavelmente à presença de genes altamente transcritos adjacentes a *cspC* e/ou ao tamanho limitante do fragmento a montante de *cspC* (570 pb), onde deveria ocorrer a segunda recombinação homóloga para a deleção do gene (Fig. 14A). Alternativamente, a presença de um gene codificando uma enzima málica dependente de NADP (CCNA_02704) a jusante de *cspC* pode ter dificultado o primeiro evento de recombinação nesta região: esta enzima está relacionada ao metabolismo do piruvato, composto necessário para uma série de funções anabólicas, sendo gerado a partir de malato por esta enzima. Se este for um mecanismo importante de geração de piruvato em *C. crescentus* NA1000, é possível que o gene CCNA_02704 seja também altamente transcrito, dificultando a recombinação entre os flaqueadores de *cspC*. No entanto, as dificuldades mencionadas foram superadas em tempo para a realização de ensaios fenotípicos com o mutante.

4.3 Ensaios fenotípicos

Primeiramente, foi avaliado se o mutante ΔC teria alguma alteração na taxa de crescimento a 30 °C. Para isso, culturas de NA1000 e ΔC portando ou não o plasmídeo pMR20 (vetor sem inserto) e culturas de $\Delta C(pMR20-cspC)$ (linhagem complementada com o gene *cspC* clonado no vetor pMR20) tiveram a absorbância monitorada durante 48 horas. O plasmídeo foi levado em conta por estar presente na linhagem complementada $\Delta C(pMR20-cspC)$, para fins de eliminação de variáveis. Observa-se na figura 19 que não houve diferenças significativas entre as taxas de crescimento das

linhagens avaliadas. Portanto, não houve grandes alterações no crescimento a 30 °C, decorrentes da deleção de *cspC*, da presença do plasmídeo nas células ou da adição de tetraciclina ao meio de cultura.

A seguir, a avaliação do crescimento foi feita durante o crescimento a 10 °C. As linhagens NA1000(pMR20) (considerada a selvagem), $\Delta C(pMR20)$ e $\Delta C(pMR20-cspC)$ foram diluídas para uma densidade óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0,1, incubadas a 30 °C até uma DO_{600} de aproximadamente 0,5, e passadas para a temperatura de 10 °C. Como se pode observar na figura 20A, a linhagem $\Delta C(pMR20)$ apresenta parada no crescimento já no primeiro dia a 10 °C, enquanto as outras linhagens ainda estão em fase exponencial. Estas só atingem a fase estacionária por volta do sexto dia de incubação a 10 °C. Este dado indica que a linhagem mutante apresenta o crescimento dificultado sob baixas temperaturas.

Apesar das observações feitas, a curva de absorbância por si só não é suficiente para avaliar se alguma linhagem apresenta defeitos no crescimento em relação a outra, pois este método é sensível também à presença de células mortas ou a alterações no tamanho das células. Com isso, é necessário também analisar a sobrevivência das linhagens em ensaios de viabilidade, que indicam se as células estão vivas e se dividindo ativamente.

Corroborando os dados das curvas de crescimento a 10 °C, estão ensaios de viabilidade preliminares, mostrados na figura 20B. A porcentagem de células viáveis da linhagem mutante aparenta ser menor que a das outras linhagens no primeiro dia de incubação a 10 °C, apesar da sobreposição das barras de erros. A partir do segundo dia, porém, fica mais clara a dificuldade do mutante em lidar com o crescimento a 10 °C, enquanto as linhagens selvagem e complementada apresentam aumento do número de UFCs (Fig. 20B).

É interessante que a ausência de *cspC*, um gene que não é induzido pelo frio, acarrete em queda na viabilidade no crescimento a 10 °C. Ensaios com outros mutantes para CSPs de *C. crescentus* evidenciam que, a temperaturas baixas, a CSP mais importante para a sobrevivência é CspA, uma vez que mutantes simples ou duplos para o gene *cspA* são mais sensíveis ao crescimento a 10 °C (MAZZON, 2008³), condizente com o fato de *cspA* ser um dos genes de maior expressão em baixas temperaturas (LANG, 2005). Outros mutantes para CSPs que ainda possuem o gene *cspA* não

³ MAZZON, R. R. São Paulo, 2008 (comunicação pessoal).

apresentam alteração significativa na sobrevivência a 10 °C (LANG e MARQUES, 2004; MAZZON, 2008⁴), apoiando a evidência de que CspA é uma das proteínas majoritárias e de maior importância no choque frio em *C. crescentus*. No entanto, a queda na viabilidade do mutante ΔC , sob baixas temperaturas, indica que a expressão do gene *cspC* pode ser importante para a sobrevivência da célula sob choque frio, apesar de não ser induzida nesta condição. Talvez CspC possua alguma função sob choque frio que não é totalmente compensada por CspA ou pela outra CSP induzida por choque frio, CspB. Como *cspC* apresenta níveis de expressão mais altos que os dos outros genes *csp*, durante o crescimento normal (LANG e MARQUES, 2004), pode-se supor que a expressão deste gene em particular seja importante para a sobrevivência da célula, tanto em temperaturas ótimas quanto em baixas temperaturas.

Não se sabe a exata função fisiológica das CSPs, tanto as induzidas sob choque frio quanto as induzidas em fase estacionária ou constitutivas. Tendo em vista que algumas CSPs de *E. coli* agem como antiterminadores de transcrição (BAE et al., 2000), pode-se especular que a função proposta das CSPs de desestabilização de estruturas secundárias de ácidos nucléicos estaria relacionada à desestabilização das alças de terminação de transcrição. Conseqüentemente, haveria expressão de genes importantes para uma dada condição fisiológica, a jusante de terminadores intrínsecos de transcrição. Derzelle et al. (2003) propuseram esta hipótese quando do estudo das CSPs de *Lactobacillus plantarum*, em que se observou o envolvimento de CspL na adaptação ao frio, de CspC na adaptação a carência nutricional e de CspP na adaptação ao congelamento. De fato, a atividade de antiterminação de transcrição de CspE de *E. coli* é necessária para a complementação do fenótipo de sensibilidade ao frio do mutante quádruplo para CSPs (PHADTARE; INOUE; SEVERINOV, 2002), apesar de CspE não ser induzida pelo choque frio (YAMANAKA; FANG; INOUE, 1998). É possível que CspC de *C. crescentus* tenha estas mesmas propriedades.

A morfologia das células durante o crescimento a 10 °C foi analisada através de microscopia óptica (Fig. 21). Percebe-se que, durante todo o período analisado, não houve alteração morfológica visível do mutante, em relação à linhagem selvagem, que porventura fosse restaurada pela complementação. Inclusive, o mutante apresenta o mesmo padrão de alongamento das células que a linhagem selvagem, que inicia por volta do terceiro dia e aumenta progressivamente até o oitavo dia.

⁴ MAZZON, R. R. São Paulo, 2008 (comunicação pessoal).

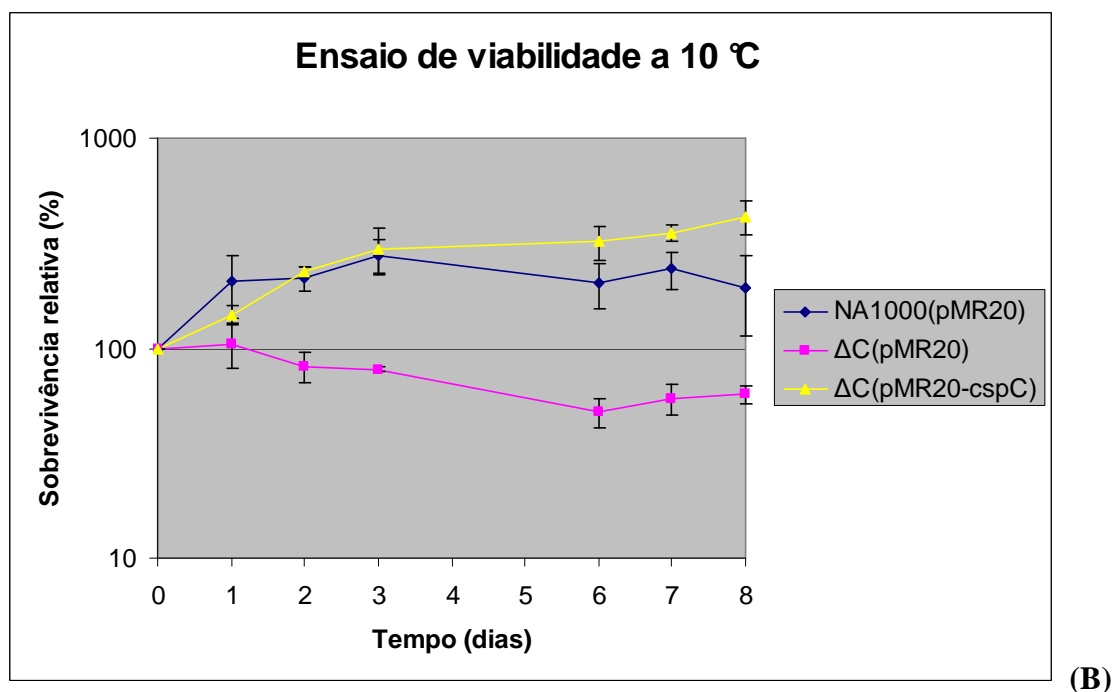
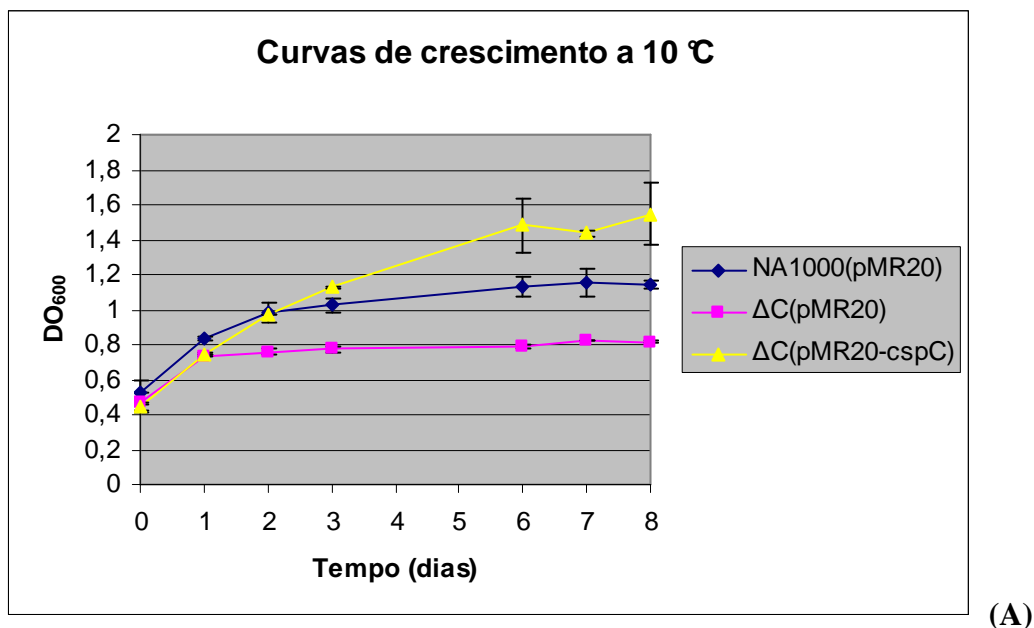
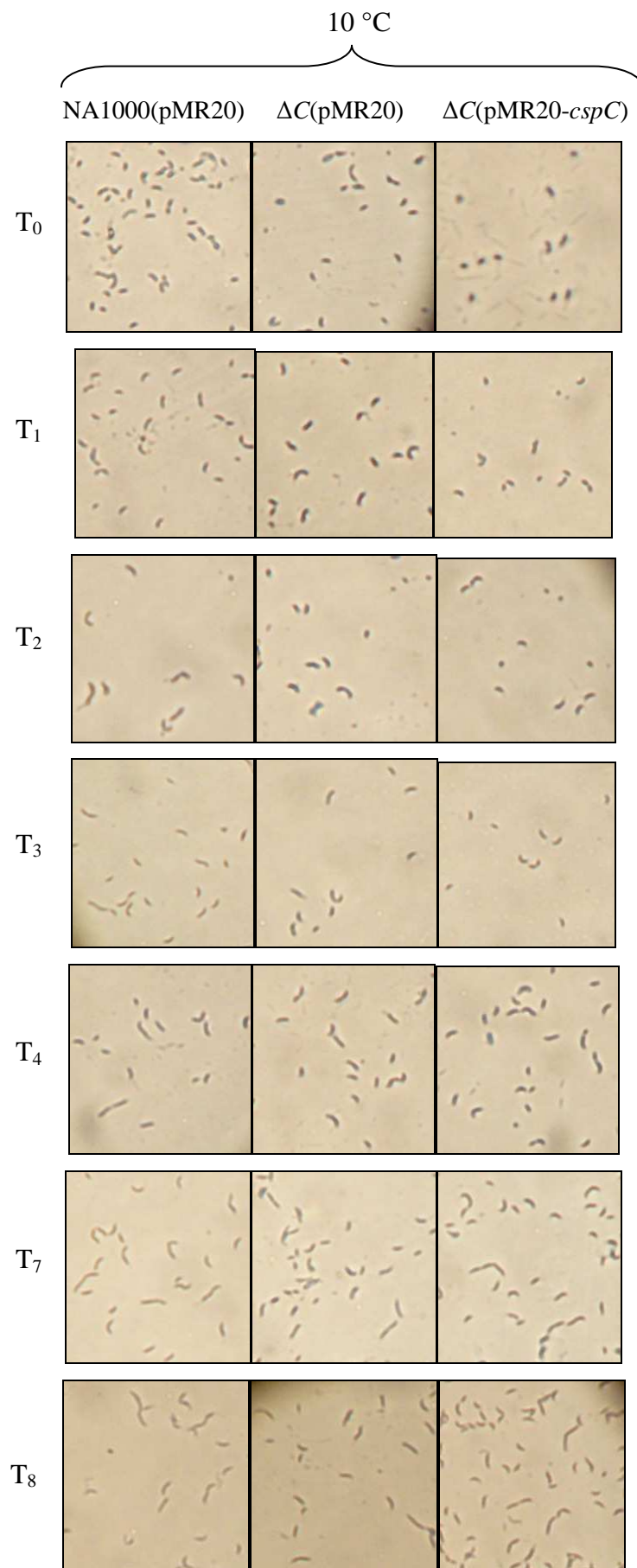


Figura 20. Avaliação do crescimento e sobrevivência a 10 °C. Culturas das linhagens indicadas foram primeiramente diluídas para uma DO_{600} igual a 0,1 e incubadas a 30 °C. Ao chegarem a uma DO_{600} de aproximadamente 0,5, foi tomado o primeiro ponto para contagem de UFCs, e as culturas foram passadas para a temperatura de 10 °C. Em (A), as medidas de absorbância de cada ponto. Em (B), sobrevivência relativa durante o crescimento a 10 °C. Os números de UFCs iniciais das linhagens (expressos em UFCs $\times 10^8$ /ml) foram: $8,1 \pm 1,6$ para NA1000(pMR20); $6,0 \pm 1,2$ para ΔC (pMR20); e $8,0 \pm 0,7$ para ΔC (pMR20-cspC). Os valores representam a média de experimentos com duas replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam o desvio padrão.

Figura 21. Microscopias ópticas durante o crescimento das células a 10 °C. As linhagens NA1000(pMR20), ΔC (pMR20) e ΔC (pMR20-*cspC*) foram incubadas durante 8 dias a 10 °C e lâminas foram preparadas em diferentes tempos para microscopia óptica. T_n indica o tempo no qual a lâmina foi preparada, sendo n a quantidade de dias de incubação (T_0 refere-se a 2 horas de incubação). O aumento é de 40 X.



Também foram feitos ensaios de viabilidade durante períodos prolongados em fase estacionária a 30 °C, mostrados na figura 22. O padrão de queda e retomada da viabilidade apresentado no gráfico é explicado pelo fato de que, ao mesmo tempo em que há morte das células, subpopulações das culturas conseguem sobreviver ao período prolongado em fase estacionária, e estas subpopulações aproveitam os nutrientes lançados pelas células mortas para proliferar, causando aumento transitório na viabilidade (WORTINGER; QUARDOKUS; BRUN, 1998).

Os resultados destes ensaios indicam que não houve redução na sobrevivência do mutante na fase exponencial (até 9 horas de crescimento) (Fig. 22B), apresentando sobrevivência relativa similar à da linhagem selvagem e da linhagem complementada até o ponto de 2 dias, durante a fase estacionária precoce (Fig. 22A). Porém, no ponto referente ao terceiro dia, em que as viabilidades de todas as linhagens caem, o mutante apresenta uma redução mais drástica (níveis 5 vezes menores que a selvagem) (Fig. 22A). No ponto de 4 dias, as linhagens selvagem e complementada já superam esta queda e retomam níveis maiores de sobrevivência relativa, enquanto o mutante ainda apresenta estes níveis baixos, em torno de 10 vezes menor que os das outras linhagens. Do sétimo dia em diante, porém, a linhagem mutante volta a ter níveis relativos de sobrevivência similares aos das outras linhagens (Fig. 22A). Pode-se inferir, portanto, que o mutante ΔC requer um tempo maior de recuperação após a queda na viabilidade, decorrente da incubação prolongada em meio de cultura. É possível que a ausência de *cspC* nas células prejudique a capacidade destas de sobreviver em períodos de carência nutricional. É possível também que, após a queda na viabilidade, outras CSPs poderiam compensar a ausência de *cspC* na célula e a sobrevivência se estabilizaria nos mesmos níveis da linhagem selvagem, como acontece no sétimo dia de incubação (Fig. 22A).

A presença do gene *cspC* em plasmídeo na linhagem $\Delta C(pMR20-cspC)$ complementou o fenótipo do mutante, restaurando os níveis de sobrevivência durante a recuperação após a queda na viabilidade. Mesmo durante o período de queda na viabilidade, esta não foi tão acentuada para $\Delta C(pMR20-cspC)$, sendo menos drástica que a da linhagem selvagem (Fig. 22A). Pode-se argumentar que o fato de o vetor pMR20 ser de baixo número de cópias (ROBERTS et al., 1996) faça com que haja um leve aumento na expressão do gene em relação ao normal, o que poderia favorecer a retomada do crescimento. Portanto, é possível notar diferenças entre as viabilidades das três linhagens que permitem supor um papel importante do gene *cspC* na condição estudada.

A morfologia das três linhagens em diferentes pontos do crescimento também foi avaliada por microscopia (Fig. 23). Na fase exponencial (T_0), as três linhagens não diferem entre si quanto à morfologia (apenas um ponto da fase exponencial é mostrado, pois não se observaram diferenças em outros pontos da mesma fase). Já na fase estacionária (T_1 em diante), o mutante apresenta um fenótipo de células retorcidas e mais curvas do que NA1000(pMR20), sendo que o fenótipo considerado selvagem é restaurado na linhagem complementada $\Delta C(pMR20-cspC)$. Não foi descrito um possível papel de *cspC* na manutenção da forma das células; o fenótipo observado pode ter relação com a produção de crescentina, uma proteína com função de citoesqueleto que é responsável pelas formas vibrióide e helicoidal de *C. crescentus* (AUSMEES; KUHN; JACOBS-WAGNER, 2003). A crescentina se associa na forma de filamentos *in vitro* sem a necessidade de energia ou cofatores, e produz uma estrutura helicoidal *in vivo* que se localiza em um dos lados da célula. Mutantes que não produzem crescentina apresentam-se como bacilos, e linhagens que produzem crescentina, porém em filamentos dispersos e não localizados, também apresentam forma de bacilo (AUSMEES; KUHN; JACOBS-WAGNER, 2003). Além da estrutura e da localização, outras características desta proteína que a tornam semelhante a elementos do citoesqueleto de eucariotos são a similaridade de seqüência, a organização dos domínios e as propriedades bioquímicas. A determinação da forma vibrióide ou helicoidal de *C. crescentus* pela crescentina depende do tamanho da célula: durante o crescimento ativo, as células são mais curtas que o intervalo entre as hélices da crescentina, causando a curvatura em forma vibrióide. Já em fase estacionária, quando as células se alongam (WORTINGER; QUARDOKUS; BRUN, 1998), a célula comporta uma maior quantidade de hélices da crescentina, tornando-se helicoidal (AUSMEES; KUHN; JACOBS-WAGNER, 2003). Células sem crescentina, entretanto, crescem normalmente em meio rico ou mínimo, e não apresentam alteração de viabilidade em fase estacionária prolongada (AUSMEES; KUHN; JACOBS-WAGNER, 2003). A pressão seletiva para a curvatura das células de *C. crescentus* pode ser entendida como um reflexo da forma celular na motilidade e nas propriedades de captar as condições ambientais.

A alteração de morfologia observada no mutante poderia ser um resultado da superexpressão ou alteração da crescentina, já que as células se encontram mais curvadas e retorcidas. Entretanto, não se sabe se este seria o fenótipo da superexpressão mencionada, nem a relação entre o gene *cspC* e o gene *creS*, que codifica a crescentina.

Pelos resultados obtidos, pode-se afirmar que o gene *cspC* possui um papel na manutenção da viabilidade da célula durante a fase estacionária e, possivelmente, na manutenção de sua forma, direta ou indiretamente. É possível também que a alteração na forma somente na fase estacionária, no mutante ΔC , indique que ele é mais susceptível a algum estresse decorrente desta fase que tenha relação com a turgidez da célula ou a rigidez da parede celular.

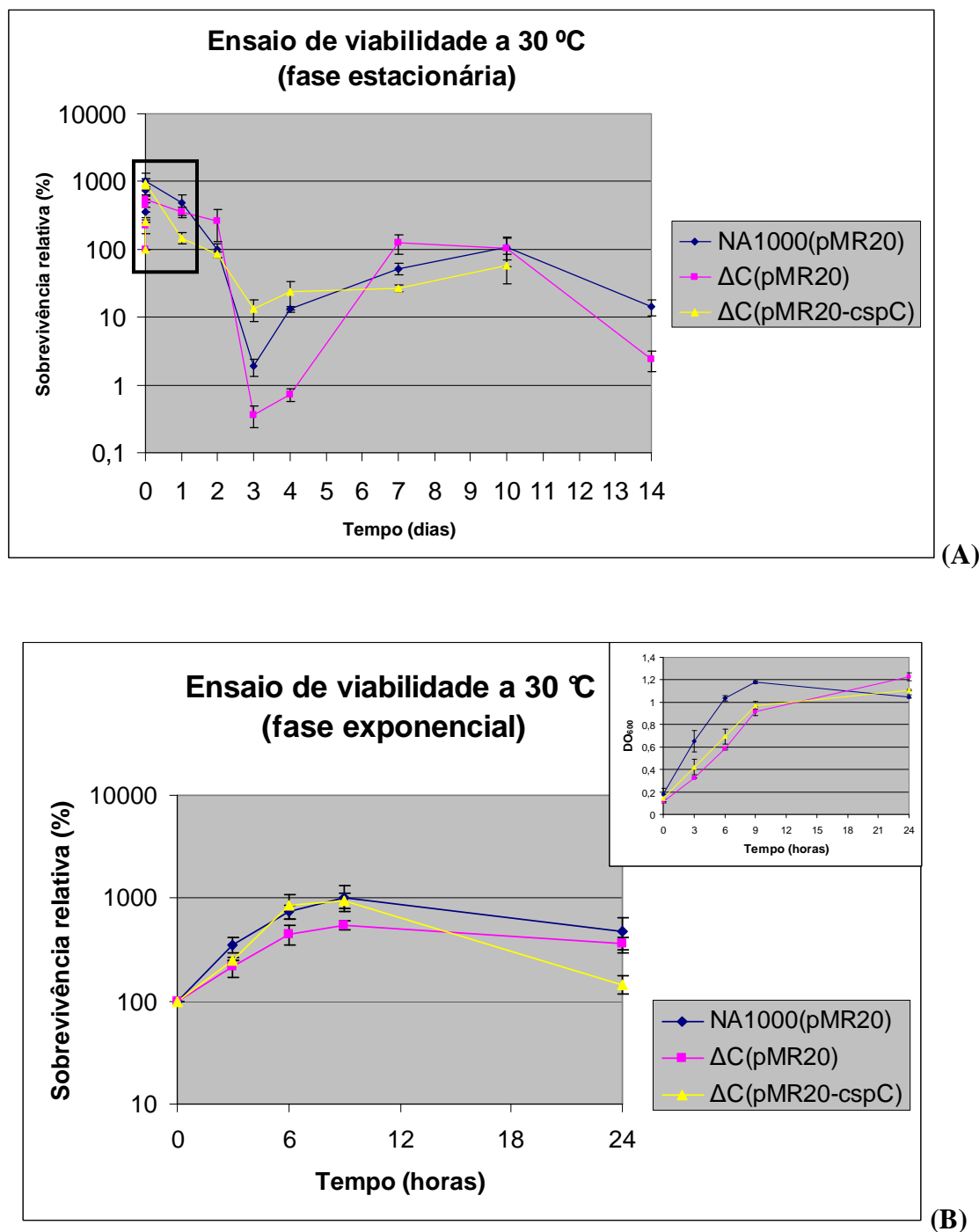
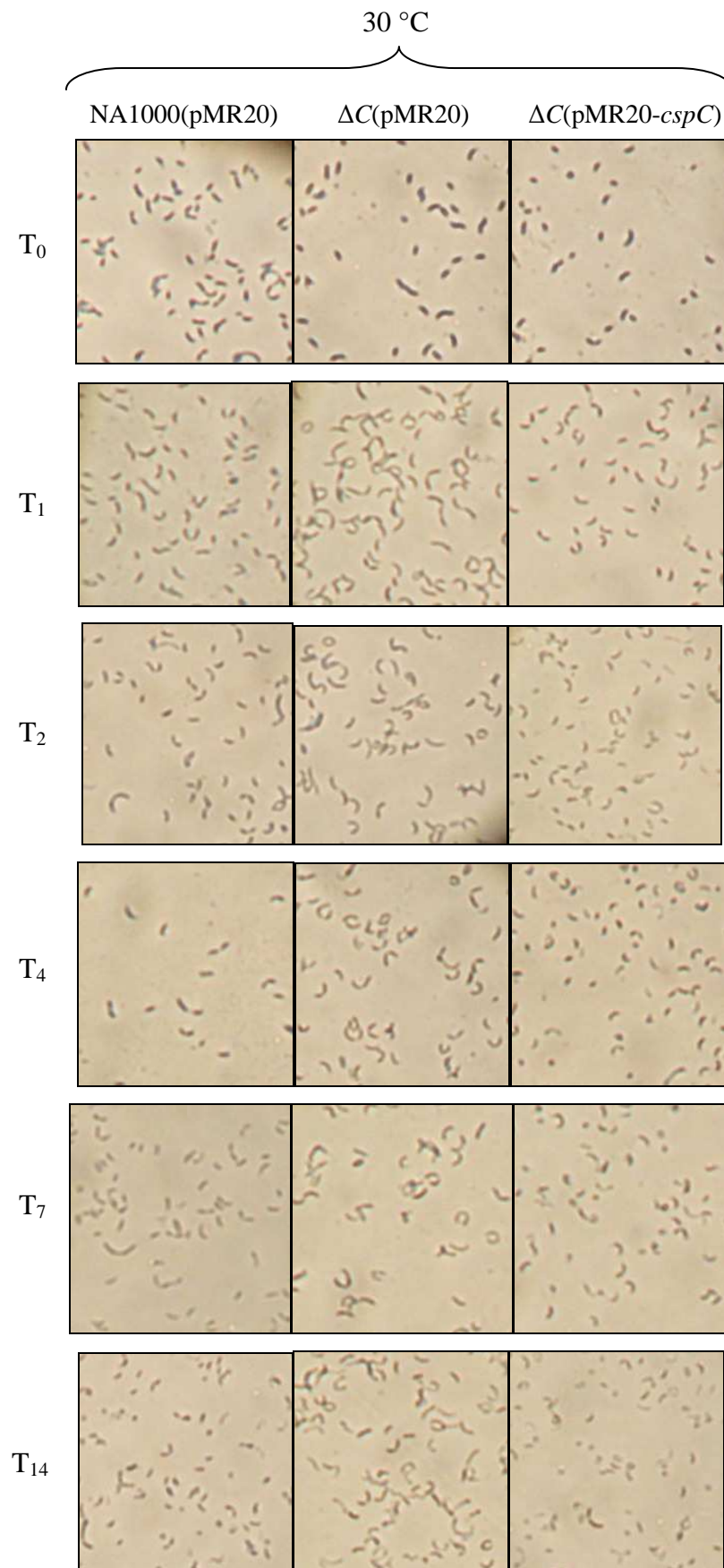


Figura 22. Avaliação da sobrevivência em fase exponencial e estacionária a 30 °C. Culturas das linhagens indicadas foram incubadas durante 14 dias a 30 °C, em meio PYE líquido com tetraciclina, e tiveram os níveis de sobrevivência monitorados nos tempos indicados. O quadro destacado em (A) é mostrado ampliado em (B). O quadro à direita em (B) mostra as curvas de crescimento das linhagens. O ponto de 14 dias de $\Delta C(pMR20-cspC)$ apresentou problemas e não pôde ser computado. Os números de UFCs iniciais das linhagens (expressos em UFCs $\times 10^8/ml$) foram: $3,6 \pm 1,8$ para NA1000(pMR20); $1,2 \pm 0,7$ para $\Delta C(pMR20)$; e $2,8 \pm 0,8$ para $\Delta C(pMR20-cspC)$. Os valores representam a média de experimentos com duas replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam o desvio padrão.

Figura 23. Microscopias ópticas durante o crescimento das células a 30 °C. As linhagens NA1000(pMR20), ΔC (pMR20) e ΔC (pMR20-*cspC*) foram incubadas durante 14 dias a 30 °C, e lâminas foram preparadas em diferentes tempos para microscopia óptica. T_n indica o tempo no qual a lâmina foi preparada, sendo n a quantidade de dias de incubação; no caso de T_0 , foram utilizadas culturas em fase exponencial, com DO_{600} próxima a 0,5. Lâminas preparadas em diferentes pontos da fase exponencial não apresentaram alterações em relação às lâminas mostradas em T_0 . O aumento é de 40 X. O fenótipo de células mais curvadas e retorcidas do mutante foi abolido quando se complementou a linhagem, restaurando o fenótipo considerado selvagem.



4.4 Mapeamento da região regulatória de *cspC*

Análises de deleções sucessivas da região regulatória do gene *cspD* de *C. crescentus* indicaram a presença de uma região necessária para os máximos níveis de expressão do gene, embora ela não esteja envolvida na indução específica de fase estacionária (LANG e MARQUES, 2004). A montante do gene *cspC*, existe uma seqüência similar a uma seqüência na região regulatória de *cspD*, com duas repetições diretas imperfeitas (LANG e MARQUES, 2004) (Fig. 24). Estas análises levantaram a possibilidade de tal seqüência em *cspC* também ter papel regulatório. Para se investigar a questão, duas regiões a montante do gene *cspC* foram clonadas separadamente no vetor pRKlacZ290; em uma delas, a região presumivelmente ativadora está ausente, e a linhagem resultante foi chamada de NA1000(P_{H2}/lacZ). Na outra construção, esta região e o promotor predito por aqueles autores estão ausentes, e a linhagem resultante foi chamada de NA1000(P_{H3}/lacZ) (Fig. 25).

A atividade do promotor das diferentes construções foi determinada por ensaios de atividade de β -galactosidase. Como controle positivo, foi utilizada a linhagem NA1000(P_{cspC}/lacZ), consistindo em NA1000 contendo a região regulatória de *cspC* íntegra (amplificada com os oligonucleotídeos CSPC-F e CSPC-G) clonada no vetor pRKlacZ290 (LANG e MARQUES, 2004). Como controle negativo, foi utilizada a linhagem NA1000 portando o vetor pRKlacZ290 sem inserto, e a atividade basal de β -galactosidase foi descontada nos ensaios.

Como mostrado na figura 26, houve indução da expressão gerada por P_{cspC}/lacZ durante a fase estacionária, como esperado, e os níveis da enzima se encontram acentuadamente maiores para esta construção, em comparação com as outras. A linhagem NA1000(P_{H3}/lacZ) apresentou níveis muito baixos de β -galactosidase, confirmando a posição do promotor de *cspC* predito por Lang e Marques (2004). Além disso, o comportamento da construção P_{H2}/lacZ nestes ensaios foi o mesmo que o observado para a construção análoga com o promotor de *cspD*: a região considerada ativadora, ausente nesta construção, é necessária para os máximos níveis de expressão do gene, mas a indução, de aproximadamente 3 vezes em 48 horas de crescimento, ocorreu tanto com o promotor íntegro quanto com aquele sem a região mencionada. Isto indica que *cspC* possui regulação transcricional, e que uma região ativadora da expressão de *cspC* se encontra no trecho que está ausente na construção P_{H2}/lacZ. Também se pode verificar que a indução da expressão do gene na fase

estacionária prescinde da ligação de um fator em *trans* à seqüência ativadora. Este possível fator teria papel, no entanto, na obtenção dos níveis máximos de expressão do gene.

Os inícios de transcrição de *cspC*, determinados por ensaio de extensão de oligonucleotídeos (LANG e MARQUES, 2004), diferem daquele proposto por McGrath et al. (2007) com base em microarranjos de DNA. Assim, se levado em conta o início de transcrição proposto pelos últimos autores, o promotor do gene estaria deslocado 35 pares de bases a jusante em relação à posição proposta inicialmente, fazendo com que a região ativadora também fosse deslocada. Contudo, o comportamento das diferentes fusões de transcrição nos ensaios realizados permite afirmar que, mesmo se houver um início de transcrição adicional com um novo promotor correspondente, este promotor seria muito mais fraco em comparação ao predito por Lang e Marques (2004). Não se pode descartar, no entanto, a existência deste segundo promotor de *cspC* na construção $P_{H3}/lacZ$, uma vez que esta exibiu uma pequena indução da expressão do gene na fase estacionária (Fig. 26 e Tabela 6). Apesar disso, os níveis de β -galactosidase observados para esta construção se mostraram muito baixos em comparação com as construções portando trechos maiores da região promotora (Fig. 26). Além disso, esta construção não apresentou indução em 48 horas em relação ao ponto de 24 horas, ao contrário das outras duas construções (Tabela 6). Portanto, a seqüência clonada em $P_{H3}/lacZ$, apesar de não conter o promotor predito de *cspC*, poderia ser responsável por uma pequena indução de fase estacionária, da ordem de 1,7 vezes a expressão em fase exponencial.

Fang et al. (1997) descreveram o ensaio de atividade de uma construção contendo o gene *cspA* de *E. coli* e a região 5' não traduzida (5'-UTR, de *untranslated region*) em fusão com um outro promotor, de atividade constitutiva. Mesmo trocando-se o promotor de *cspA* por um promotor constitutivo, a produção da proteína CspA foi induzida por choque frio, sugerindo que este gene não requer um fator de transcrição específico para sua indução a baixas temperaturas. Analogamente, a construção $P_{H3}/lacZ$ apresentou uma pequena indução do gene durante a fase estacionária, mesmo não contendo o promotor descrito. Faz-se a ressalva, porém, de que genes da família *csp* induzidos pelo frio possuem a região 5'-UTR longa (LANG e MARQUES, 2004; MITTA; FANG; INOUE, 1997; YAMANAKA; MITTA; INOUE, 1999), e genes *csp* não induzidos pelo frio, como *cspC*, apresentam esta região mais curta.

Com relação ao promotor predito de *cspC*, contido na construção $P_{H2}/lacZ$ e ausente em $P_{H3}/lacZ$, nota-se que ele é responsável por uma maior expressão de *cspC*

(Fig. 26). Este promotor em $P_{H2}/lacZ$ também é responsável por um maior grau de indução do gene em fase estacionária (2,5 vezes em 24 horas) (Tabela 6). Além disso, ao contrário de $P_{H3}/lacZ$, o promotor presente em $P_{H2}/lacZ$ e $P_{cspC}/lacZ$ promoveu uma indução do gene em 48 horas, da ordem de 1,3-1,4 vezes a expressão em 24 horas. A sequência ativadora similar à de *cspD* (ausente em $P_{H2}/lacZ$ e presente em $P_{cspC}/lacZ$) mostrou ser responsável por níveis ainda mais altos da expressão do gene (2,5-3 vezes maior que a promovida por $P_{H2}/lacZ$), tanto em fase exponencial quanto em fase estacionária. Entretanto, em termos de indução relativa, tanto $P_{cspC}/lacZ$ como $P_{H2}/lacZ$ se comportaram de maneira similar (Tabela 6), mostrando que aparentemente a região promotora presente em ambas é responsável pela indução em fase estacionária. De posse destes dados, pode-se concluir que as deleções sucessivas da região regulatória permitiram o reconhecimento do promotor e da região ativadora da expressão de *cspC*, correspondentes àqueles preditos por Lang e Marques (2004), e das contribuições relativas de cada região na expressão do gene *cspC*.

A transcrição de *cspC* já se encontra alta durante a fase exponencial, consistente com a idéia de que proteínas importantes para adaptação a longos períodos de carência nutricional devem ser produzidas enquanto a célula é capaz de uma expressão gênica robusta (SCHELLHORN et al., 1998). Alguns dos genes regulados por σ^S em *E. coli* mostraram seguir o mesmo padrão de expressão (SCHELLHORN et al., 1998).



Figura 24. Esquema da região regulatória do gene *cspC* de *C. crescentus*. As cabeças de seta indicam os sítios de início de transcrição (LANG e MARQUES, 2004). O início de transcrição mais próximo da extremidade 5' foi denominado como a posição +1, e as seqüências preditas como -35/-10 apresentam-se demarcadas em azul. O códon de iniciação da tradução apresenta-se sublinhado, e o sítio de ligação do ribossomo encontra-se sublinhado duas vezes. As setas pretas indicam duas repetições diretas imperfeitas, e os nucleotídeos sombreados indicam aqueles também encontrados na mesma região em *cspD*. Em vermelho, é mostrada a região compreendendo as repetições e os nucleotídeos presentes em *cspD*, constituindo a provável região ativadora de *cspC*. As setas dobradas verdes indicam as posições dos oligonucleotídeos CSPC-F, H2, H3 e CSPC-G, utilizados para amplificar fragmentos clonados no vetor pR*KlacZ290*, com sucessivas deleções da região regulatória.

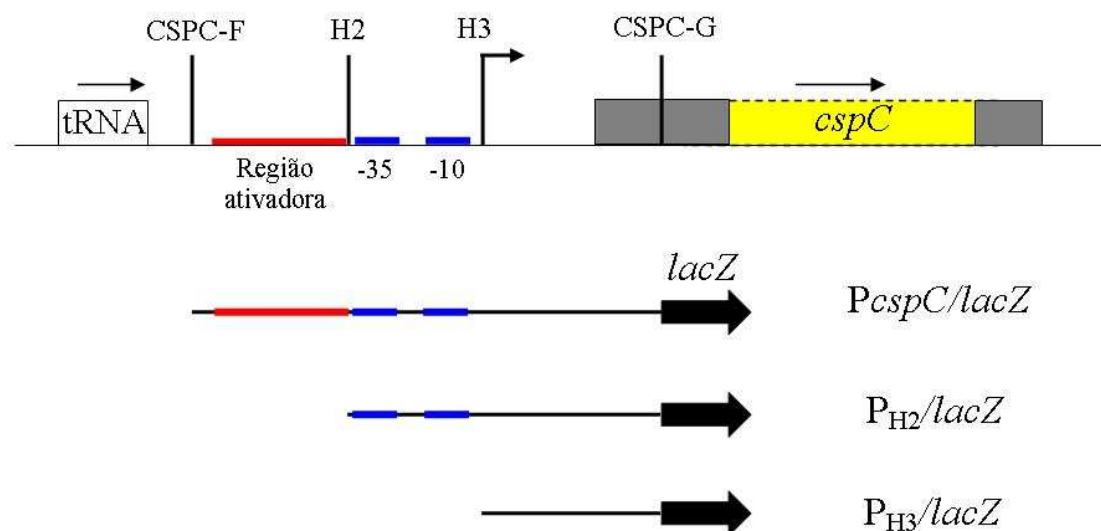


Figura 25. Esquema das construções utilizadas para mapeamento da região regulatória de *cspC*. CSPC-F, H2, H3 e CSPC-G indicam os oligonucleotídeos utilizados; a seta dobrada indica os inícios de transcrição do gene. Em cinza, a porção de *cspC* correspondente à seqüência originalmente anotada do gene; em amarelo, a porção que não foi incluída na anotação. A linha vermelha indica a região presumivelmente ativadora do gene; as linhas azuis indicam as regiões -35 e -10 do promotor. Abaixo, estão esquematizadas as regiões contidas em cada construção no vetor pRK*lacZ*290. As setas grossas pretas representam o gene repórter *lacZ*, que codifica a enzima β -galactosidase.

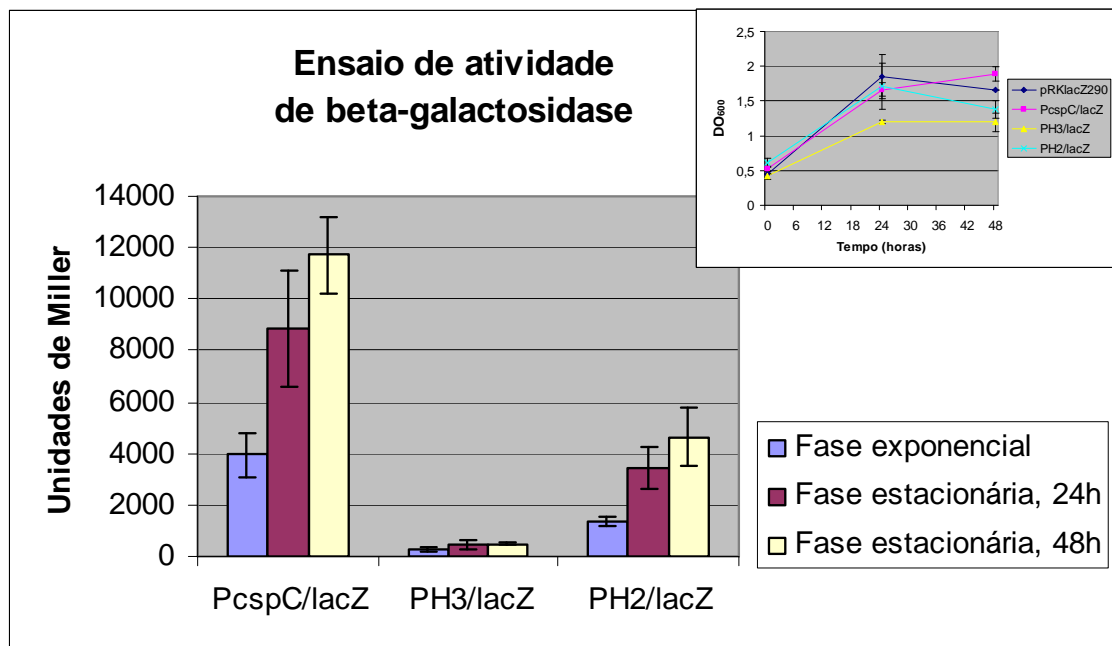


Figura 26. Ensaio de atividade de β -galactosidase para mapeamento da região regulatória do gene *cspC*. Culturas de NA1000 carregando o plasmídeo pRKlacZ290, *P_{cspC}/lacZ*, *P_{H3}/lacZ* ou *P_{H2}/lacZ* foram crescidas em meio PYE a 30 °C, tendo a absorbância monitorada (quadro à direita). As culturas foram utilizadas em ensaios de atividade de β -galactosidase, em fase exponencial (azul), e em fase estacionária (vermelho e amarelo). Os valores representam a média de experimentos com três replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam o desvio padrão.

Tabela 6. Indução relativa da expressão do gene *cspC* em ensaios de atividade de β -galactosidase, realizados com *C. crescentus* NA1000 portando as construções indicadas.

	U.M. 24h/ U.M. exp. ^a	U.M. 48h/ U.M. 24h
<i>P_{H3}/lacZ</i>	1,7	1,0
<i>P_{H2}/lacZ</i>	2,5	1,3
<i>P_{cspC}/lacZ</i>	2,2	1,4

^a U.M., unidades de Miller; exp., fase exponencial. Os valores são expressos como a razão entre as unidades de Miller obtidas nos pontos indicados.

4.5 Estudo da expressão do gene *cspC* em diferentes condições nutricionais

4.5.1 Expressão de *cspC* em diferentes meios de cultura

Caulobacter tem a capacidade de utilizar várias fontes de carbono, incluindo vários carboidratos (POINDEXTER, 1964), ácidos graxos (O'CONNELL; HENRY; SHAPIRO, 1986), aminoácidos (FERBER; KHAMBATY; ELY, 1988; POINDEXTER, 1964) e compostos aromáticos (CHATTERJEE e BOURQUIN, 1987). Seu estilo de vida oligotrófico supõe uma alta afinidade na tomada de nutrientes do meio, o que se reflete na riqueza em receptores de membrana, especialmente aqueles dependentes de TonB, codificados no genoma desta bactéria (NIERMAN et al., 2001). Ainda, contribuindo para o maior aproveitamento metabólico, o ciclo celular assimétrico de *C. crescentus* proporciona células especializadas para dispersão e busca de novas fontes nutricionais (células móveis) e células sésseis cujo talo proporciona uma maior superfície de membrana, potencializando a tomada de nutrientes (HIRSCH, 1986).

Sendo a expressão do gene *cspC* regulada em função da fase de crescimento, pode-se supor que certas condições nutricionais disparem a expressão do mesmo, já que um dos fatores que caracterizam a fase estacionária é a carência nutricional (NYSTRÖM, 2004). Para se investigar esta questão, a atividade do promotor de *cspC* foi avaliada em culturas de NA1000(*PcspC/lacZ*) crescidas em meios com diferentes composições, através de ensaios de atividade de β -galactosidase. A tabela 2 mostra cada meio com sua composição.

Como esperado, os meios provendo glicose como fonte imediata de carbono promoveram um maior crescimento das culturas, como se pode ver pelas medidas de absorbância em M2G, M2GP, M2GP(-N) e PYE + G (Fig. 27A). As culturas não atingiram absorbâncias tão altas em meio PYE, um meio complexo composto de peptona e extrato de levedura (ELY, 1991). Possivelmente, a fonte de carbono na forma de aminoácidos e peptídeos não é prontamente assimilável pelas células, tornando o crescimento menos intenso, durante o período examinado. Isto é apoiado pela observação de que, nos meios M2P e M2P(-N), cuja única fonte de carbono é a peptona, a absorbância das culturas também não se equipara às dos meios com glicose (Fig. 27A).

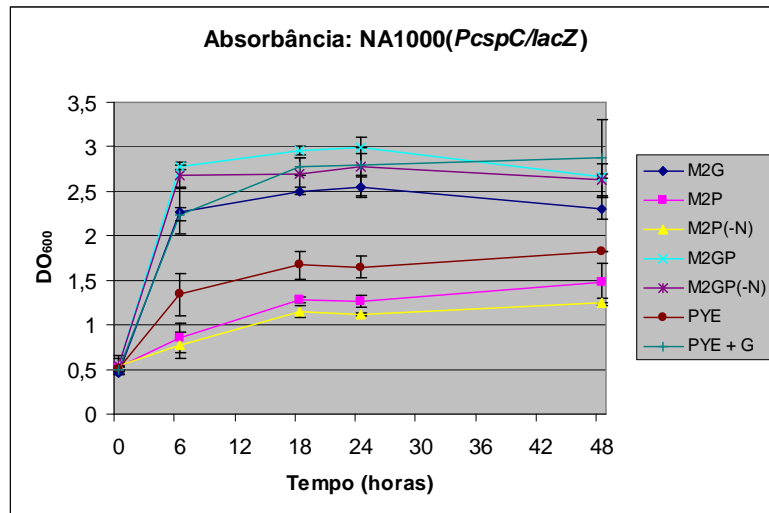
Os resultados dos ensaios de atividade de β -galactosidase estão mostrados nas figuras 27B e 27C. Nos meios M2P e M2P(-N), que contêm peptona como única fonte

de carbono, a atividade do promotor de *cspC* já se encontrava mais alta do que nos outros meios no início do experimento, indicando que o crescimento nessa fonte é um sinal para a indução de *cspC*. Após 6 horas, a atividade de *PcspC* é fortemente induzida nestes meios, mais do que em PYE. Nos meios contendo glicose, com exceção de PYE + G, a atividade de *PcspC* não foi significativamente alterada na entrada para a fase estacionária, e mesmo após 48 horas de crescimento, não houve grande indução. Estes dados indicam que os níveis de expressão de *cspC* respondem às condições nutricionais do meio, independentemente da fase de crescimento da cultura. Também existe a possibilidade de que a presença de glicose no meio seja um inibidor direto ou indireto da expressão do gene: comparando-se os níveis de atividade de *PcspC* em M2P e M2GP, observa-se que não há grande indução no último, apesar de este conter peptona em sua composição. O mesmo vale para M2P(-N) e M2GP(-N) (Fig. 27C).

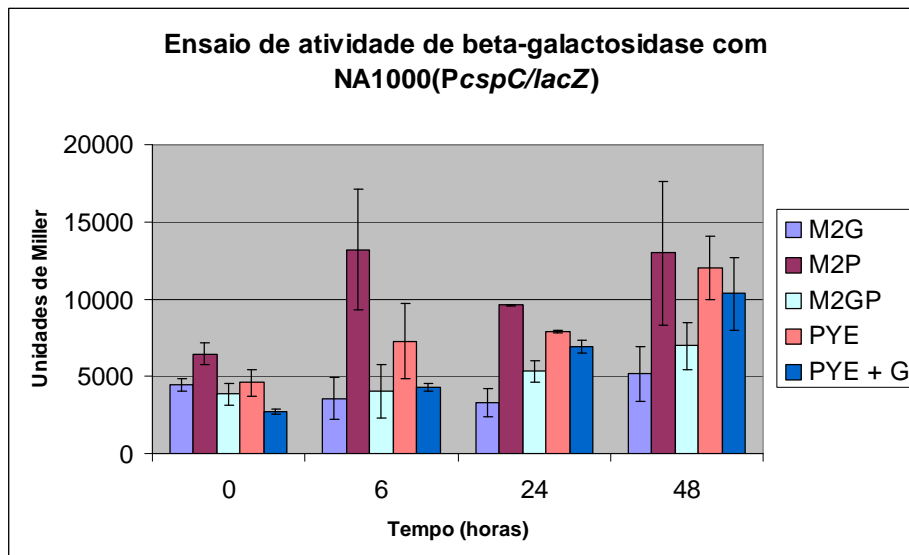
Já com relação a PYE + G, houve uma indução significativa da expressão do gene, mesmo com a presença de glicose no meio; se a glicose estiver realmente atuando como um inibidor da expressão do gene nos outros meios, é possível que esta inibição esteja mascarada pela indução intrínseca do gene em PYE. É possível, também, que exista uma gradação no poder inibitório da glicose em diferentes meios: a indução do gene é virtualmente inexistente em M2G, é leve em M2GP e é alta em PYE + G (Fig. 27B), de modo que o poder inibitório diminui à medida que aumentam as opções de fonte de carbono.

Com relação à fonte de nitrogênio, nota-se que a atividade do promotor não é alterada por uma ou outra fonte: os meios sem cloreto de amônio – indicados por (-N) – não diferiram significativamente de seus equivalentes com cloreto de amônio (Fig. 27C). Os resultados apresentados indicam uma possível resposta específica da expressão de *cspC* à presença de diferentes fontes de carbono, condizente com sua indução em fase estacionária.

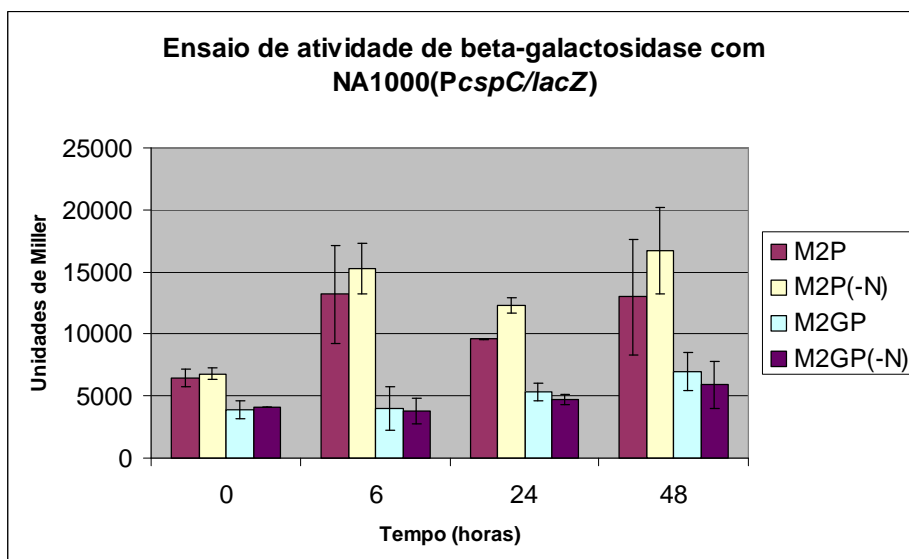
Figura 27. Avaliação do crescimento e estudo da atividade do promotor de *cspC* em meios com diferentes composições. Culturas de NA1000 carregando o plasmídeo *P_{cspC}/lacZ* foram crescidas nos meios indicados a 30 °C, tendo o crescimento monitorado pela medida de densidade óptica (A). Em (B) e (C), estão os resultados de ensaios de β -galactosidase com estas culturas. (B) mostra os ensaios feitos para estudo da influência de fontes de carbono sobre a expressão de *cspC*; (C) mostra os ensaios para estudo da resposta do gene frente a diferentes fontes de nitrogênio. Os valores representam a média de experimentos com duas replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam o desvio padrão.



(A)

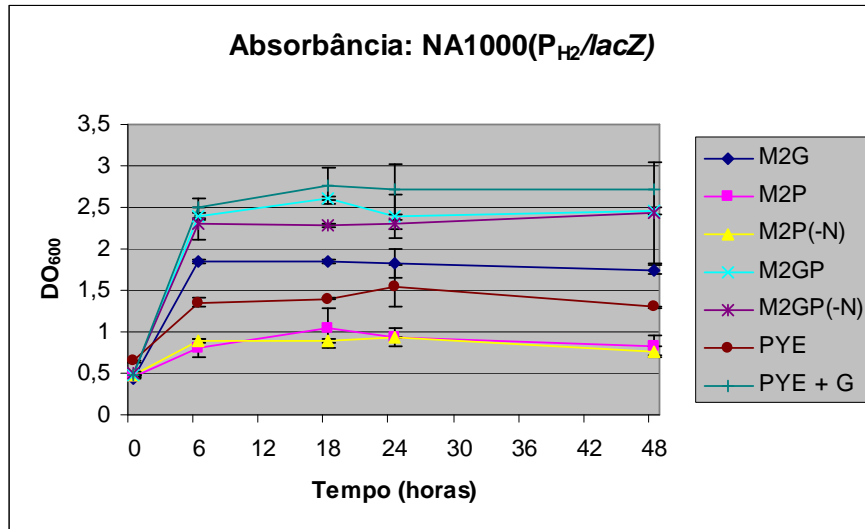


(B)

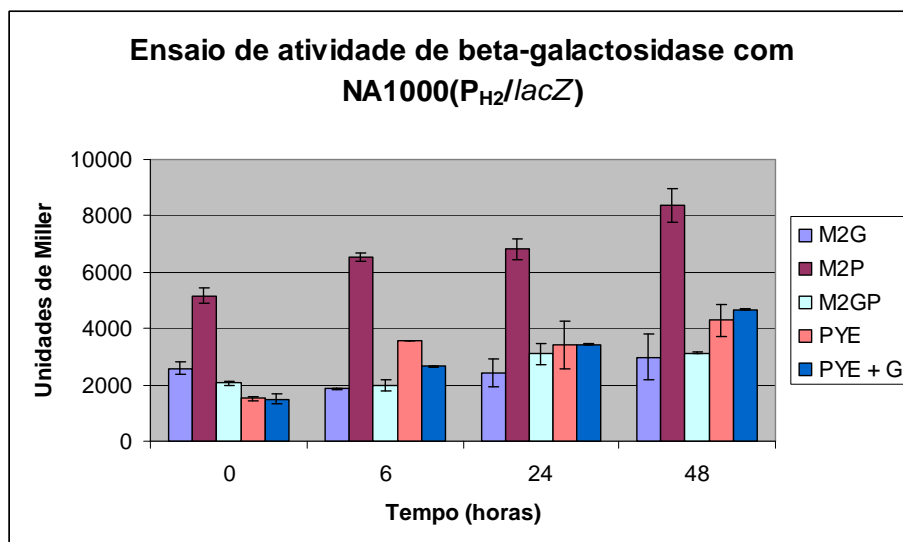


(C)

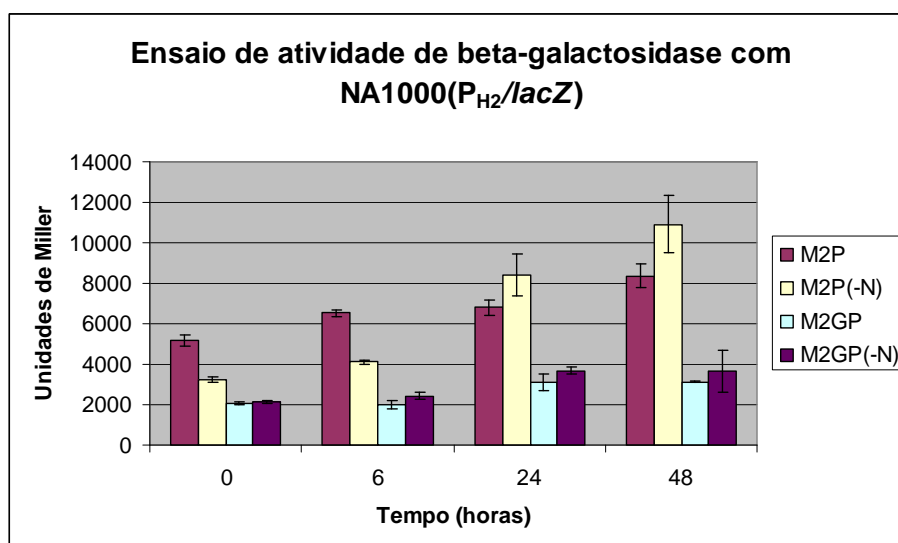
Figura 28. Avaliação do crescimento e estudo da atividade do promotor de *cspC* sem a região ativadora em meios com diferentes composições. Culturas de NA1000 carregando o plasmídeo P_{H2}/*lacZ* foram crescidas nos meios indicados a 30 °C, tendo o crescimento monitorado pela medida de densidade óptica (A). Em (B) e (C), estão os resultados de ensaios de β-galactosidase com estas culturas. (B) mostra os ensaios feitos para estudo da influência de fontes de carbono sobre a expressão de *cspC*; (C) mostra os ensaios para estudo da resposta do gene frente a diferentes fontes de nitrogênio. Os valores representam a média de experimentos com duas replicatas biológicas e duas replicatas técnicas cada. As barras pretas indicam o desvio padrão.



(A)



(B)



(C)

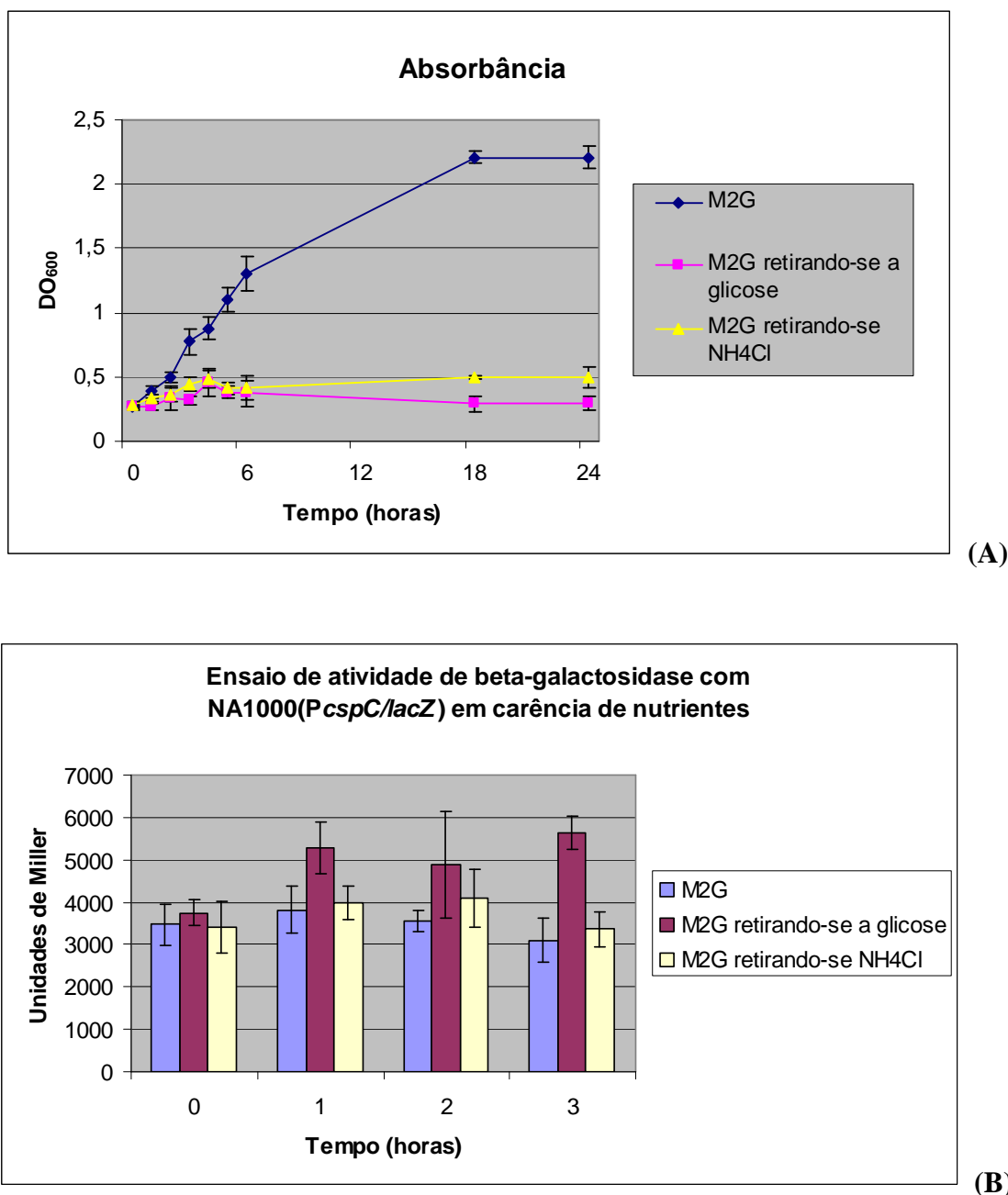


Figura 29. Avaliação do crescimento e estudo da atividade do promotor de *cspC* em condições de carência nutricional. Culturas de NA1000 carregando o plasmídeo *P_{cspC}/lacZ* foram crescidas em meio M2G a 30 °C até uma absorbância de 0,3, quando as culturas foram centrifugadas e os meios foram substituídos por M2G, M2 sem glicose ou M2G sem cloreto de amônio. O crescimento foi monitorado pela medida de densidade óptica (A). Em (B), estão os resultados de ensaios de β-galactosidase com estas culturas. Os valores representam a média de experimentos com três replicatas biológicas e três replicatas técnicas. As barras pretas indicam o desvio padrão.

Os mesmos ensaios foram feitos com NA1000 portando a construção $P_{H_2}/lacZ$. Nota-se, pela figura 28A, que o perfil de absorvância desta linhagem em diferentes meios segue o mesmo padrão apresentado por NA1000($P_{cspC}/lacZ$) (Fig. 27A). Pelos resultados dos ensaios de β -galactosidase (Fig. 28B e 28C), percebe-se também que os níveis de atividade do promotor de *cspC* sem a região ativadora obedeceram ao mesmo padrão apresentado pela construção com a região regulatória íntegra: há grande indução nos meios com peptona, e a indução é menor com a presença de glicose nos meios derivados de M2. Apesar de parecer haver diferenças entre as expressões nos meios M2P e M2P(-N) (Fig. 28C), não acreditamos que elas sejam reais, porque a expressão de M2P já se encontra mais alta que a de M2P(-N) no início deste experimento. Além disso, os meios M2GP e M2GP(-N) não apresentam diferenças entre si, como acontece com NA1000($P_{cspC}/lacZ$). Acreditamos, portanto, que em NA1000($P_{H_2}/lacZ$), também não houve diferenças significativas na atividade de β -galactosidase entre diferentes fontes de nitrogênio. Conclui-se que a região ativadora de *cspC* não é necessária nem para a indução específica de fase estacionária, nem para a indução em condições nutricionais diferenciadas. Porém, em todos os meios de cultura analisados, a atividade do promotor de *cspC* sem a região ativadora foi de 1,5-2,5 vezes menor que a da construção contendo esta região, corroborando a hipótese de que a região ativadora é necessária para os máximos níveis de expressão do gene.

Estudos realizados por microarranjos de DNA revelaram que aproximadamente 400 genes têm sua expressão variando significativamente entre culturas de *C. crescentus* crescidas em PYE, M2G e M2 suplementado com xilose (M2X) (HOTTES et al., 2004). Segundo estes autores, a classe de genes mais induzida em PYE é a relacionada a vias de degradação de aminoácidos. Já a maioria dos genes induzidos em meio mínimo incluem enzimas de biossíntese de aminoácidos, relacionados à incorporação de amônia e sulfato em glutamato e cisteína. No estudo de Hottes et al. (2004), o gene *cspC* de *C. crescentus* não apresentou variação de expressão entre PYE, M2G e M2X, contrariamente ao observado neste trabalho, em que o promotor do gene apresenta maior atividade em PYE em relação a M2G. Porém, como este trabalho e aquele realizado por Hottes et al. (2004) utilizam metodologias distintas, é possível que a discrepância observada seja ocasionada pelas abordagens diferenciadas.

O perfil de expressão de *cspD* de *C. crescentus* em diferentes meios obedece aos mesmos padrões de *cspC* (SILVA, 2008⁵), o que poderia ser um indício de que ambos os genes possuem regulações semelhantes. Em nosso laboratório, a aluna Carolina Antunes do Prado Tavares da Silva realizou uma varredura de uma biblioteca de mutantes (ITALIANI; ZULETA; MARQUES, 2002), buscando genes cuja interrupção causasse diminuição da expressão de *cspD*. Um desses genes é o quadro aberto de leitura CCNA_00247, que codifica um regulador de resposta de sistema de dois componentes. Este regulador de resposta mostrou possuir um papel de ativação sobre o gene *cspD*, e foi averiguado se ele teria o mesmo papel sobre *cspC*, dadas as semelhanças nas condições de expressão entre os dois genes. Para isso, o ensaio de atividade de β -galactosidase em diferentes meios também foi realizado com culturas de NA1000 CCNA_00247::Tn5 portando a construção *PcspC/lacZ*. No entanto, o padrão de expressão do gene foi o mesmo de NA1000 portando a mesma construção (resultados não mostrados), o que indica que o provável regulador de *cspD* não é o mesmo, se existente, de *cspC*.

4.5.2 Análise da resposta do gene *cspC* a condições de carência nutricional

Como forma de simular uma condição controlada de carência nutricional, culturas de NA1000 portando a região regulatória íntegra de *cspC* à frente do gene repórter *lacZ* foram crescidas em meio M2G até chegarem ao meio da fase exponencial ($DO_{600} = 0,3$). Nesse momento, as células foram lavadas e os meios foram substituídos pelo mesmo meio sem glicose ou sem cloreto de amônio, a fim de avaliar a resposta do gene frente às duas condições. A figura 29 mostra os resultados obtidos. O crescimento das culturas cessou ao se retirar tanto a glicose como o cloreto de amônio do meio (Fig. 29A), enquanto que no meio M2G houve crescimento normal. Quanto à atividade do promotor de *cspC* (Fig. 29B), nota-se que houve um aumento significativo desta na condição sem glicose, o que reforça a hipótese de que a glicose seja um inibidor da expressão do gene. Esta repressão por glicose poderia ser mediada pela proteína CRP, segundo o sistema de repressão catabólica descrita para *E. coli* (STÜLKE e HILLEN, 1999). Em *C. crescentus* NA1000, existe um ortólogo de CRP caracterizado como um regulador transcricional, correspondente ao quadro aberto de leitura CCNA_01478. Em

⁵ SILVA, C. A. P. T. São Paulo, 2008 (comunicação pessoal).

contrapartida, a indução de *cspC* não ocorreu no meio sem cloreto de amônio. Considerando que os ensaios foram feitos ainda em fase exponencial, pode-se sugerir que a indução da expressão do gene *cspC* na fase estacionária, em condições normais de crescimento, está correlacionada à carência nutricional típica desta fase do crescimento bacteriano.

A diversidade de condições às quais as CSPs respondem é evidente em diversas espécies bacterianas. Em *E. coli*, por exemplo, além das CSPs induzidas por choque frio, há CspC e CspE, envolvidas na divisão celular e possivelmente na condensação do cromossomo a 37 °C (YAMANAKA et al., 1994). Em *Listeria monocytogenes*, CspA e CspD são induzidas sob estresse osmótico causado por NaCl (SCHMID et al., 2009). Os vários aspectos fisiológicos de atuação das CSPs em bactérias pressupõem regulações distintas, mas, por serem proteínas relacionadas de estrutura semelhante, provavelmente compartilham um mecanismo geral de ação (GRAUMANN e MARAHIEL, 1998).

Outra CSP de *E. coli* não induzida pelo choque frio é CspD, induzida na fase estacionária e em carência nutricional (YAMANAKA e INOUE, 1997), condições em que se observou indução de *cspC* em *C. crescentus*. Em *E. coli*, a indução de *cspD* em fase estacionária não depende do fator σ^S , mas tem ppGpp como um dos fatores positivos para sua regulação (YAMANAKA e INOUE, 1997). A indução do gene em fase estacionária ocorre tanto em meio rico quanto em meio mínimo contendo glicose e casaminoácidos. No entanto, a expressão de *cspD* de *E. coli* é inversamente proporcional à taxa de crescimento: em meio rico ou meio mínimo contendo glicose (resultando em taxas de crescimento relativamente altas), a expressão de *cspD* é baixa. Já em meio mínimo contendo acetato ou glicerol (resultando em taxa de crescimento baixa), a expressão de *cspD* é bastante induzida (YAMANAKA e INOUE, 1997). Em meio mínimo contendo apenas 20% da concentração padrão de glicose, *cspD* também teve sua expressão induzida, indicando que este gene responde a condições de carência de carbono (YAMANAKA e INOUE, 1997). As condições a que o gene *cspC* de *C. crescentus* responde apresentam muitas similaridades com as mencionadas para o gene *cspD* de *E. coli*.

Apesar de o gene *cspC* não ser induzido sob choque frio em *C. crescentus*, é intrigante a existência de domínios de choque frio em uma proteína cuja expressão é induzida sob carência nutricional, um fato recorrente em muitas outras espécies bacterianas. Estudos com *B. subtilis* têm auxiliado na compreensão da interligação entre diferentes tipos de estresse (BRIGULLA et al., 2003). A regulação do fator σ^B de

resposta geral a estresses depende de duas fosfatases, RsbU e RsbP, que indiretamente ativam este fator sigma (PRICE, 2000). RsbU tem sua atividade influenciada por estresses ambientais, como choque de calor, osmolaridade e etanol. Já RsbP atua sob estresses metabólicos, como limitação de glicose, fosfato ou oxigênio. Quando células de *B. subtilis* são submetidas a choque frio, a ativação de σ^B não é mediada pela via de estresses ambientais, mas há uma pequena participação da via de estresses metabólicos (BRIGULLA et al., 2003). Logo, existe uma nova via desconhecida para ativação de σ^B sob choque frio em *B. subtilis*; porém, o fato de não haver ativação da via de estresses ambientais levanta um questionamento sobre os efeitos fisiológicos do choque frio sobre a célula, que sente parte deste estímulo como um estresse metabólico ou interno, e não como um estresse ambiental ou externo. Entretanto, o estudo do regulon de σ^B não revelou nenhuma proteína com função específica para crescimento contínuo em baixas temperaturas (BRIGULLA et al., 2003), indicando que o estresse causado por baixas temperaturas pode ter efeitos sobrepostos a outros estresses que ativam o fator σ^B .

Acreditava-se que a inibição da tradução durante o choque frio fosse devida apenas à diminuição da cinética celular em baixa temperatura; porém, foi identificada em *E. coli* uma proteína ligante de ribossomos, induzida sob choque frio, que inibe ativamente a tradução (WILSON e NIERHAUS, 2004). Esta proteína, denominada RaiA ou proteína Y, também é induzida durante a fase estacionária (MAKI; YOSHIDA; WADA, 2000). Em ambas as situações, esta proteína se associa com os ribossomos, e foi proposto que ela interfere com a elongação, diminuindo a acuidade da tradução e competindo com aminoacil-tRNAs pela ligação ao sítio A do ribossomo (WILSON e NIERHAUS, 2004). Nesse caso, observa-se mais uma conexão entre o estresse por baixas temperaturas e a fase estacionária.

4.6 Detecção de CspC e CspD em diferentes linhagens de *C. crescentus*

As proteínas CspC e CspD de *C. crescentus* foram expressas em *E. coli* para purificação e posterior obtenção de anticorpos policlonais, a fim de detectar estas proteínas em diferentes linhagens de nosso laboratório e corroborar o peso molecular destas.

De acordo com Lang e Marques (2004), a proteína CspD possuiria 21,5 kDa, e a expressão da proteína em *E. coli* resultou em uma banda de 27 kDa, condizente com o tamanho proposto de CspD mais a cauda de histidina acrescentada pelo vetor de expressão (Fig. 30). Esta proteína se mostrou solúvel e foi purificada com êxito por cromatografia de afinidade em resina de níquel. O soro anti-CspD foi obtido por imunização de coelho, sendo utilizado para confirmar o peso molecular da proteína CspD e a deleção do gene na linhagem ΔD (LANG e MARQUES, 2004) (Fig. 30). Entretanto, o título do soro não foi tão alto quanto o desejado, talvez por causa da pequena quantidade de proteína purificada utilizada para imunizar o coelho. De qualquer forma, em outros experimentos (descritos abaixo), este anti-soro foi utilizado em uma diluição baixa, com uma concentração alta de extrato protéico aplicado em géis de poliacrilamida-SDS, para garantir o reconhecimento da banda correspondente a CspD e sua visualização.

Com relação ao soro anti-CspC, foi feita uma reação de PCR para amplificar a seqüência considerada correta do gene *cspC*, que codifica uma proteína de dois CSDs. Como se pode ver na figura 31, houve indução da proteína, e o tamanho proposto para CspC a partir da nova seqüência do gene (18,2 kDa) foi corretamente obtido em *E. coli*, visto que a cauda de histidina acrescenta alguns quilodáltons (em geral, 3-7) à proteína expressa. A proteína foi purificada com êxito por cromatografia de afinidade em resina de níquel, dada sua presença na fração solúvel do sonicado, e o soro foi obtido do mesmo modo que o soro anti-CspD, por imunização de coelho. A especificidade do soro foi confirmada por *Western blot* (ver Fig. 18), o qual se mostrou útil na detecção direta da mutação do gene *cspC* na linhagem ΔC e na confirmação do tamanho de 18 kDa da proteína *in vivo*.

Antes de se ter conhecimento da nova seqüência de *cspC*, um fragmento correspondente ao gene truncado foi obtido do vetor TOPO + 1,2 kb, por PCR. Este fragmento foi clonado no vetor de expressão pProEX e se tentou induzir a expressão da proteína com IPTG; porém, não foi observada a indução com esta construção (dados

não mostrados). Posteriormente, com a descoberta da nova sequência do gene, o fragmento correspondente a esta nova sequência foi clonado no vetor de expressão, e a indução da proteína pôde ser observada (Fig. 31). Estes dados apóiam a correlação entre o gene *cspC* de *C. crescentus* e o gene homônimo de *E. coli*, que apresenta alta variabilidade genética, indicando uma seleção para a perda da expressão deste gene (RATH e JAWALI, 2006). No entanto, tendo em vista que a ausência da expressão de *cspC* em *C. crescentus* resulta em maior queda de viabilidade (Fig. 22), não se sabe a relevância fisiológica desta recombinação intragênica. Possivelmente, este evento é estocástico e não implica necessariamente em aumento do *fitness*, não havendo pressão seletiva para sua ocorrência. Aliado a esta noção, está o fato de que reações de PCR na região do gene *cspC* de NA1000 resultaram em ampliações recorrentes da sequência maior, e ampliações ocasionais e minoritárias da sequência menor do gene (dados não mostrados), evidenciando que não há pressão seletiva para o truncamento de *cspC*.

Tendo em vista a correlação entre carência de carbono, fase estacionária e o nucleotídeo ppGpp, é possível que os resultados observados nos ensaios de carência nutricional e nos diferentes meios de cultura (item 4.5) indiquem que a expressão do gene *cspC* seja regulada por ppGpp, como é o caso do gene *cspD* de *E. coli* (YAMANAKA e INOUE, 1997). Há indícios de que *cspD* de *C. crescentus* também seja regulado por ppGpp, tendo em vista que sua indução em fase estacionária e seu perfil de expressão em diferentes condições nutricionais são semelhantes aos observados para *cspC* (SILVA, 2008⁶). Em nosso laboratório, a linhagem $\Delta spoT$ foi construída por Carolina Antunes do Prado Tavares da Silva e Ricardo Ruiz Mazzon, e foi utilizada em ensaios de *immunoblot* para averiguar esta questão.

Foram realizados ensaios de *Western blot* com os anti-soros obtidos para verificar a presença e possível compensação entre CSPs nos diferentes mutantes de nosso laboratório. Primeiramente, o soro anti-CspD foi testado nas linhagens NA1000, ΔD e $\Delta spoT$ (Fig. 32). Os níveis de CspD detectados na linhagem $\Delta spoT$ se apresentam menores que em NA1000, indicando que a molécula ppGpp, cuja produção inexistente neste mutante, está envolvida na via de ativação de *cspD*. No entanto, estes ensaios foram preliminares, e a revelação das bandas de CspD se encontra dificultada pelo baixo título do soro.

⁶ SILVA, C. A. P. T. São Paulo, 2008 (comunicação pessoal).

A figura 33 mostra um ensaio de *Western blot* com soro anti-CspC nas linhagens NA1000, ΔD e ΔABD , para verificar as quantidades relativas da proteína em cada linhagem. Esperava-se que nos mutantes de outras CSPs, a proteína CspC estivesse mais expressa em relação a NA1000, de acordo com a hipótese de compensação entre CSPs; no entanto, não foi este o observado. É possível que não haja necessidade de compensação no tempo de 48 horas, e por isso ela não tenha sido observada nos ensaios. Estes ensaios foram preliminares e a padronização destes poderá fornecer informações interessantes sobre os mecanismos regulatórios da expressão das CSPs de *C. crescentus*.

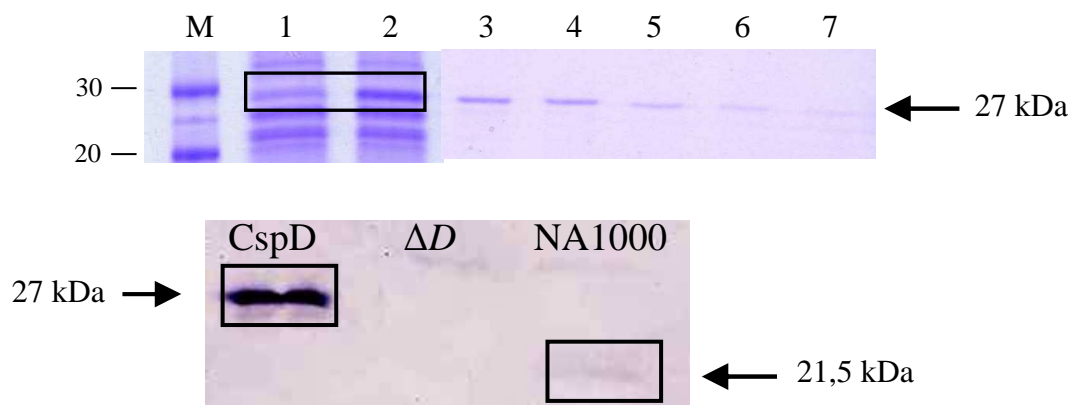


Figura 30. Purificação da proteína CspD em *E. coli* e Western blot com soro anti-CspD.

Acima, gel de poliacrilamida-SDS 12% contendo extratos de *E. coli* DH5 α sem IPTG (canaleta 1) e superexpressando CspD com IPTG (canaleta 2). A caixa indica as bandas correspondentes a CspD. As canaletas de 3 a 7 mostram os passos de purificação de CspD por cromatografia de afinidade em resina de níquel, com 100, 200, 300, 400 e 500 mM de imidazol, respectivamente. M indica o marcador de peso molecular. Abaixo, Western blot com soro anti-CspD (1:250) obtido a partir de imunização de coelho. Foram aplicados extratos da proteína CspD purificada (27 kDa com a cauda de histidina), de *C. crescentus* NA1000 $\Delta cspD$ (ΔD) e de *C. crescentus* NA1000. O anticorpo reconheceu a banda de 21,5 kDa em NA1000, correspondente à proteína CspD *in vivo*, mas não no mutante ΔD , confirmando o fenótipo deste.

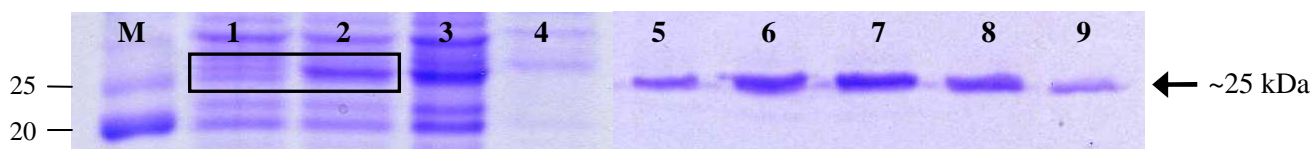


Figura 31. Indução e purificação da proteína CspC em *E. coli* DH5 α .

Em 1, extrato de cultura sem IPTG; em 2, extrato de cultura superexpressando CspC com IPTG. A caixa indica as bandas correspondentes a CspC. A canaleta 3 mostra a fração solúvel obtida a partir da sonicação das culturas, que contém CspC, ao contrário da fração insolúvel (canaleta 4). Nas canaletas de 5 a 9, os passos de purificação de CspC por cromatografia de afinidade em resina de níquel, com 100, 200, 300, 400 e 500 mM de imidazol, respectivamente. M indica o marcador de peso molecular.

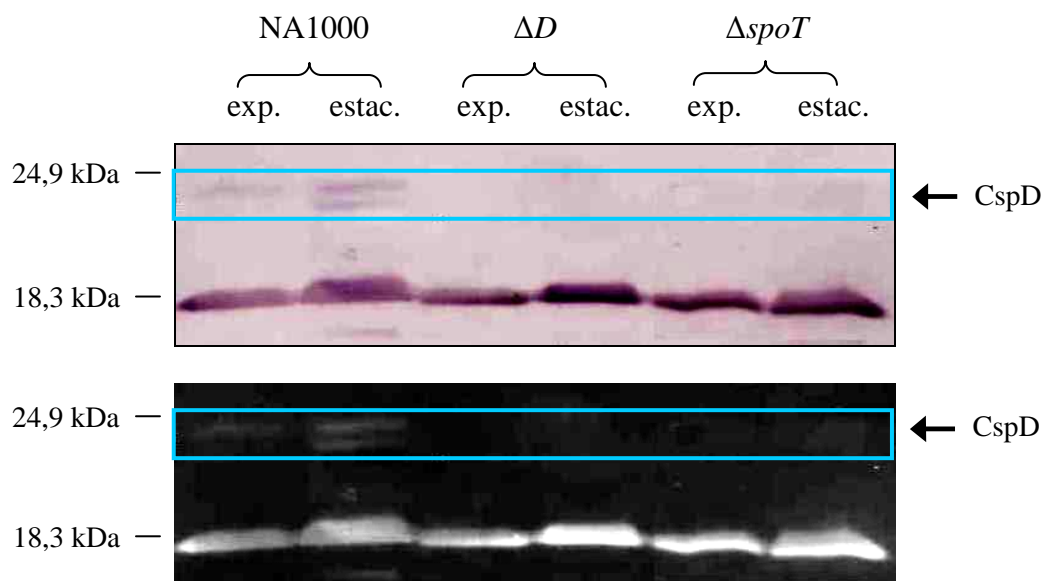


Figura 32. Western blot com soro anti-CspD. As linhagens indicadas foram cultivadas em PYE e alíquotas foram retiradas para a extração das proteínas, em fase exponencial e após 48 horas de crescimento, em fase estacionária. Foram aplicados 25 μ g de cada extrato em gel de poliacrilamida-SDS 12%. Após a transferência das proteínas para filtro de nitrocelulose, foi feito um ensaio de *immunoblot* com soro anti-CspD (1:50) para avaliar a presença e quantidade da proteína em cada linhagem. Acima, o filtro de nitrocelulose revelado; abaixo, negativo da imagem, para facilitar a visualização. As caixas azuis indicam a posição da proteína CspD, que aparece na forma de duas bandas, possivelmente devido a diferentes isoformas. A banda forte na parte de baixo do filtro é uma proteína reconhecida inespecificamente pelo anti-soro, já presente no soro pré-imune do coelho utilizado.

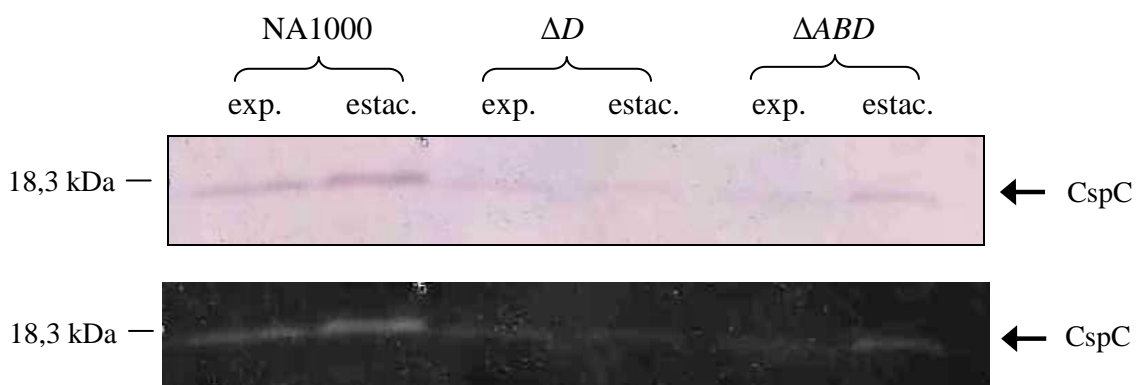


Figura 33. Western blot com soro anti-CspC. As linhagens indicadas foram cultivadas em PYE e alíquotas foram retiradas para a extração das proteínas, em fase exponencial e após 48 horas de crescimento, em fase estacionária. Foram aplicados 25 μ g de cada extrato em gel de poliacrilamida-SDS 12%. Após a transferência das proteínas para filtro de nitrocelulose, foi feito um ensaio de *immunoblot* com soro anti-CspC (1:1000) para avaliar a presença e quantidade da proteína em cada linhagem. Acima, o filtro de nitrocelulose revelado; abaixo, negativo da imagem, para facilitar a visualização.

4.7 Análise do padrão de expressão protéica de NA1000 e ΔC

As CSPs já caracterizadas de outras bactérias estão envolvidas em importantes processos celulares, como replicação e regulação da transcrição e da tradução. O envolvimento nestes processos poderia levar a um efeito pleiotrópico na ausência destas CSPs, acarretando em alterações no perfil de expressão protéica. A fim de se averiguar eventuais mudanças no padrão geral de expressão protéica decorrentes da deleção de *cspC*, extratos protéicos de *C. crescentus* NA1000 e ΔC , incubados em PYE por 48 horas a 30 °C, foram analisados por eletroforese bidimensional. Escolheu-se o tempo de 48 horas porque é quando a expressão de *cspC* está presumivelmente alta, com base nos resultados de ensaios de β -galactosidase (ver Fig. 26). A quantidade de proteína aplicada foi de 200 μ g por gel, e a coloração foi feita com Coomassie Blue G-250, por apresentar menor coloração de fundo e mais contraste dos *spots*. A figura 34 mostra os géis obtidos.

Com estes géis, procurou-se identificar o *spot* correspondente a CspC, com peso molecular igual a 18,2 kDa e pI (ponto isoelétrico) calculado de 6,85. Este *spot* deveria ser observado no gel referente a NA1000, mas não naquele referente a ΔC . No entanto, não foi possível observar o *spot* correspondente em NA1000 (Fig. 34). É possível que a quantidade de proteína total aplicada e o método de coloração não tenham permitido uma visualização adequada do *spot* correspondente a CspC; outra possibilidade é a de que o pI real de CspC seja um pouco mais básico que o calculado, ultrapassando o valor de 7,0 e caindo em uma faixa de pH não detectada pela tira de primeira dimensão utilizada.

Nestes géis, pode-se observar uma leve “repetição” de *spots* no canto superior esquerdo (Fig. 34), indicando a presença de proteínas de mesmo peso molecular, mas com pIs levemente diferentes. Em géis bidimensionais, este padrão de *spots* indica a ocorrência de diferentes isoformas de uma mesma proteína, e também pôde ser observado em géis de referência com extrato de *C. crescentus* CB15, disponibilizados na Internet (SWISS-CZECH PROTEOMICS SERVER, 2009). Este padrão, conhecido como *protein stuttering*, é típico de amostras protéicas de culturas bacterianas em fase estacionária, pois nesta fase ocorre um aumento súbito na oxidação de proteínas e erros na incorporação de aminoácidos, produzindo isoformas aberrantes que aparecem com pIs levemente diferentes (BALLESTEROS et al., 2001; NYSTRÖM, 2004).

Como os géis não ficaram idênticos quanto à focalização, não foi possível compará-los estatisticamente com o uso de softwares para análise de imagem. Estes géis, no entanto, puderam fornecer informações sobre proteínas abundantes em *C. crescentus* durante a fase estacionária, utilizando como referência um banco de dados de proteínas da linhagem CB15 (SWISS-CZECH PROTEOMICS SERVER, 2009). De acordo com a figura 34, os *spots* 1 e 2 poderiam corresponder a fatores de alongação da síntese protéica, codificados pelos quadros abertos de leitura CC1922 e CC3199 em CB15, sendo o segundo notavelmente abundante na célula, tanto em *Caulobacter crescentus* quanto em *E. coli* (BOSCH et al., 1994). O *spot* 3 poderia corresponder a CC3655 em CB15, que codifica uma malato desidrogenase, enzima que participa de vias metabólicas importantes, como o ciclo de Krebs e o metabolismo do piruvato. O *spot* 4, que provavelmente corresponde a CC1269 em CB15, pode consistir em uma adenilato quinase, participando do metabolismo de purinas. O *spot* 5 (CC1360) pode corresponder a um antiterminador de transcrição denominado NusB, e o *spot* 6 (CC0888) pode corresponder a uma subunidade da riboflavina sintase. Todas estas proteínas são consideradas importantes componentes do metabolismo da célula, controlando funções imprescindíveis como geração de energia, produção de precursores biossintéticos e regulação de transcrição. Por fim, o *spot* 7 (CC0686) provavelmente consiste na chaperone codificada por *groES*, fazendo parte de um operon induzido por choque de calor em *C. crescentus*, mas que também se mostrou com maior expressão em células pré-divisionais a 30 °C (AVEDISSIAN e GOMES, 1996; GOMES et al., 1986). Como a maioria das células de *C. crescentus* em fase estacionária se encontra no estágio pré-divisional (WORTINGER; QUARDOKUS; BRUN, 1998), explica-se a presença desta proteína nos géis bidimensionais.

Os géis bidimensionais obtidos foram analisados através de comparação com um banco de dados, o que limitou a identificação das proteínas diferencialmente expressas entre ambos. Sem dúvida, a análise experimental mostra-se necessária para um maior entendimento dos efeitos da deleção de *cspC* sobre a expressão protéica de *C. crescentus*. No entanto, pode-se observar pela figura 34 que o perfil geral de expressão é similar entre NA1000 e ΔC nas condições estudadas. Portanto, a ausência de CspC não alterou drasticamente o padrão geral de proteínas no mutante em relação a NA1000. Em outras bactérias, as CSPs já caracterizadas possuem, em geral, papéis na regulação da transcrição ou tradução. Se CspC de *C. crescentus* seguir este padrão, é possível que a regulação não seja global, atingindo alguns poucos alvos e impossibilitando a detecção

de grandes distinções entre a linhagem selvagem e a mutante, em nível protéico. Não se pode descartar, também, que outras CSPs de *C. crescentus* estejam atuando no lugar de CspC, compensando a ausência desta proteína na célula.

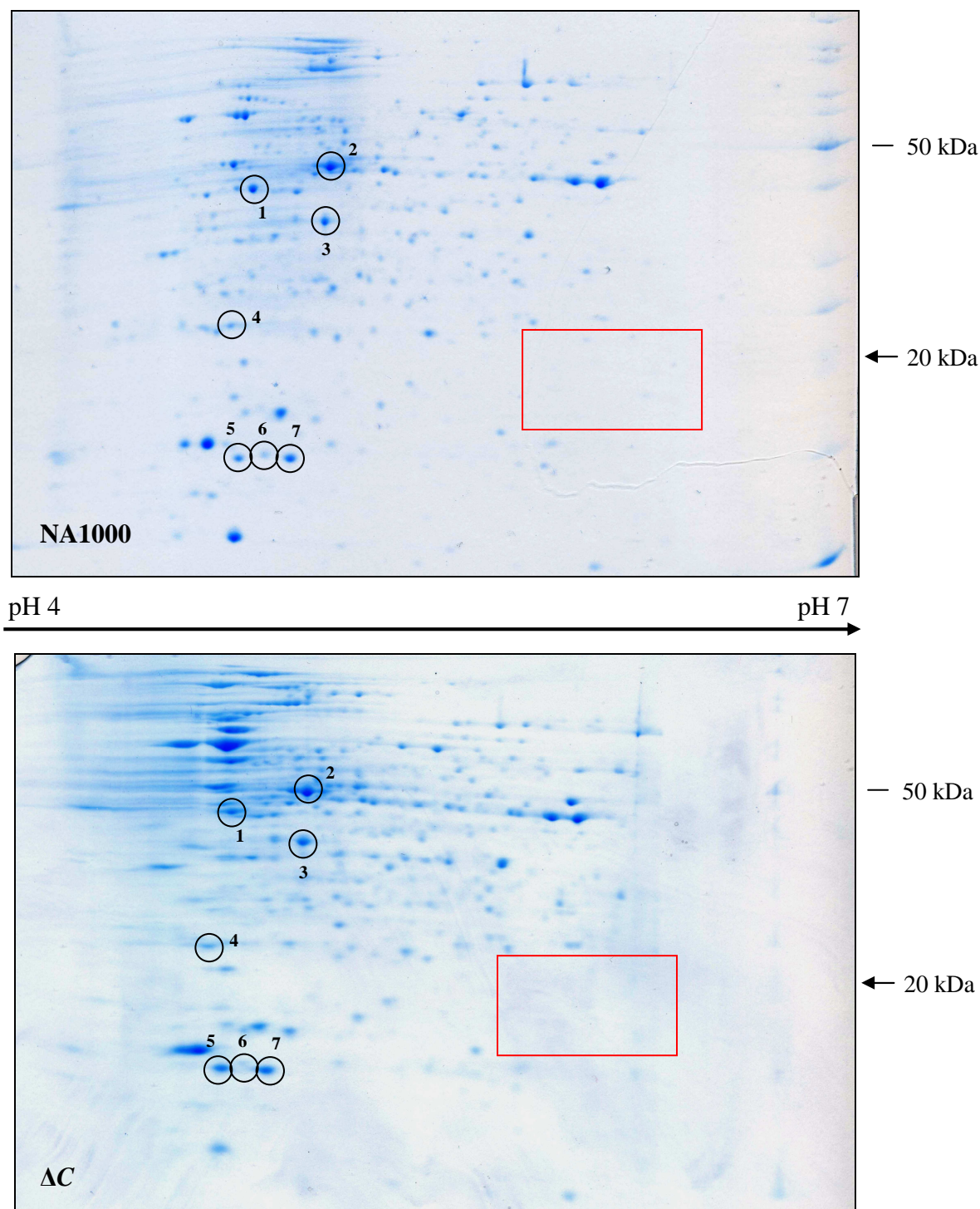


Figura 34. Géis bidimensionais de extratos de culturas de NA1000 e ΔC incubadas a 30 °C por 48 horas. Duzentos microgramas de amostra foram utilizados para re-hidratar géis de primeira dimensão (Immobiline DryStrip Gel pH 4-7 L, GE Healthcare), os quais foram aplicados sobre géis de poliacrilamida-SDS 12,5% para separação das proteínas por massa molecular. As caixas vermelhas representam a região onde se deveria observar a presença da proteína CspC em NA1000, e sua ausência em ΔC . No entanto, os *spots* de NA1000 nessa região estão muito fracos para permitir a identificação de CspC. Os círculos numerados indicam *spots* identificados através de comparação com um banco de dados referente a *Caulobacter crescentus* CB15: 1, CC1922; 2, CC3199; 3, CC3655; 4, CC1269; 5, CC1360; 6, CC0888; e 7, CC0686.

5 CONCLUSÕES

Foi determinada experimentalmente uma nova seqüência para o gene *cspC* de *C. crescentus*, diferente da anotada no GenBank. Esta nova seqüência codifica uma proteína de choque frio de dois domínios CSD, como CspD. O mutante $\Delta cspC::\Omega spec$ apresentou menor viabilidade sob choque frio e uma queda acentuada na viabilidade em fase estacionária precoce, além de alterações morfológicas durante toda a fase estacionária a 30 °C. Estes resultados indicam que *cspC* possui papel tanto na fase estacionária do crescimento quanto no choque frio.

As posições do promotor e da região ativadora do gene foram confirmadas, e verificou-se que a indução em fase estacionária depende do promotor e a região ativadora é necessária para os níveis máximos de expressão. Ensaio de expressão foram realizados para determinar a resposta do gene *cspC* a diferentes condições de carência nutricional, revelando que o mesmo possui uma resposta de indução frente à carência de glicose no meio de cultura. A atividade do promotor deste gene, no entanto, não foi alterada pela carência de nitrogênio, indicando a especificidade da expressão do gene em responder à situação nutricional da célula quanto às fontes de carbono utilizadas. Pode-se concluir que a indução de *cspC* durante a fase estacionária não ocorre somente devido à entrada nesta fase *per se*, mas também é influenciado pelo estado nutricional da célula, uma vez que culturas ainda em crescimento exponencial tiveram o gene induzido quando se retirou a glicose do meio.

Os anticorpos policlonais obtidos contra as proteínas CspC e CspD permitiram a confirmação dos mutantes para os genes correspondentes e a corroboração do peso molecular predito para as proteínas. Ensaio de *immunoblot* preliminares indicaram que *cspD* poderia ser regulado por ppGpp, e a análise do perfil protéico do mutante $\Delta cspC::\Omega spec$ revelou que a ausência de *cspC* não acarretou em mudanças drásticas no padrão de expressão protéica de *C. crescentus*.

REFERÊNCIAS⁷

- ABYZOV, S. S.; MITSKEVICH, I. N.; POGLAZOVA, M. N.; BARKOV, N. I.; LIPENKOV, V. Y.; BOBIN, N. E.; KOUDRYASHOV, B. B.; PASHKEVICH, V. M.; IVANOV, M. V. Microflora in the basal strata at Antarctic ice core above the Vostok lake. **Adv. Space Res.**, v. 28, n. 4, p. 701-706, 2001.
- ALVAREZ-MARTINEZ, C. E.; LOURENCO, R. F.; BALDINI, R. L.; LAUB, M. T.; GOMES, S. L. The ECF sigma factor sigma(T) is involved in osmotic and oxidative stress responses in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 66, n. 5, p. 1240-1255, 2007.
- ARTSIMOVITCH, I.; PATLAN, V.; SEKINE, S.; VASSYLYEVA, M. N.; HOSAKA, T.; OCHI, K.; YOKOYAMA, S.; VASSYLYEV, D. G. Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 299-310, 2004.
- AUSMEES, N.; KUHN, J. R.; JACOBS-WAGNER, C. The bacterial cytoskeleton: an intermediate filament-like function in cell shape. **Cell**, v. 115, n. 6, p. 705-713, 2003.
- AUSUBEL, F.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E.; MOORE, D. D.; SEIDMAN, J. G.; SMITH, J. A.; STRUHL, K. (Ed.). **Short protocols in molecular biology**. New York: John Wiley & Sons, 1995. 900 p.
- AVEDISSIAN, M.; GOMES, S. L. Expression of the *groESL* operon is cell-cycle controlled in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 19, n. 1, p. 79-89, 1996.
- BAE, W.; XIA, B.; INOUE, M.; SEVERINOV, K. *Escherichia coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 97, n. 14, p. 7784-7789, 2000.
- BALLESTEROS, M.; FREDRIKSSON, A.; HENRIKSSON, J.; NYSTRÖM, T. Bacterial senescence: protein oxidation in non-proliferating cells is dictated by the accuracy of the ribosomes. **Embo J.**, v. 20, n. 18, p. 5280-5289, 2001.
- BALZER, G. J.; MCLEAN, R. J. The stringent response genes *relA* and *spoT* are important for *Escherichia coli* biofilms under slow-growth conditions. **Can. J. Microbiol.**, v. 48, n. 7, p. 675-680, 2002.
- BANDZIULIS, R. J.; SWANSON, M. S.; DREYFUSS, G. RNA-binding proteins as developmental regulators. **Genes Dev.**, v. 3, n. 4, p. 431-437, 1989.

⁷ De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BECKER, L. A.; EVANS, S. N.; HUTKINS, R. W.; BENSON, A. K. Role of sigma(B) in adaptation of *Listeria monocytogenes* to growth at low temperature. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 24, p. 7083-7087, 2000.

BOSCH, L.; KRAAL, B.; VAN DER MEIDE, P. H.; DUISTERWINKEL, F. J.; VAN NOORT, J. M. The elongation factor Ef-Tu and its two encoding genes. In: DAVIDSON, J. M.; COHN, W. E.; MOLDAVE, K. (Ed.). **Progress in nucleic acid research and molecular biology**. New York: Academic Press, 1994. p. 91-126.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRANDI, A.; PON, C. L.; GUALERZI, C. O. Interaction of the main cold shock protein CS7.4 (CspA) of *Escherichia coli* with the promoter region of *hns*. **Biochimie**, v. 76, n. 10-11, p. 1090-1098, 1994.

BRIGULLA, M.; HOFFMANN, T.; KRISP, A.; VOLKER, A.; BREMER, E.; VOLKER, U. Chill induction of the SigB-dependent general stress response in *Bacillus subtilis* and its contribution to low-temperature adaptation. **J. Bacteriol.**, v. 185, n. 15, p. 4305-4314, 2003.

BRUN, Y. V.; JANAKIRAMAN, R. The dimorphic life cycle of *Caulobacter* and stalked bacteria. In: BRUN, Y. V.; SHIMKETS, L. J. (Ed.). **Prokaryotic development**. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 2000. p. 297-318.

CHATTERJEE, D. K.; BOURQUIN, A. W. Metabolism of aromatic compounds by *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 169, n. 5, p. 1993-1996, 1987.

CHEN, W. P.; KUO, T. T. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, n. 9, p. 2260, 1993.

DERZELLE, S.; HALLET, B.; FERAIN, T.; DELCOUR, J.; HOLS, P. Improved adaptation to cold-shock, stationary-phase, and freezing stresses in *Lactobacillus plantarum* overproducing cold-shock proteins. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 69, n. 7, p. 4285-4290, 2003.

DOI, R. H.; WANG, L. F. Multiple procaryotic ribonucleic acid polymerase sigma factors. **Microbiol. Rev.**, v. 50, n. 3, p. 227-243, 1986.

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

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

FANG, L.; JIANG, W.; BAE, W.; INOUE, M. Promoter-independent cold-shock induction of *cspA* and its derepression at 37 degrees C by mRNA stabilization. **Mol. Microbiol.**, v. 23, n. 2, p. 355-364, 1997.

FAURE, D.; FREDERICK, R.; WLOCH, D.; PORTIER, P.; BLOT, M.; ADAMS, J. Genomic changes arising in long-term stab cultures of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 19, p. 6437-6442, 2004.

FERBER, D. M.; KHAMBATY, F.; ELY, B. Utilization of histidine by *Caulobacter crescentus*. **J. Gen. Microbiol.**, v. 134, n. 8, p. 2149-2154, 1988.

FIGGE, R. M.; GOBER, J. W. Cell shape, division and development: the 2002 American Society for Microbiology (ASM) conference on prokaryotic development. **Mol. Microbiol.**, v. 47, n. 5, p. 1475-1483, 2003.

FISCHER, B.; RUMMEL, G.; ALDRIDGE, P.; JENAL, U. The FtsH protease is involved in development, stress response and heat shock control in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 44, n. 2, p. 461-478, 2002.

FRANCEZ-CHARLOT, A.; FRUNZKE, J.; REICHEN, C.; EBNETER, J. Z.; GOURION, B.; VORHOLT, J. A. Sigma factor mimicry involved in regulation of general stress response. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 106, n. 9, p. 3467-3472, 2009.

GALPERIN, M. Y. Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. **J. Bacteriol.**, v. 188, n. 12, p. 4169-4182, 2006.

GASTEIGER, E.; GATTIKER, A.; HOOGLAND, C.; IVANYI, I.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. ExPASy: The proteomics server for in-depth protein knowledge and analysis. **Nucleic Acids Res.**, v. 31, n. 13, p. 3784-3788, 2003.

GIANGROSSI, M.; EXLEY, R. M.; LE HEGARAT, F.; PON, C. L. Different *in vivo* localization of the *Escherichia coli* proteins CspD and CspA. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 202, n. 2, p. 171-176, 2001.

GIULIODORI, A. M.; BRANDI, A.; GUALERZI, C. O.; PON, C. L. Preferential translation of cold-shock mRNAs during cold adaptation. **RNA**, v. 10, n. 2, p. 265-276, 2004.

GOBER, J. W.; SHAPIRO, L. A developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3' enhancer and IHF binding elements. **Mol. Biol. Cell**, v. 3, n. 8, p. 913-926, 1992.

GOLDBERG, M. B.; BARZU, O.; PARSOT, C.; SANSONETTI, P. J. Unipolar localization and ATPase activity of IcsA, a *Shigella flexneri* protein involved in intracellular movement. **Infect. Agents Dis.**, v. 2, n. 4, p. 210-211, 1993.

GOLDENBERG, D.; AZAR, I.; OPPENHEIM, A. B.; BRANDI, A.; PON, C. L.; GUALERZI, C. O. Role of *Escherichia coli* *cspA* promoter sequences and adaptation of translational apparatus in the cold shock response. **Mol. Gen. Genet.**, v. 256, n. 3, p. 282-290, 1997.

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

GOMES, S. L.; JULIANI, M. H.; MAIA, J. C.; SILVA, A. M. Heat shock protein synthesis during development in *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 168, n. 2, p. 923-930, 1986.

GONIN, M.; QUARDOKUS, E. M.; O'DONNOL, D.; MADDOCK, J.; BRUN, Y. V. Regulation of stalk elongation by phosphate in *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 182, n. 2, p. 337-347, 2000.

GORBATYUK, B.; MARCZYNSKI, G. T. Regulated degradation of chromosome replication proteins DnaA and CtrA in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 55, n. 4, p. 1233-1245, 2005.

GOURION, B.; FRANCEZ-CHARLOT, A.; VORHOLT, J. A. PhyR is involved in the general stress response of *Methylobacterium extorquens* AM1. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 3, p. 1027-1035, 2008.

GOURION, B.; ROSSIGNOL, M.; VORHOLT, J. A. A proteomic study of *Methylobacterium extorquens* reveals a response regulator essential for epiphytic growth. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, n. 35, p. 13186-13191, 2006.

GRALLA, J. D. *Escherichia coli* ribosomal RNA transcription: regulatory roles for ppGpp, NTPs, architectural proteins and a polymerase-binding protein. **Mol. Microbiol.**, v. 55, n. 4, p. 973-977, 2005.

GRAUMANN, P.; MARAHIEL, M. A. Some like it cold: response of microorganisms to cold shock. **Arch. Microbiol.**, v. 166, n. 5, p. 293-300, 1996.

GRAUMANN, P.; WENDRICH, T. M.; WEBER, M. H.; SCHRÖDER, K.; MARAHIEL, M. A. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures. **Mol. Microbiol.**, v. 25, n. 4, p. 741-756, 1997.

GRAUMANN, P. L.; MARAHIEL, M. A. A superfamily of proteins that contain the cold-shock domain. **Trends Biochem. Sci.**, v. 23, n. 8, p. 286-290, 1998.

_____. Cold shock proteins CspB and CspC are major stationary-phase-induced proteins in *Bacillus subtilis*. **Arch. Microbiol.**, v. 171, n. 2, p. 135-138, 1999.

GUALERZI, C. O.; GIULIODORI, A. M.; PON, C. L. Transcriptional and post-transcriptional control of cold-shock genes. **J. Mol. Biol.**, v. 331, n. 3, p. 527-539, 2003.

HALLEZ, R.; BELLEFONTAINE, A. F.; LETESSON, J. J.; DE BOLLE, X. Morphological and functional asymmetry in alpha-proteobacteria. **Trends Microbiol.**, v. 12, n. 8, p. 361-365, 2004.

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

HANANO, S.; SUGITA, M.; SUGIURA, M. Isolation of a novel RNA-binding protein and its association with a large ribonucleoprotein particle present in the nucleoplasm of tobacco cells. **Plant Mol. Biol.**, v. 31, n. 1, p. 57-68, 1996.

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

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

HIRSCH, P. Microbial life at extremely low nutrient levels. **Adv. Space Res.**, v. 6, n. 12, p. 287-298, 1986.

HOLTZENDORFF, J.; HUNG, D.; BRENDE, P.; REISENAUER, A.; VIOLLIER, P. H.; MCADAMS, H. H.; SHAPIRO, L. Oscillating global regulators control the genetic circuit driving a bacterial cell cycle. **Science**, v. 304, n. 5673, p. 983-987, 2004.

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

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

ITALIANI, V. C.; ZULETA, L. F.; MARQUES, M. V. The transcription termination factor Rho is required for oxidative stress survival in *Caulobacter crescentus*. **Mol. Microbiol.**, v. 44, n. 1, p. 181-194, 2002.

JACQUEMIN-SABLON, H.; TRIQUENEAUX, G.; DESCHAMPS, S.; LE MAIRE, M.; DONIGER, J.; DAUTRY, F. Nucleic acid binding and intracellular localization of unr, a protein with five cold shock domains. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, n. 13, p. 2643-2650, 1994.

JENAL, U. Signal transduction mechanisms in *Caulobacter crescentus* development and cell cycle control. **FEMS Microbiol. Rev.**, v. 24, n. 2, p. 177-191, 2000.

JIANG, W.; HOU, Y.; INOUE, M. CspA, the major cold-shock protein of *Escherichia coli*, is an RNA chaperone. **J. Biol. Chem.**, v. 272, n. 1, p. 196-202, 1997.

JONES, P. G.; INOUE, M. RbfA, a 30S ribosomal binding factor, is a cold-shock protein whose absence triggers the cold-shock response. **Mol. Microbiol.**, v. 21, n. 6, p. 1207-1218, 1996.

JONES, P. G.; KRAH, R.; TAFURI, S. R.; WOLFFE, A. P. DNA gyrase, CS7.4, and the cold shock response in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 174, n. 18, p. 5798-5802, 1992.

JUDD, E. M.; RYAN, K. R.; MOERNER, W. E.; SHAPIRO, L.; MCADAMS, H. H. Fluorescence bleaching reveals asymmetric compartment formation prior to cell division in *Caulobacter*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 100, n. 14, p. 8235-8240, 2003.

KARLSON, D.; NAKAMINAMI, K.; TOYOMASU, T.; IMAI, R. A cold-regulated nucleic acid-binding protein of winter wheat shares a domain with bacterial cold shock proteins. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 38, p. 35248-35256, 2002.

LA TEANA, A.; BRANDI, A.; FALCONI, M.; SPURIO, R.; PON, C. L.; GUALERZI, C. O. Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 88, n. 23, p. 10907-10911, 1991.

LANG, E. A. S. **Caracterização dos genes que codificam proteínas com domínio de choque frio em *Caulobacter crescentus***. 107 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005.

LANG, E. A. S.; MARQUES, M. V. Identification and transcriptional control of *Caulobacter crescentus* genes encoding proteins containing a cold shock domain. **J. Bacteriol.**, v. 186, n. 17, p. 5603-5613, 2004.

LANGE, R.; HENGGE-ARONIS, R. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 5, n. 1, p. 49-59, 1991.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, n. 21, p. 2947-2948, 2007.

LAUB, M. T.; CHEN, S. L.; SHAPIRO, L.; MCADAMS, H. H. Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 99, n. 7, p. 4632-4637, 2002.

LAUB, M. T.; MCADAMS, H. H.; FELDBLYUM, T.; FRASER, C. M.; SHAPIRO, L. Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. **Science**, v. 290, n. 5499, p. 2144-2148, 2000.

LESHKOWITZ, D.; ROZENBLATT, O.; NAKAMURA, T.; YANO, T.; DAUTRY, F.; CROCE, C. M.; CANAANI, E. ALL-1 interacts with unr, a protein containing multiple cold shock domains. **Oncogene**, v. 13, n. 9, p. 2027-2031, 1996.

LESLEY, J. A.; SHAPIRO, L. SpoT regulates DnaA stability and initiation of DNA replication in carbon-starved *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 190, n. 20, p. 6867-6880, 2008.

LOH, J. T.; HO, S. C.; DE FEIJTER, A. W.; WANG, J. L.; SCHINDLER, M. Carbohydrate binding activities of *Bradyrhizobium japonicum*: unipolar localization of the lectin BJ38 on the bacterial cell surface. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 90, n. 7, p. 3033-3037, 1993.

MAGNUSSON, L. U.; FAREWELL, A.; NYSTRÖM, T. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. **Trends Microbiol.**, v. 13, n. 5, p. 236-242, 2005.

MAKI, Y.; YOSHIDA, H.; WADA, A. Two proteins, YfiA and YhbH, associated with resting ribosomes in stationary phase *Escherichia coli*. **Genes Cells**, v. 5, n. 12, p. 965-974, 2000.

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

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

MCGRATH, P. T.; LEE, H.; ZHANG, L.; INIESTA, A. A.; HOTTES, A. K.; TAN, M. H.; HILLSON, N. J.; HU, P.; SHAPIRO, L.; MCADAMS, H. H. High-throughput identification of transcription start sites, conserved promoter motifs and predicted regulons. **Nat. Biotechnol.**, v. 25, n. 5, p. 584-592, 2007.

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

MITTA, M.; FANG, L.; INOUE, 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. **Mol. Microbiol.**, v. 26, n. 2, p. 321-335, 1997.

NAKAMINAMI, K.; KARLSON, D. T.; IMAI, R. Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, n. 26, p. 10122-10127, 2006.

NICHOLAS, K. B.; NICHOLAS JR., H. B.; DEERFIELD II, D. W. GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. **EMBNET.NEWS**, v. 4, p. 1-4, 1997.

NIERMAN, W. C.; FELDBLYUM, T. V.; LAUB, M. T.; PAULSEN, I. T.; NELSON, K. E.; EISEN, J. A.; HEIDELBERG, J. F.; ALLEY, M. R.; OHTA, N.; MADDOCK, J. R.; POTOCKA, I.; NELSON, W. C.; NEWTON, A.; STEPHENS, C.; PHADKE, N. D.; ELY, B.; DEBOY, R. T.; DODSON, R. J.; DURKIN, A. S.; GWINN, M. L.; HAFT, D. H.; KOLONAY, J. F.; SMIT, J.; CRAVEN, M. B.; KHOURI, H.; SHETTY, J.; BERRY, K.; UTTERBACK, T.; TRAN, K.; WOLF, A.; VAMATHEVAN, J.; ERMOLAEVA, M.; WHITE, O.; SALZBERG, S. L.; VENTER, J. C.; SHAPIRO, L.; FRASER, C. M. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 98, n. 7, p. 4136-4141, 2001.

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

O'CONNELL, M.; HENRY, S.; SHAPIRO, L. Fatty acid degradation in *Caulobacter crescentus*. **J. Bacteriol.**, v. 168, n. 1, p. 49-54, 1986.

OSTERAS, M.; JENAL, U. Regulatory circuits in *Caulobacter*. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 3, n. 2, p. 171-176, 2000.

PARKINSON, J. S. Genetic approaches for signaling pathways and proteins. In: HOCH, J. A.; SILVAHY, T. J. (Ed.). **Two-component signal transduction**. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1995. p. 9-23.

PHADTARE, S.; ALSINA, J.; INOUE, M. Cold-shock response and cold-shock proteins. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 2, n. 2, p. 175-180, 1999.

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

PHADTARE, S.; INOUE, M.; SEVERINOV, K. The nucleic acid melting activity of *Escherichia coli* CspE is critical for transcription antitermination and cold acclimation of cells. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 9, p. 7239-7245, 2002.

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

PIZARRO-CERDA, J.; TEDIN, K. The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression. **Mol. Microbiol.**, v. 52, n. 6, p. 1827-1844, 2004.

POINDEXTER, J. S. Biological Properties and Classification of the *Caulobacter* Group. **Bacteriol. Rev.**, v. 28, p. 231-295, 1964.

_____. The caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. **Microbiol. Rev.**, v. 45, n. 1, p. 123-179, 1981.

PRENTKI, P.; KRISCH, H. M. *In vitro* insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. **Gene**, v. 29, n. 3, p. 303-313, 1984.

PRICE, C. W. Protective function and regulation of the general stress response in *Bacillus subtilis* and related gram-positive bacteria. In: STORZ, G.; HENGGE-ARONIS, R. (Ed.). **Bacterial stress responses**. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 2000. p. 179-197.

RATH, D.; JAWALI, N. Loss of expression of *cspC*, a cold shock family gene, confers a gain of fitness in *Escherichia coli* K-12 strains. **J. Bacteriol.**, v. 188, n. 19, p. 6780-6785, 2006.

ROBERTS, R. C.; TOOCHINDA, C.; AVEDISSIAN, M.; BALDINI, R. L.; GOMES, S. L.; SHAPIRO, L. Identification of a *Caulobacter crescentus* operon encoding *hrcA*, involved in negatively regulating heat-inducible transcription, and the chaperone gene *grpE*. **J. Bacteriol.**, v. 178, n. 7, p. 1829-1841, 1996.

SANTOS, J. M.; FREIRE, P.; VICENTE, M.; ARRAIANO, C. M. The stationary-phase morphogene *bolA* from *Escherichia coli* is induced by stress during early stages of growth. **Mol. Microbiol.**, v. 32, n. 4, p. 789-798, 1999.

SATO, N. A family of cold-regulated RNA-binding protein genes in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* M3. **Nucleic Acids Res.**, v. 23, n. 12, p. 2161-2167, 1995.

SAUVIAC, L.; PHILIPPE, H.; PHOK, K.; BRUAND, C. An extracytoplasmic function sigma factor acts as a general stress response regulator in *Sinorhizobium meliloti*. **J. Bacteriol.**, v. 189, n. 11, p. 4204-4216, 2007.

SCHELLHORN, H. E.; AUDIA, J. P.; WEI, L. I.; CHANG, L. Identification of conserved, RpoS-dependent stationary-phase genes of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 180, n. 23, p. 6283-6291, 1998.

SCHINDELIN, H.; MARAHIEL, M. A.; HEINEMANN, U. Universal nucleic acid-binding domain revealed by crystal structure of the *B. subtilis* major cold-shock protein. **Nature**, v. 364, n. 6433, p. 164-168, 1993.

SCHMID, B.; KLUMPP, J.; RAIMANN, E.; LOESSNER, M. J.; STEPHAN, R.; TASARA, T. Role of cold shock proteins in growth of *Listeria monocytogenes* under cold and osmotic stress conditions. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 6, p. 1621-1627, 2009.

SCHMIDT, J. M.; STANIER, R. Y. The development of cellular stalks in bacteria. **J. Cell Biol.**, v. 28, n. 3, p. 423-436, 1966.

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

SCHRÖDER, K.; GRAUMANN, P.; SCHNUCHEL, A.; HOLAK, T. A.; MARAHIEL, M. A. Mutational analysis of the putative nucleic acid-binding surface of the cold-shock domain, CspB, revealed an essential role of aromatic and basic residues in binding of single-stranded DNA containing the Y-box motif. **Mol. Microbiol.**, v. 16, n. 4, p. 699-708, 1995.

SHAPIRO, L.; MCADAMS, H. H.; LOSICK, R. Generating and exploiting polarity in bacteria. **Science**, v. 298, n. 5600, p. 1942-1946, 2002.

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

SINENSKY, M. Homeoviscous adaptation--a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 71, n. 2, p. 522-525, 1974.

SKERKER, J. M.; LAUB, M. T. Cell-cycle progression and the generation of asymmetry in *Caulobacter crescentus*. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 2, n. 4, p. 325-337, 2004.

SMITH, G. A.; PORTNOY, D. A.; THERIOT, J. A. Asymmetric distribution of the *Listeria monocytogenes* ActA protein is required and sufficient to direct actin-based motility. **Mol. Microbiol.**, v. 17, n. 5, p. 945-951, 1995.

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

STÜLKE, J.; HILLEN, W. Carbon catabolite repression in bacteria. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 2, n. 2, p. 195-201, 1999.

SWISS-CZECH PROTEOMICS SERVER. **Proteomics database of *Caulobacter crescentus***. Available from: <<http://proteom.biomed.cas.cz/caulob/mgelcbb.php>>. Acesso em: 11 maio 2009.

THIERINGER, H. A.; JONES, P. G.; INOUE, M. Cold shock and adaptation. **Bioessays**, v. 20, n. 1, p. 49-57, 1998.

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

VANBOGELEN, R. A.; NEIDHARDT, F. C. Ribosomes as sensors of heat and cold shock in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 87, n. 15, p. 5589-5593, 1990.

VIOLLIER, P. H.; SHAPIRO, L. Spatial complexity of mechanisms controlling a bacterial cell cycle. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 7, n. 6, p. 572-578, 2004.

VIOLLIER, P. H.; THANBICHLER, M.; MCGRATH, P. T.; WEST, L.; MEEWAN, M.; MCADAMS, H. H.; SHAPIRO, L. Rapid and sequential movement of individual chromosomal loci to specific subcellular locations during bacterial DNA replication. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 101, n. 25, p. 9257-9262, 2004.

WANG, N.; YAMANAKA, K.; INOUE, M. CspI, the ninth member of the CspA family of *Escherichia coli*, is induced upon cold shock. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 5, p. 1603-1609, 1999.

WEBER, M. H.; MARAHIEL, M. A. Coping with the cold: the cold shock response in the Gram-positive soil bacterium *Bacillus subtilis*. **Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.**, v. 357, n. 1423, p. 895-907, 2002.

_____. Bacterial cold shock responses. **Sci. Prog.**, v. 86, n. Pt 1-2, p. 9-75, 2003.

WEST, L.; YANG, D.; STEPHENS, C. Use of the *Caulobacter crescentus* genome sequence to develop a method for systematic genetic mapping. **J. Bacteriol.**, v. 184, n. 8, p. 2155-2166, 2002.

WILSON, D. N.; NIERHAUS, K. H. The how and Y of cold shock. **Nat. Struct. Mol. Biol.**, v. 11, n. 11, p. 1026-1028, 2004.

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

XIA, B.; KE, H.; INOUE, M. Acquisition of cold sensitivity by quadruple deletion of the *cspA* family and its suppression by PNPase S1 domain in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 40, n. 1, p. 179-188, 2001.

XIAO, H.; KALMAN, M.; IKEHARA, K.; ZEMEL, S.; GLASER, G.; CASHEL, M. Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 9, p. 5980-5990, 1991.

YAMANAKA, K.; FANG, L.; INOUE, M. The CspA family in *Escherichia coli*: multiple gene duplication for stress adaptation. **Mol. Microbiol.**, v. 27, n. 2, p. 247-255, 1998.

YAMANAKA, K.; INOUE, M. Growth-phase-dependent expression of *cspD*, encoding a member of the CspA family in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 179, n. 16, p. 5126-5130, 1997.

_____. Induction of CspA, an *E. coli* major cold-shock protein, upon nutritional upshift at 37 degrees C. **Genes Cells**, v. 6, n. 4, p. 279-290, 2001.

YAMANAKA, K.; MITANI, T.; OGURA, T.; NIKI, H.; HIRAGA, S. Cloning, sequencing, and characterization of multicopy suppressors of a *mukB* mutation in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 13, n. 2, p. 301-312, 1994.

YAMANAKA, K.; MITTA, M.; INOUE, M. Mutation analysis of the 5' untranslated region of the cold shock *cspA* mRNA of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.**, v. 181, n. 20, p. 6284-6291, 1999.

YAMANAKA, K.; ZHENG, W.; CROOKE, E.; WANG, Y. H.; INOUE, M. CspD, a novel DNA replication inhibitor induced during the stationary phase in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.**, v. 39, n. 6, p. 1572-1584, 2001.

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