

## RESUMO

DE ARAÚJO, L. H. **Estudo do papel das RNA helicases da família DEAD-box RhIB e RhIE na estabilidade de RNAs e na expressão gênica em *Caulobacter crescentus***. 2022. 208 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023

*Caulobacter crescentus* é uma alfa-proteobactéria ambiental que apresenta um ciclo celular complexo, o que a torna um excelente modelo para o estudo de regulação gênica neste grupo. O estresse térmico causado por quedas de temperaturas gera uma resposta adaptativa conhecida como Resposta ao Choque-Frio, caracterizada por alterações em diversos componentes celulares e vias metabólicas. Uma dessas alterações é a tendência das moléculas de RNA de formarem estruturas secundárias estáveis, dificultando sua tradução e degradação. As RNA helicases da família DEAD-box são proteínas com a capacidade de remodelar estruturas de RNA e complexos de RNA-proteína. O objetivo deste trabalho foi definir os papéis fisiológicos das RNA helicases DEAD-box RhIB e RhIE em *C. crescentus*, particularmente em baixa temperatura, bem como investigar a interação de RhIB com o degradossomo de RNA. Ensaio de crescimento em baixa temperatura e na recuperação do congelamento foram realizados, bem como a identificação dos genes diferencialmente expressos no choque-frio e nas linhagens mutantes *rhIB* e *rhIE* sob diferentes temperaturas de crescimento. Foi avaliada também a interação de RhIE com o ribossomo, e linhagens contendo FLAG-RhIB com diferentes extensões da região C-terminal foram utilizadas para determinar os seus RNAs ligantes e para o mapeamento dos sítios de interação com o degradossomo. Os resultados de sequenciamento de RNA nos permitiram caracterizar a resposta de *C. crescentus* ao choque-frio, mostrando importantes alterações em vias do metabolismo de ferro, sistemas de transporte e detoxificação e homeostase de cátions. Foi observado que RhIE e Rho parecem participar da regulação do operon *kdp* em baixa temperatura por meio de estabilização do mensageiro e/ou por uma possível atenuação de transcrição. Apesar de não conseguir concluir o efeito de RhIE sobre a expressão gênica de *C. crescentus*, a análise do transcrito do mutante *rhIE* indicou a manutenção da resposta ao frio observada na linhagem selvagem, e os experimentos de associação com o ribossomo mostraram dados inconclusivos. O mutante *rhIB* apresentou uma menor expressão na maioria dos genes identificados pelo sequenciamento, com um aumento considerável do número de genes após o choque-frio. Dentre estes, as principais categorias afetadas foram de transporte e metabolismo de íons inorgânicos, tradução, estrutura e biogênese ribossomal, e modificações pós-traducionais. Também foi observada uma queda considerável da viabilidade na recuperação do congelamento após incubação no frio no mutante *rhIB*, provavelmente por um defeito na montagem de uma resposta crioprotetora eficiente. A deleção da região C-terminal completa de RhIB gera um fenótipo de recuperação do congelamento pior que uma deleção parcial, indicando uma falta de interação com a RNase E e/ou uma possível redução da sua atividade de helicase.

**Palavras-chave:** *Caulobacter crescentus*. Genética microbiana. RNA helicase. Biologia molecular. Choque-frio.

## ABSTRACT

DE ARÚJO, L. H. **Study of the role of the DEAD-box RNA helicases RhIB and RhIE in RNA stability and gene expression in *Caulobacter crescentus***. 2022. 208 f. Ph. D Thesis (Microbiology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

*Caulobacter crescentus* is an environmental alphaproteobacterium with a complex cell cycle, making it an excellent model for the study of gene regulation in this group. The stress caused by temperature downfall leads to an adaptive response known as Cold-Shock Response, characterized by alterations in several cellular components and metabolic pathways. One of those changes is the tendency of RNA molecules to form stabilized secondary structures, impairing translation and turnover. The DEAD-box RNA helicases are proteins with the ability to unwind RNA structures and RNA-proteins complexes. The aim of this work was to define the physiological roles of the DEAD-box RNA helicases RhIB and RhIE in *C. crescentus*, particularly at low temperature, as well as investigate the interaction of RhIB with the RNA degradosome. Growth assays at low temperature and in freezing recovery were carried out, and genes differentially expressed after cold-shock and in the *rhIB* and *rhIE* mutant strains at different growth temperatures were identified. The interaction between RhIE and the ribosome was assessed, and strains carrying FLAG-RhIB with different C-terminal regions were used to determine its binding RNAs and to map the sites involved in the interaction with the degradosome. RNA sequencing results allowed us to characterize the *C. crescentus* response to cold-shock, unveiling important alterations in iron metabolism, transport and detoxification systems and cation homeostasis. RhIE and Rho seem to participate in the regulation of the *kdp* operon at low temperature by stabilizing the transcript and/or via transcription attenuation. Although we could not conclude the effect of RhIE on the genetic expression of *C. crescentus*, the transcriptomic analysis of the *rhIE* mutant indicates that its cold shock response seems to be the same as the one observed in the wild type strain, and the experiments to identify ribosome association were inconclusive. The *rhIB* mutant presented a downregulation of most of the identified genes by sequencing, with an expressive increase in the number of genes after cold-shock. Among these, the main affected categories were inorganic ions transport and metabolism, translation, ribosome structure and biogenesis, and post-translational modifications. Also, a severe decrease in the number of viable cells after freezing with pre-incubation at low temperature was observed in the *rhIB* mutant, indicating a possible defect in the assembly of an efficient cryoprotectant response. The complete removal of RhIB C-terminus leads to a worse phenotype than a partial deletion, indicating the lack of interaction with RNase E and/or a potential reduction of its helicase activity.

**Keywords:** *Caulobacter crescentus*. Microbial genetics. RNA helicase. Molecular biology. Coldshock.