Henrique Iglesias Neves

**Estudo do surgimento de mutantes PHO-constitutivos
em *Escherichia coli***

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Genética e Fisiologia de Microrganismos

Orientador: Dr. Beny Spira

São Paulo, Brasil

2020

Resumo

NEVES, H. I. **Estudo do Surgimento de Mutantes PHO-constitutivos em *Escherichia coli***. 2020. 120 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

O regulon PHO de *Escherichia coli* compreende o conjunto de genes cuja transcrição é diretamente regulada pela concentração do íon ortofosfato (Pi) no periplasma. Sua transcrição é controlada pelo sistema de dois componentes PhoB-PhoR e pelo transportador de Pi PstSCAB-PhoU. Mutantes PHO-constitutivos, que expressam os genes de PHO independente da concentração de Pi, podem ser selecionados em meios cuja única fonte de carbono é glicerol-2-fosfato (G2P). O crescimento dos mutantes é viabilizado pela hidrólise de G2P no periplasma, resultando em glicerol e Pi. a enzima responsável por essa reação - a fosfatase alcalina - é parte do regulon PHO e está expressa constitutivamente nos mutantes. O aparecimento de mutantes PHO-constitutivos segue um padrão semelhante ao encontrado para mutações adaptativas, que surgem após o contato com a pressão seletiva e novos mutantes se acumulam nas placas ao longo dos dias. Diferentemente de outros sistemas mutacionais, não são observados mutantes PHO-constitutivos pré-existentes e todos os mutantes surgem a partir do terceiro dia de incubação. Não há, porém, impedimento teórico para a ocorrência de mutações na pré-cultura. Na primeira parte deste trabalho, foi caracterizado o fenômeno relativo à ausência de mutações PHO-constitutivas precoces. É demonstrado que este fenômeno se deve à inibição de crescimento dos mutantes exercida pelas bactérias selvagens. Esta inibição depende da proximidade física entre as duas populações, sem necessidade de contato direto. A varredura de uma biblioteca de mutantes de *E. coli* indicou que, para que a inibição ocorra, as bactérias selvagens devem ser capazes de utilizar glicerol como fonte de carbono. Os resultados apontam para uma situação de tragédia dos comuns, onde o glicerol produzido pela hidrólise de G2P é consumido pelas bactérias selvagens antes que possa ser consumido pelos mutantes PHO-constitutivos. Em condições de baixa densidade de bactérias na placa seletiva, não ocorre inibição dos mutantes PHO-constitutivos. Neste caso foi possível calcular a real taxa de mutações PHO-constitutivas, que é da ordem de $2,5 \times 10^{-6}$ mutações/geração, estando dentro do esperado teórico para *E. coli*.

Na segunda parte deste trabalho, foi caracterizado o sistema de transporte de fosfonatos, codificado por *phnCDE*. Um mutante espontâneo isolado em nosso laboratório, derivado de uma cepa $\Delta pitA \Delta pstSCAB-phoU \Delta ugpBAEC$ apresentou a perda de uma inserção de 8 pb na ORF de *phnE*. Essa inserção é comum em derivados de *E. coli* K-12 e torna o transportador não funcional. Apesar de o mutante em questão portar deleções em todos os transportadores de Pi conhecidos, este conseguia crescer tendo Pi como única fonte de fósforo. Experimentos de crescimento e transporte de Pi mostraram que o sistema *PhnCDE* é, de fato, capaz de transportar Pi e o faz com uma eficiência similar à do transportador *PitA*.

Palavras-chave: regulon PHO, fosfatase alcalina, glicerol, glicerol-2-fosfato, *Escherichia coli*

Abstract

NEVES, H. I. **Study of emergence of PHO-constitutive mutants in *Escherichia coli*.** 2020. 120 p. Thesis (PhD in Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

The PHO-regulon of *Escherichia coli* comprises genes which transcription is regulated by the concentration of orthophosphate (Pi) in the periplasm. The transcription of PHO-genes is controlled by the two component system PhoB-PhoR and by the Pi transporter PstSCAB-PhoU. PHO-constitutive mutants, which express PHO genes regardless of Pi concentration, can be selected in media where the only carbon source is glycerol-2-phosphate (G2P). These mutants express large amounts of alkaline phosphatase, that hydrolyses G2P in the periplasm. The emergence of these mutants follows a pattern similar to that observed for adaptive mutations, i. e., they emerge after contact with the selective medium and keep accumulating thereafter. Unlike other mutational systems, pre-existing PHO-constitutive mutants are not observed and all mutants appear after the third day of incubation. However, there is no theoretical impediment to the occurrence of these mutations in the non-selective culture. The first part of this thesis describes the apparent absence of spontaneous PHO-constitutive mutations. We found out that this phenomenon is due to growth inhibition exerted by the wild-bacteria on the PHO-constitutive mutants, preventing their growth in the early days. This growth inhibition depends on physical proximity between the two populations, but physical contact is not required. Screening of a library of *E. coli* mutants indicated that for inhibition to occur, the inhibiting bacteria must be able to use glycerol as a carbon source. The results point to a "tragedy of commons" situation where the glycerol produced by G2P hydrolysis is consumed by wild-type bacteria before it could be taken up by the PHO-constitutive mutant. The actual rate of PHO-constitutive mutations is approximately $2,5 \times 10^{-6}$ mutations/generation, close to the general rate expected in *E. coli*. It was calculated in plates seeded with low bacteria density, a condition in which the growth of the PHO-constitutive mutant is not inhibited.

In the second part of this work, the transport of Pi via the phosphonate transpor system encoded by PhnCDE was analysed. A spontaneous 8 bp deletion in the *phnE* ORF in the triple mutant $\Delta pitA \Delta pstSCAB-phoU \Delta ugpBAEC$ was obtained. This insertion is common in derivatives of *E. coli* K-12 and inactivates transport through PhnCDE. Surprisingly, this strain could grow with Pi as the sole source of phosphorus. Growth and Pi uptake experiments showed that the PhnCDE system is indeed able to take up Pi with an efficiency similar to that of PitA.

Keywords: PHO-regulon, alkaline phosphatase, *Escherichia coli*, glycerol, glycerol-2-phosphate, phosphonate.

1 Introdução

1.1 A concepção da origem da diversidade biológica

A diversidade biológica sempre gerou fascínio na humanidade. Novas espécies de animais, plantas e microrganismos surpreendem pelo seu formato, comportamento, condições em que vivem ou por suas capacidades metabólicas e substâncias exclusivas. Durante a maior parte da história, a explicação mais aceita para esta incrível diversidade pressupunha a permanência, imutabilidade e continuidade das formas de vida ao longo de toda existência da Terra. Todas as formas de vida teriam surgido fruto de uma inteligência metafísica. A diversidade biológica, apesar de imensa, seria limitada e imutável. Essa concepção da vida alimentou, durante o renascimento, a ideia de ser possível catalogar todas as espécies em uma cadeia finita e contínua ([GALFIONE, 2013](#)).

O estudioso francês Georges-Louis Leclerc, Comte de Buffon (1701-1788) foi o primeiro a sugerir que espécies pudessem mudar. Seu principal trabalho *Historie Naturelle, générale et particulière* (História Natural, geral e particular em tradução livre) trouxe a observação de que animais fisicamente muito diferentes ocupavam ambientes com características muito semelhantes, indício de histórias naturais diferentes.

Charles Darwin (1809-1882) em seu trabalho mais importante *The origin of Species by Means of Natural Selection or the Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life* (1859) foi quem melhor, em sua época, explicou o papel das variações no surgimento de diferentes espécies. Segundo sua teoria, chamada de Seleção Natural, variações entre indivíduos de uma população resultam em diferentes capacidades reprodutivas ou de sobrevivência, em resumo melhoram a aptidão. As variações com melhor efeito na melhoria da aptidão de seu portador são transmitidas à geração seguinte. Com o decorrer das gerações, a frequência de indivíduos com as variações que mais contribuem para a aptidão aumenta e a população como um todo se adapta. A aptidão é, entretanto, dependente do ambiente que as populações ocupam.

Segundo Teoria da Seleção Natural, a diversidade biológica é o resultado de um contínuo processo de surgimento, eliminação e fixação de variantes nas populações. A origem das variações, entretanto, permaneceu parcialmente inexplicada na obra de Darwin. Como tentativa de explicar essa origem, Darwin recorreu até mesmo à teoria de Uso e Desuso de Jean Baptiste Lamarck, ao qual dedicou inclusive um capítulo inteiro em seu livro ([DARWIN, 1859](#)).

Impulsionados pela redescoberta das Leis de Mendel, no início do século XX, pesquisas buscaram entender o surgimento e a transmissão de características nos seres

vivos, incluindo os microrganismos. O clássico trabalho de Salvador Luria e Max Delbrück, publicado em 1943 é de especial importância. Ao estudar o surgimento de mutações que conferem resistência a fagos T em culturas de *Escherichia coli*, eles demonstraram que, até mesmo em bactérias, o surgimento de novas características ocorre de modo aleatório, anterior e independentemente do contato com a pressão seletiva do meio. Este artigo demonstrou que a variabilidade sobre a qual a seleção natural age surge espontaneamente nas populações, independente de qualquer pressão seletiva.

O paradigma estabelecido por Luria e Delbrück veio a ser contestado mais de 4 décadas mais tarde. Em 1988, Cairns, Overbaugh e Miller (1988) descreveram o surgimento de mutantes após exposição a uma pressão seletiva. Neste trabalho foi demonstrado o surgimento de novos mutantes *lac*⁺ a partir de populações de *Escherichia coli lac*⁻ plaqueadas em lactose como única fonte de carbono. Nos primeiros dias após o plaqueamento, os mutantes espontâneos surgiam em grande número. Até então esses dados concordavam com o paradigma anterior. Nos dias subsequentes, porém, novas colônias surgiam. Tais mutantes, chamados de "Adaptativos", seriam diferentes dos espontâneos, tendo surgido em resposta à pressão seletiva.

A principal diferença entre o trabalho de Luria e Delbrück e aquele desenvolvido por Cairns, Overbaugh e Miller estaria na letalidade da pressão seletiva utilizada. A incapacidade de resistir ao ataque por bacteriófagos acarreta a morte da bactéria, enquanto que a incapacidade de utilizar lactose em um meio no qual essa é a única fonte de carbono não é, necessariamente, letal. Desse modo, no sistema utilizado por Luria e Delbrück, não seria possível observar mutantes adaptativos. Apesar da existência de mutações adaptativas ser controversa, diversos sistemas mutacionais foram descritos como adaptativos (GALHARDO; HASTINGS; ROSENBERG, 2007).

1.2 O regulon PHO em *Escherichia. coli*

Mutantes PHO-constitutivos em *E. coli* apresentam uma dinâmica de surgimento muito similar à de mutantes adaptativos, acumulando-se após dias de incubação nas placas de meio seletivo (TORRIANI, 1990; NEVES et al., 2015). Tais mutantes perderam a capacidade de reprimir a transcrição dos genes do regulon PHO e podem ser isolados em meio contendo glicerol-2-fosfato (G2P) como única fonte de carbono (TORRIANI; ROTHMAN, 1961).

O regulon PHO de *E. coli* compreende o conjunto de dezenas de genes cuja transcrição responde à concentração externa do íon ortofosfato (PO_4^{-2}), também chamado de fosfato inorgânico (Pi) (SANTOS-BENNET, 2015; VERSHININA; ZNAMENSKAYA, 2002). Pi é o estado máximo de oxidação de fósforo (+5) e é a forma principal no qual integra-se em moléculas orgânicas. O Pi é parte constituinte de moléculas essenciais como ácidos

nucleicos, fosfolipídeos que formam as membranas celulares, moléculas que energizam processos como ATP, além de participar da transdução de sinal no citoplasma e de diversos outros processos.

Dada a importância de Pi, é previsível a existência de um sistema gênico como o regulon PHO, destinado à captação deste nutriente, bem como a redundância dos sistemas de captação de Pi e de moléculas fosfatadas (SANTOS-BENNET, 2015). Fazem parte deste regulon o sistema de dois componentes codificado pelo operon *phoBR*, o transportador de Pi do tipo ABC de alta afinidade codificado pelo operon *pstSCAB-phoU*, o transportador do tipo ABC de α -glicerol fosfato codificado por *ugpBAECQ*, a porina externa aniônica codificada por *phoE*, a enzima periplasmática fosfatase alcalina codificada por *phoA*, o *cluster* de 14 genes *phnCDEFGHIJKLMNOP* que codifica um transportador de fosfonatos do tipo ABC e a enzima para clivagem de fosfonatos, a CP-liase; entre outros sistemas (VERSHININA; ZNAMENSKAYA, 2002; SANTOS-BENNET, 2015).

A transcrição dos genes do regulon PHO responde à concentração periplasmática de Pi e é ativada quando esta cai abaixo de 4 μ M (WANNER, 1993). Nesta condição, PhoR sofre uma mudança conformacional que leva à fosforilação de histidina. Em seguida, PhoR-P fosforila o regulador de resposta PhoB (WANNER, 1996b). PhoR é uma histidina quinase do tipo I, da mesma família de EnvZ (DUTTA; QIN; INOUE, 1999). Sua estrutura é formada por um domínio transmembrana N-terminal, um domínio de transdução de sinal (PAS), um domínio de dimerização (DHp) que possui o resíduo de histidina, e um domínio catalítico C-terminal (CARMANY; HOLLINGSWORTH; MCCLEARY, 2003). Entre o domínio transmembrana e o PAS, há um região com 6 aminoácidos carregados cuja função é desconhecida (CARMANY; HOLLINGSWORTH; MCCLEARY, 2003). O domínio catalítico é o responsável pela fosforilação da histidina, enquanto o domínio DHp possui atividade de fosfatase (CARMANY; HOLLINGSWORTH; MCCLEARY, 2003). Diferentemente de EnvZ e outras histidinas quinases, PhoR não possui uma porção periplasmática que sente o sinal ambiental (concentração de Pi) (DUTTA; QIN; INOUE, 1999; CARMANY; HOLLINGSWORTH; MCCLEARY, 2003). A concentração de Pi é informada a PhoR pelo sistema Pst (WANNER, 1996a). A necessária interação entre esses sistemas explica porque a ausência do domínio N-terminal de PhoR, que ancora esta proteína à membrana, leva à perda da regulação transcricional do regulon PHO (MAKINO et al., 1989). Na ausência de PhoR, a fosforilação de PhoB acontece por meio do *cross-talk* com PhoM (CreC) (WANNER; WILMES; HUNTER, 1988).

PhoB é o regulador de resposta que, juntamente com PhoR e Pst modula a transcrição dos genes do regulon PHO. Quando a concentração de Pi está abaixo de 4 μ M, PhoB é fosforilado por PhoR em seu resíduo de ácido aspártico 53 no domínio N-terminal da proteína (SOLA et al., 1999). Esta fosforilação induz a dimerização da proteína e promove a rotação do domínio N-terminal, promovendo o reposicionamento dos

dois domínios C-terminais (BACHHAWAT et al., 2005; KOU et al., 2018). A conformação assumida pelo dímero após a fosforilação permite a sua interação com as PHO-boxes nas regiões promotoras dos genes de PHO (MAKINO et al., 1989). PHO-boxes são sequências de aproximadamente 18 nucleotídeos na região promotora dos genes de PHO (WANNER, 1993). Uma vez ligado à PHO-box, PhoB-P recruta o fator σ^{70} da RNA polimerase desencadeando a transcrição dos genes do regulon PHO (MAKINO et al., 1993). PHO-boxes podem substituir a região -10 (MAKINO et al., 1998) ou a região -35 (TORRIANI, 1990) dos promotores dos genes de PHO. Aqueles promotores que possuam a PHO-box na região -35 são reprimidos por PhoB (HARRIS et al., 2001). Apesar da imensa maioria dos genes do regulon PHO ser ativada sob carência de Pi, VanBogelen et al (1996) identificaram 19 genes que tem sua transcrição reprimida nesta condição.

O transporte de Pi do periplasma ao interior da célula é feito pelo transportador secundário PitA e pelo transportador do tipo ABC PstSCAB (ROSEMBERG; GERDES; CHEGWIDDEN, 1977). Além desse há também outro transportador, PitB, normalmente críptico em cepas de laboratoriais de *E. coli* (HARRIS et al., 2001). O sistema Pst é codificado pelo operon homônimo que contém, além dos 4 genes que codificam o transportador, um quinto gene denominado *phoU*. Apesar de ser transcrito juntamente com os demais genes no operon, PhoU não participa do transporte de Pi (STEED; WANNER, 1993). PstS é a proteína periplasmática que se liga a Pi e o entrega ao canal transmembrana formado por PstC e PstA (WEBB; ROSENBERG; COX, 1992). Em seguida, a hidrólise de ATP é desencadeada na ATPase PstB que, por sua vez, desencadeia uma mudança conformacional nas demais proteínas do sistema (VUPPADA et al., 2018).

O sistema Pst é, aparentemente, o responsável por sinalizar à PhoR a concentração de Pi no Periplasma (WEBB; ROSENBERG; COX, 1992). A concentração de saturação de PstS com Pi é a mesma concentração limite para ativação do regulon PHO - 4 μM (WANNER, 1993). Desse modo, a informação sobre a concentração de Pi é transmitida por meio da interação física entre o transportador Pst e PhoR mediada por PhoU (GARDNER et al., 2014) e possivelmente depende da conformação que o sistema Pst assume ao transportar ou não Pi (VUPPADA et al., 2018). Pode-se deduzir que o sinal para a ativação do regulon PHO é o sistema Pst em repouso, sem estar transportando Pi.

1.3 Mutantes PHO-constitutivos, um caso de mutantes adaptativos?

Mutações de perda de função em qualquer um dos genes do operon Pst ou em PhoR resultam na perda da regulação transcricional dos genes de PHO (WANNER, 1996a; WANNER, 1986). Tais mutantes, denominados PHO-constitutivos expressam os genes independentemente da concentração periplasmática de Pi. Torriani e Rothman

desenvolveram um método para isolar mutantes espontâneos em um meio contendo glicerol-2-fosfato (G2P) como única fonte de carbono (TORRIANI; ROTHMAN, 1961; TORRIANI, 1990). Mutantes PHO-constitutivos crescem nesse meio graças à expressão constitutiva do gene *phoA*, cujo produto hidrolisa quantidades suficientes de G2P para sustentar o crescimento (NEVES et al., 2015).

A fosfatase alcalina (FA) é uma enzima periplasmática responsável por clivar ligações fosfoésteres em uma grande variedade de substratos (GAREN; LEVINTHAL, 1960; WILLSKY; MALAMY, 1976). Codificada pelo gene *phoA*, também parte do regulon PHO, pode representar até 6% de toda a proteína celular quando sua expressão está totalmente induzida (GAREN; LEVINTHAL, 1960). A forma ativa da enzima é um homo-dímero periplasmático (COLEMAN, 1992). Os monômeros são sintetizados com uma sequência sinalizadora e não apresentam atividade quando presentes no citoplasma (MICHAELIS et al., 1983). Após ser translocada para o periplasma, as subunidades da enzima sofrem uma última modificação com a retirada das duas argininas N-terminais (NESMEYANOVA et al., 1997). A sua atividade é facilmente avaliada por meio de ensaios bioquímicos ou pela adição de substratos cromogênicos, o que torna *phoA* o principal gene repórter da expressão do regulon PHO.

Quando bactérias selvagens (*phoA*⁺) são semeadas em meio contendo G2P como única fonte de carbono, colônias PHO-constitutivas começam a surgir, normalmente, após 3 dias de incubação e se acumulam nos dias posteriores (NEVES et al., 2015). A dinâmica de surgimento comumente observada para novos mutantes PHO-constitutivos se assemelha bastante à relatada por Cairns em seu artigo original sobre mutações adaptativas (CAIRNS; OVERBAUGH; MILLER, 1988) e em outros sistemas de seleção ditos adaptativos (GALHARDO; HASTINGS; ROSENBERG, 2007; YANG; LU; WANG, 2001). Como principais semelhanças podemos citar o fato de que surgem após o contato com a pressão seletiva não-letal, se acumularem com o decorrer dos dias de incubação e, uma vez reestriados em meio fresco, crescerem rapidamente, o que indica não serem mutantes de crescimento lento.

Apesar dessas semelhanças, algumas observações lançam dúvidas sobre a ideia de que mutantes PHO-constitutivos seriam adaptativos. A principal delas é de natureza estatística: a média e a variância entre as amostras não segue o padrão esperado para mutações adaptativas.

Mutações em populações bacterianas podem ser analisadas como ocorrência binomial. No caso de Luria e Delbrück, os dois estados possíveis são resistir ou não à infecção pelo fago. Para mutação PHO-constitutivas, os estados possíveis dizem respeito à expressão do regulon PHO em abundância de Pi. A distribuição amostral que melhor se aplica à mutações é a distribuição de Poisson, que calcula a probabilidade de ocorrência de eventos raros em um intervalo de tempo, no caso, o tempo de geração das bactérias (MENEELY,

2002). Em fenômenos que seguem esta distribuição, a média e a variância da amostragem apresentam valores iguais ou muito próximos.

Este comportamento da média e da variância dentro da distribuição de Poisson que permitiu a Luria e Delbrück estabelecerem a natureza das mutações com o seu clássico experimento de flutuação. O raciocínio por traz é simples e elegante. Se as mutações surgissem em resposta à pressão seletiva - no caso a presença de fagos, a média e a variância do número de mutantes entre dezenas de diferentes culturas seria semelhante. Isso ocorreria porque todas as culturas estariam igualmente expostas pelo mesmo intervalo de tempo ao indutor da mutação, os fagos, e por simples probabilidade apresentariam frequências de mutações muito similares. Se as mutações surgissem de modo independente da pressão seletiva sendo apenas selecionada por ela, culturas independentes teriam números muito diferentes de mutantes. Além da ocorrência natural de mutações durante a incubação prévia, o número final de mutantes em cada cultura depende de qual geração ocorreu a mutação. Desse modo, culturas onde mutações ocorreram precocemente apresentariam mais colônias mutantes quando comparadas àquelas onde mutações ocorreriam tardiamente. O resultado seria uma variância muito maior que a média, comparando-se culturas diferentes.

O padrão de distribuição encontrado para mutantes PHO-constitutivos observado é o esperado para mutações aleatórias, onde a variância entre culturas chegou a ser dez vezes maior que a média! Esse resultado é um forte indicativo de que os mutantes PHO-constitutivos não representam um caso de mutações adaptativas, surgindo de modo completamente independente da seleção à qual são submetidas.

A ausência de mutantes PHO-constitutivos após 48 horas, quando espontâneos formam colônias visíveis, é surpreendente porque sugere que nenhuma mutação ocorreu durante o pré-cultivo. Do ponto de vista genético, essa afirmação é absurda. Levando em conta a taxa de mutação natural de *E. coli* (aproximadamente 10^6 /gene) (DRAKE et al., 1998) e os seis alvos possíveis de para mutações PHO-constitutivas (i. e. todos os genes do operon *pstSCAB-phoU* mais o gene *phoR*) esses mutantes deveriam ser abundantes. Além disso, estas mutações não são deletérias nas condições de laboratório, sendo possível deletar o operon *pstSCAB-phoU* inteiro e ainda obter bactérias perfeitamente viáveis (NEVES et al., 2015). O surgimento tardio dos mutantes poderia, então, ser explicado por algum mecanismo molecular que impede o surgimento de mutantes PHO-constitutivos. Esse fator seria enfraquecido com o passar dos dias. A existência de algum fenômeno do tipo é desconhecida até o momento.

Diante dos fenômenos aqui descritos, buscamos entender a ausência de mutantes PHO-constitutivos espontâneos e esclarecer quais seriam as possíveis causas e consequências desse fenômeno para o conhecimento de como mutações surgem e se estabelecem em populações bacterianas.

calculada foi $9,2 \times 10^{-5}$. Conforme esperado, a taxa de mutação na cepa mutadora foi quase uma ordem de grandeza mais alta que na cepa selvagem.

Esses resultados indicam que o ensaio de flutuação identificou a real probabilidade de eventos mutacionais PHO-constitutivos espontâneos e que estas mutações são de fato mascaradas pelo fenômeno da inibição. A taxa de mutações PHO-constitutivas espontâneas está dentro do esperado teórico.

5 Conclusão e Perspectivas

À primeira vista, o surgimento de mutantes PHO-constitutivos seria mais um exemplo mutação adaptativa como outros descritos na literatura (GALHARDO; HASTINGS; ROSENBERG, 2007; TIMMS; BRIDGES, 1998; YANG; LU; WANG, 2001). O acúmulo de mutantes no meio seletivo ao longo dos dias, que parecem surgir apenas quando as bactérias são expostas à pressão seletiva, corrobora essa ideia. Curiosamente, a mesma dinâmica de surgimento que aponta para a explicação adaptativa também fornece pistas de que, em realidade, o padrão de surgimento de mutantes PHO-constitutivos se deve por outra razão. As principais são a ausência de mutantes espontâneos (NEVES et al., 2015) e a variância de frequência de mutantes entre as réplicas, o que indica uma distribuição Luria-Delbrück, ao invés de uma distribuição de Poisson comum em mutantes adaptativos (LURIA; DELBRÜCK, 1943).

Por meio da adição de um número contável de mutantes à placa de meio seletivo (Figura 1), foi demonstrado que a aparente ausência de mutantes espontâneos deve-se a uma interação entre a população de mutantes e as bactérias selvagens no meio. As duas populações competem pelo 'bem comum' e limitado produzido pelos mutantes PHO-constitutivos: moléculas de glicerol. Como o número de produtores deste bem são largamente superados por aqueles que apenas o consomem, chamados de trapaceiros ou *cheaters*, não há carbono suficiente para sustentar o crescimento de nenhum deles. O isolamento de mutantes PHO-constitutivos cria uma situação de 'Tragédia dos Comuns' no meio seletivo. Porém, quando conseguimos contornar a inibição e calcular a taxa de mutações PHO-constitutivas (Tabela 7 e 8), o valor encontrado é muito semelhante ao esperado teórico.

A varredura da biblioteca de mutantes indicou que o inibidor deve ser capaz de utilizar glicerol como fonte de carbono (Figura 8) (JOYCE et al., 2006). A hipótese da competição por glicerol tem como premissa que este vaza do periplasma para o meio. Provar essa saída do glicerol é consideravelmente difícil. Há, porém, evidências indiretas. Conforme reduzimos o número de bactérias selvagens plaqueadas, recuperamos mais mutantes PHO-constitutivos (Figura 4). Em concentrações menores de bactérias, a distância entre elas na placa é maior. Uma vez que não há necessidade de contato físico entre as duas populações para que a inibição aconteça (Figura 3), resta concluir que o fenômeno da inibição é devido à competição entre as bactérias pelo escasso glicerol produzido pelos mutantes PHO-constitutivos.

Uma outra possibilidade seria a de que a inibição seria causada por algum metabólito tóxico secretado pelas bactérias selvagens. Porém, as duas cepas envolvidas são isogênicas,

de forma que seria improvável que a cepa selvagem sintetizasse algo que o mutante não produzisse também. Além disso, em outros sistemas de inibição, como o sistema CdiA/B de *E. coli*, os agressores se protegem de seus próprios efeitos inibidores expressando proteínas que os neutralizam (AOKI et al., 2009). Em vista disso, cepas isogênicas então seriam capazes de resistir à interferência umas das outras.

Quando os mutantes PHO-constitutivos são incubados algumas horas na ausência do inibidor, formam-se microcolônias na placa. Esses pequenos grupos de bactérias conseguem escapar da inibição quando colocados em contato com bactérias inibidoras (Figura 15). Esse resultado sugere uma explicação de como mutantes PHO-constitutivos conseguem eventualmente quebrar a inibição e formar colônias. O glicerol liberado por uma bactéria é capturado por outra próxima, se esta segunda bactéria for um mutante PHO-constitutivo, irá também liberar glicerol que poderá ser utilizado por sua vizinha, gerando um processo em que bactérias de um mesmo grupo se ajudam, ao invés de perder o glicerol para as bactérias selvagens vizinhas.

Como duas ou mais bactérias PHO-constitutivas ficam adjacentes em meio seletivo? Podemos pensar em duas hipóteses: (1) um mutante pré-existente em estágio avançado no ciclo celular termina uma ou mais replicações imediatamente após o plaqueamento ou, (2) quando, por pura chance, mutantes PHO-constitutivos da pré-cultura são semeados lado a lado. este último caso implicaria a existência de colônias PHO-constitutivas mistas, tendo duas ou mais mutações diferentes na mesma colônia.

Há ainda algumas perguntas em aberto que demandam maiores estudos. Apesar de todas as cepas não inibidoras serem incapazes de crescer em glicerol como fonte de carbono, nem todas as cepas incapazes de utilizar esse composto também são incapazes de inibir. Cepas portando deleções de *folB*, *ubiG*, *fruR*, *yhhK* e *yjhS* são incapazes de crescer em glicerol (JOYCE et al., 2006), porém inibiram o crescimento de Δpst . Uma possível explicação seria que, apesar da incapacidade de crescer em glicerol, nenhum desses genes está relacionado diretamente com as vias de captação de glicerol. Como a captação está intocada, a inibição permanece.

Se este é mesmo o caso, uma pergunta surge: Por que os mutantes $\Delta glpD$ inibem? Apesar de incapazes de metabolizar glicerol, GlpK ainda está funcional nestas bactérias. A fosforilação de glicerol em glicerol-3-fosfato por GlpK (PETTIGREW et al., 1988) prende o glicerol no citoplasma, impedindo que ele saia novamente da bactéria. Nestas condições, bactérias sem *glpD* ainda são capazes de impedir o acesso das PHO-constitutivas ao glicerol. Três explicações são possíveis neste caso. (1) A presença de alta concentração de G3P no citoplasma gera efeitos tóxicos para as bactérias (SARTHY; MICHAELIS; BECKWITH, 1981). Nesta condição, o metabolismo prejudicado pode levar à morte de bactérias ao redor das PHO-constitutivas. Neste caso, como não há tantas bactérias na vizinhança, as bactérias Δpst podem captar o glicerol produzido. (2) Outra possibilidade seria a de que

o metabolismo mais enfraquecido do mutante *glpD* simplesmente diminui a capacidade de captar glicerol, permitindo que os mutantes escapem da inibição. (3) Outra explicação seria de que o G3P produzido nessas bactérias que não consegue ser utilizado de modo eficiente e acaba por sair da célula via GlpT. GlpT é uma proteína que realiza o antiporte de G3P e Pi (LEMIEUX; HUANG; WANG, 2004). Por fazer parte da superfamília dos facilitadores, GlpT trabalha a favor do gradiente (MARGER; SAIERJR., 1993). G3P, é então captado pelo mutante PHO-constitutivo, permitindo seu crescimento.

Por fim, fica a pergunta: seria possível encontrar um mutante PHO-constitutivo capaz de resistir à inibição? Para conseguir isso, a bactéria deve ser capaz de captar e metabolizar o glicerol antes que este escape para o meio. Apesar de GlpF facilitar largamente a entrada de glicerol (LU; GRAYSON; SCHULTEN, 2003); a fosforilação é a etapa limitante na captação (VOEGELE; SWEET; BOOS, 1993). Entretanto, tanto o acúmulo de G3P, fruto da fosforilação por GlpK como o acúmulo de DHAP pela ação de GlpD são tóxicos para a bactéria (COZZARELLI et al., 1965; LU; GRAYSON; SCHULTEN, 2003). As vias de GlpK e GlpD são estritamente reguladas para impedir o desbalanço desses intermediários metabólicos. Desse modo, hipotetizamos que não seria possível alterar a atividade dessas enzimas ou mesmo sua quantidade na bactéria sem causar algum efeito deletério ao metabolismo. Mais estudos nesse sentido poderão elucidar melhor essa questão.

Referências

- ALMEIDA, L. G. de et al. *phoU* inactivation in *Pseudomonas aeruginosa* enhances accumulation of ppGpp and polyphosphate. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 81, n. 9, p. 3006–3015, May 2015. Citado na página 85.
- AOKI, S. K. et al. Contact-dependent inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Science*, v. 309, p. 1245–1248, 2005. Citado na página 44.
- AOKI, S. K. et al. Contact-dependent growth inhibition causes reversible metabolic downregulation in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 191, n. 6, p. March, 1777–1786 2009. Citado 2 vezes nas páginas 44 e 74.
- BABA, T. et al. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology*, v. 2, p. 1–11, 2006. Citado 6 vezes nas páginas 33, 38, 53, 55, 56 e 58.
- BABU, M. et al. Global landscape of cell envelope protein complexes in *Escherichia coli*. *Nature Biotechnology*, v. 36, n. 1, p. 103–112, 2018. Citado na página 66.
- BACHHAWAT, P. et al. Mechanism of activation for transcription factor *phoB* suggested by different modes of dimerization in the inactive and active states. *Structure*, v. 13, p. 1353–1363, 2005. Citado na página 28.
- BACHMAN, B. J. Pedigrees of some mutant strains of *Escherichia coli* K-12. *Bacteriology Reviews*, v. 36, n. 4, p. 525–557, 1972. Citado 3 vezes nas páginas 42, 56 e 79.
- BEARD, S. J. et al. Evidence for the transport of zinc(II) ions via the Pit inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, v. 184, n. 2, p. 231–235, 2000. Citado na página 97.
- BROWN, G. et al. Structural and biochemical characterization of the Type II fructose-1,6-bisphosphatase GlpX from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 284, p. 3784–3792, 2009. Citado na página 64.
- BRZOSKA, P. et al. The PHO regulon-dependent Ugp uptake system for Glycerol-3-Phosphate in *Escherichia coli* is trans inhibited by Pi. *Journal of Bacteriology*, v. 176, n. 1, p. 15–20, October 1994. Citado 2 vezes nas páginas 57 e 58.
- CADET, J.; SAGE, E.; DOUKI, T. Ultraviolet radiation-mediated damage to cellular DNA. *Mutation Research*, v. 571, p. 3–17, 2005. Citado na página 42.
- CAIRNS, J.; OVERBAUGH, J.; MILLER, S. The origin of mutants. *Nature*, v. 355, n. 8, p. 142–145, September 1988. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 41.
- CARMANY, D. O.; HOLLINGSWORTH, K.; MCCLEARY, W. R. Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR. *Journal of Bacteriology*, v. 185, p. 1112–1115, 2003. Citado na página 27.
- CHUNG, H.; BANG, W.; DRAKE, M. Stress response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 5, n. 3, p. 52–64, 2006. Citado na página 50.

- COLEMAN, J. E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu. Rev., Biophys. Biomol. Struct.*, v. 21, p. 441–483, 1992. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 58.
- COX, G. B. et al. Arg-220 of the PstA protein is required for phosphate transport through the phosphate-specific transport system in *Escherichia coli* but not for alkaline phosphatase repression. *Journal of Bacteriology*, v. 170(5), p. 2283–2286, 1988. Citado na página 87.
- COX, G. B.; WEBB, D.; ROSEMBERG, H. Specific amino acids residues in both the PstB and PstC proteins are required for phosphate transport by the *Escherichia coli* Pst system. *Journal of Bacteriology*, v. 171, n. 3, p. 1531–1534, March 1989. Citado na página 87.
- COZZARELLI, N. R. et al. Growth stasis by accumulated l- α -glycerophosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 90, n. 5, p. 1325–1329, 1965. Citado na página 75.
- CUMMING, G. et al. Error bars in experimental biology. *The Journal of Cell Biology*, v. 177, n. 1, p. 7–11, Abr. 2007. Citado na página 39.
- DARWIN, C. R. *The Origin of Species*. [S.l.: s.n.], 1859. Citado na página 25.
- DATSENKO, K. A.; WANNER, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *PNAS*, v. 97, n. 12, p. 6640–6645, June 2000. Citado 4 vezes nas páginas 53, 83, 84 e 89.
- DEUTSCHER, J. The mechanisms of carbon catabolite repression in bacteria. *Current Opinion in Microbiology*, v. 11, p. 87–93, 2008. Citado 2 vezes nas páginas 55 e 60.
- DEUTSCHER, J.; FRANCKE, C.; POSTMA, P. W. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 70, p. 939–1031, 2006. Citado 3 vezes nas páginas 55, 60 e 61.
- DRAKE, J. W. et al. Rates of spontaneous mutation. *Genetics*, v. 148, n. 4, p. 1667–1686, July 1998. Citado 3 vezes nas páginas 30, 41 e 68.
- DUTTA, R.; QIN, L.; INOUE, M. Histidine kinases: diversity of domain organization. *Molecular Microbiology*, v. 34, p. 633–640, 1999. Citado na página 27.
- FLYNN, J. M. et al. Proteomic discovery of cellular substrates of the ClpXP protease reveals five classes of ClpX-recognition signals. *Molecular Cell*, v. 11, p. 671–683, 2003. Citado na página 55.
- FOSTER, P. L. Adaptive mutation: implications for evolution. *Bioessays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 2000. Citado na página 42.
- FOSTER, P. L. Methods for determining spontaneous mutation rates. *Methods Enzymology*, v. 409, p. 195–213, 2006. Citado 3 vezes nas páginas 39, 69 e 71.
- FU, D. et al. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. *Science*, v. 290, n. 20, p. 481–486, 2000. Citado na página 64.

GALFIONE, M. V. Natural history and temporalization: Reflections on buffon's *Natural History*. *História, Ciências, Saúde - Manguinhos*, v. 20, n. 3, p. 1–15, 2013. Citado na página 25.

GALHARDO, R. S.; HASTINGS, P. J.; ROSENBERG, S. M. Mutation as a stress response and the regulation of evolvability. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, v. 42, n. 5, p. 399–435, 2007. Citado 4 vezes nas páginas 26, 29, 41 e 73.

GARDNER, S. G. et al. The PhoU protein from *Escherichia coli* interacts with PhoR, PstB and metals to form a phosphate-signaling complex at the membrane. *Journal of Bacteriology*, v. 196, n. 9, p. 1741–1752, 2014. Citado na página 28.

GAREN, A.; LEVINTHAL, C. A fine genetic and chemical study of the enzyme alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 38, p. 470–483, 1960. Citado na página 29.

GEBHARD, S.; TRAN, S. L.; COOK, G. M. The Phn system of *Mycobacterium smegmatis*: a second high-affinity ABC-transporter for phosphate. *Microbiology*, v. 152, n. 11, p. 3453–65, 2006. Citado na página 97.

GUILLEMET, M. L.; MOREAU, P. L. Activation of the cryptic PhnE permease promotes rapid adaptive evolution in a population of *Escherichia coli* K-12 starved for phosphate. *Journal of Bacteriology*, v. 194, n. 2, p. 253–260, Jan. 2012. Citado 2 vezes nas páginas 80 e 97.

GÖRKE, B.; STÜLKE, J. Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*, v. 6, p. 613–624, 2008. Citado na página 55.

HARRIS, R. M. et al. Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 183, p. 5008–5014, 2001. Citado 3 vezes nas páginas 28, 87 e 88.

HEPPEL, L. A.; HARKNESS, D. R.; HILMOE, R. J. A study of the substrate specificity and other properties of the alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 237, n. 3, p. 841–846, Mar. 1962. Citado na página 79.

HORIGUCHI, M.; KANDATSU, M. Isolation of 2-aminoethane phosphonic acid from rumen protozoa. *Nature*, v. 189, p. 201–202, 1959. Citado na página 79.

HORSMAN, G. P.; ZECHEL, D. L. Phosphonate biochemistry. *Chemical Reviews*, v. 177, n. 8, p. 5704–5783, 2017. Citado na página 79.

IQBAL, S. et al. Reversible phase variation in the phnE gene, which is required for phosphonate metabolism in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, v. 186, n. 18, p. 6118–6123, Set. 2004. Citado 2 vezes nas páginas 80 e 97.

JOCHIMSEN, B. et al. Five phosphonate operon gene products as components of a multi-subunit complex of the carbon-phosphorus lyase pathway. *PNAS*, v. 108, n. 28, p. 11393–11398 BIOCHEMISTRY, Jul. 2011. Citado na página 79.

JOYCE, A. R. et al. Experimental and computational assessment of conditionally essential genes in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 188, n. 23, p. 8259–8271, 2006. Citado 4 vezes nas páginas 58, 59, 73 e 74.

- KAUR, J. et al. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Scedosporium aurantiacum*, an opportunistic fungal pathogen isolated from the lungs of cystic fibrosis patients. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, n. 866, p. 1–13, 2015. Citado na página 53.
- KISTLER, W. S.; LIN, E. C. C. Purification and properties of the flavine-stimulated anaerobic l- α -glycerophosphate dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 112, n. 1, p. 1224–1234, 1972. Citado na página 64.
- KOU, X. et al. Dimerization and conformational exchanges of the receiver domain of response regulator PhoB from *Escherichia coli*. *J. Phys. Chem. B*, v. 122, p. 5479–5457, 2018. Citado na página 28.
- LARSON, T. J.; LOO-BHATTACHARYA, A. T. van. Purification and characterization of *glpQ*-encoded glycerophosphodiester phosphodiesterase from *Escherichia coli* K-12. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 260, n. 2, p. 577–584, 1988. Citado na página 64.
- LEMIEUX, M. J.; HUANG, Y.; WANG, D.-N. Glycerol-3-phosphate transporter of *Escherichia coli*: Structure, function and regulation. *Research in Microbiology*, v. 155, n. 8, p. 623–629, 2004. Citado 2 vezes nas páginas 64 e 75.
- LEMONNIER, M. et al. The evolution of contact-dependent inhibition in non-growing populations of *Escherichia coli*. *Proc. R. Soc. B.*, n. 275, p. 3–10, March 2008. Nenhuma citação no texto.
- LI, G.-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Research*, n. 18, p. 85–98, 2008. Citado na página 42.
- LIN, E. C. C. Glycerol dissimilation and its regulation in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, v. 30, p. 535–578, 1976. Citado 3 vezes nas páginas 57, 62 e 64.
- LU, D.; GRAYSON, P.; SCHULTEN, K. Glycerol conductance and physical asymmetry of the *Escherichia coli* glycerol facilitator GlpF. *Biophysical Journal*, v. 85, p. 2977–2987, June 2003. Citado na página 75.
- LURIA, S. E.; DELBRÜCK, M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, v. 28, n. 6, p. 491–511, 1943. Citado 3 vezes nas páginas 39, 69 e 73.
- MAKINO, K. et al. Role of the sigma 70 subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*. *Genes & Development*, v. 7, p. 149–160, 1993. Citado na página 28.
- MAKINO, K. et al. Mechanism of transcriptional activation of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 36, n. 4, p. 231–238, December 1998. Citado na página 28.
- MAKINO, K. et al. Molecular analysis of the cryptic and functional *phn* operons for phosphonate use in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, v. 173, n. 8, p. 2665–2672, April 1991. Citado 3 vezes nas páginas 80, 88 e 97.
- MAKINO, K. et al. Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J. Mol. Bio.*, v. 210, p. 551–559, 1989. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 28.

- MANAV, M. C. et al. The Abc of phosphonate breakdown: A mechanism for bacterial survival. *Bioessays*, v. 800091, p. 1–11, 2018. Citado na página 79.
- MARGER, M. D.; SAIERJR., M. H. A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 18, n. 1, p. 13–20, 1993. Citado na página 75.
- MARISCH, K. et al. A comparative analysis of industrial *Escherichia coli* K-12 and b strains in high-glucose batch cultivations on process-, transcriptome- and proteome level. *Plos One*, v. 8, n. 8, p. 1–16, 2013. Citado na página 80.
- MARTÍNEZ-GÓMEZ, K. et al. New insights into *Escherichia coli* metabolism: carbon scavenging, acetate metabolism and carbon recycling responses during growth on glycerol. *Microbial cell factories*, v. 11, n. 46, p. 1–21, 2012. Citado na página 64.
- MATSUHISA, A. et al. Inositol monophosphatase activity from the *Escherichia coli* *suhB* gene product. *Journal of Ba*, v. 177, n. 1, p. 200–205, January 1995. Citado 2 vezes nas páginas 57 e 58.
- MENEELY, P. M. Pick your poisson: An educational primer for Luria and Delbrück's classic paper. *Genetics*, v. 202, p. 371–375, 2002. Citado na página 30.
- METCALF, W. W.; WANNER, B. L. Involvement of the *Escherichia coli* *phn* (*psiD*) gene cluster in assimilation of phosphorus in the form of phosphonates, phosphite, Pi esters, and Pi. *Journal of Bacteriology*, v. 173, n. 2, p. 587–600, January 1991. Citado 3 vezes nas páginas 79, 80 e 97.
- METCALF, W. W.; WANNER, B. L. Evidence for a fourteen-gene, *phnC* to *phnP* locus for phosphonate metabolism in *Escherichia coli*. *Gene*, v. 129, p. 27–32, 1993. Citado na página 79.
- MICHAELIS, S. et al. Mutations that alter the signal sequence of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 154(1), p. 366–374, 1983. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 58.
- MILLER, J. H. *A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for Escherichia coli and related bacteria*. [S.l.]: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992. Nenhuma citação no texto.
- MOUSSATOVA, A. et al. ATP-binding cassette transporters in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1778, p. 1757–1771, 2008. Citado 2 vezes nas páginas 79 e 97.
- MURPHY, K. C.; CAMPELLONE, K. G.; POTEETE, A. R. PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli*. *Gene*, v. 246, p. 321–330, February 2000. Citado na página 83.
- NAKANISHI-MATSUI, M.; SEKIYA, M.; FUTAI, M. ATP synthase from *Escherichia coli*: Mechanism of rotational catalysis, and inhibition with the ϵ subunit and phytopolyphenols. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, v. 1857, n. 2, p. 129–140, 2016. Citado na página 55.

- NESMEYANOVA, M. A. et al. Overproduction, secretion, isolation and properties of recombinant alkaline phosphatase encoded in *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, v. 32, n. 1, p. 1–7, 1997. Citado na página 29.
- NEVES, H. I. et al. Ugp and PitA participate in the selection of PHO-constitutive mutants. *Journal of Bacteriology*, v. 197, n. 8, p. 1378–1385, April 2015. Citado 12 vezes nas páginas 26, 29, 30, 34, 41, 50, 52, 58, 68, 73, 80 e 87.
- PETTIGREW, D. W. et al. *Escherichia coli* glycerol kinase. Cloning and sequencing of the *glpK* gene and the primary structure of the enzyme. *Journal of Biological Chemistry*, n. 263, p. 135–139, 1988. Citado 2 vezes nas páginas 55 e 74.
- RANKIN, D. J.; BARGUM, K.; KOKKO, H. The tragedy of the commons in evolutionary biology. *TRENDS in Ecology and Evolution*, v. 22, n. 12, p. 643–651, Nov. 2007. Citado na página 63.
- ROSEMBERG, H.; GERDES, R. G.; CHEGWIDDEN, K. Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 131, n. 2, p. 505–511, December 1977. Citado na página 28.
- SANTOS-BENNET, F. The Pho regulon: A huge regulatory network in bacteria. *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 1–13, April 2015. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 27.
- SARTHY, A.; MICHAELIS, S.; BECKWITH, J. Deletion map of the *Escherichia coli* structural gene for alkaline phosphatase, *phoA*. *Journal of Bacteriology*, v. 145, p. 288–292, 1981. Citado 3 vezes nas páginas 55, 57 e 74.
- SEIDEL, H. M. et al. Phosphonate biosynthesis: isolation of the enzyme responsible for the formation of a carbon–phosphorus bond. *Nature*, v. 335, p. 457–458, 1988. Citado na página 79.
- SHAO, J. *Finding new functions for Ugp and PitA transport systems of Escherichia coli K-12*. Tese (Doutorado) — Purdue University, 2007. Citado 3 vezes nas páginas 80, 87 e 97.
- SINGH, B. K. Organophosphorus-degrading bacteria: Ecology and industrial applications. *Nature Reviews Microbiology*, v. 7, n. 2, p. 156–164, 2009. Citado na página 79.
- SOLA, M. et al. Three-dimensional crystal structure of the transcription factor PhoB receiver domain. *J. Mol. Bio*, v. 285, p. 657–687, 1999. Citado na página 27.
- STASI, R.; NEVES, H. I.; SPIRA, B. Phosphate uptake by the phosphonate transport system PhnCDE. *BMC Microbiology*, v. 19, n. 79, p. 1–8, 2019. Citado na página 98.
- STEED, P. M.; WANNER, B. L. Use of the *rep* technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: Evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. *Journal of Bacteriology*, v. 175(21), p. 6797–6809, 1993. Citado na página 28.
- TEAM, R. core. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Viena, Austria, 2013. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Citado na página 39.

- TIMMS, A. R.; BRIDGES, B. A. Reversion of the tyrosine ochre strain *Escherichia coli* WU3610 under starvation conditions depends on a new gene *tas*. *Genetics*, n. 148, p. 1627–1635, Ap. 1998. Citado na página 73.
- TORRIANI, A. From cell membrane to nucleotides: The phosphate regulon in *Escherichia coli*. *Bio Essays*, v. 12, n. 8, p. 371–376, August 1990. Citado 6 vezes nas páginas 26, 28, 29, 41, 68 e 87.
- TORRIANI, A.; ROTHMAN, F. Mutants of *Escherichia coli* constitutive for alkaline phosphatase. *Journal of Bacteriology*, v. 81, n. 5, p. 835–836, Maio 1961. Citado 4 vezes nas páginas 26, 29, 41 e 87.
- VANBOGELEN, R. A. et al. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 178(5), p. 4344–4366, 1996. Nenhuma citação no texto.
- VERSHININA, O. A.; ZNAMENSKAYA, L. V. The PHO regulons of bacteria. *Microbiology*, v. 71(5), p. 497–511, 2002. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 27.
- VOEGELE, R. T.; BARDIN, S.; FINAN, T. M. Characterization of the *Rhizobium (Sinorhizobium) meliloti* high- and low-affinity phosphate uptake systems. *Journal of Bacteriology*, v. 179, n. 23, p. 7226–7232, Dez. 1997. Citado na página 97.
- VOEGELE, R. T.; SWEET, G. D.; BOOS, W. Glycerol kinase of *Escherichia coli* is activated by interaction with the glycerol facilitator. *Journal of Bacteriology*, v. 175, n. 4, p. 1087–1094, Feb. 1993. Citado na página 75.
- VOSS, J. G. Effects of organic cations on the gram-negative cell wall and their bactericidal activity with ethylenediaminetetra-acetate and surface active agents. *Journal Gen. Microbiology*, v. 48, p. 391–400, 1967. Citado na página 53.
- VUPPADA, R. K. et al. Phosphate signaling through alternate conformations of the PstSCAB phosphate transporter. *BMC Microbiology*, v. 18, n. 8, p. 1–9, 2018. Citado na página 28.
- WACKETT, L. P. et al. Involvement of the phosphate regulon and the *psiD* locus in carbon-phosphorus lyase activity of *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, v. 169, n. 4, p. 1753–1756, April 1987. Citado 2 vezes nas páginas 79 e 91.
- WANNER, B. L. Bacterial alkaline phosphatase clonal variation in some *Escherichia coli* K-12 *phoR* mutant strains. *Journal of Bacteriology*, v. 168(3), p. 1366–1371, 1986. Citado na página 28.
- WANNER, B. L. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *Journal of Biological Chemistry*, v. 51, p. 47–54, 1993. Citado 3 vezes nas páginas 27, 28 e 87.
- WANNER, B. L. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. *Escherichia coli and Salmonella*, ASM Press, p. 1357–1381, 1996. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 28.
- WANNER, B. L. Signal transduction in the control of phosphate-regulated genes of *Escherichia coli*. *Kidney International*, v. 49, p. 964–967, 1996. Citado na página 27.

WANNER, B. L.; BOLINE, J. A. Mapping and molecular cloning of the *phn* (*psiD*) locus for phosphonate utilization in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 172, n. 3, p. 1186–1196, Mar. 1990. Citado na página 80.

WANNER, B. L.; WILMES, M. R.; HUNTER, E. Molecular cloning of the wild-type *phoM* operon in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, v. 170(1), p. 279–288, 1988. Citado na página 27.

WEBB, D. C.; ROSENBERG, H.; COX, G. Mutational analysis of the *Escherichia coli* phosphate-specific transport system, a member of the traffic ATPase (or ABC) family of membranetransporter. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 267(34), p. 24661–24668, 1992. Citado na página 28.

WEBER, H. et al. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: σ S-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *Journal of Bacteriology*, v. 187, n. 5, p. 1591–1603, Mar. 2005. Citado na página 50.

WEISSENBORN, D. L.; WITTEKINDTN, N.; LARSONSII, T. J. Structure and regulation of the *glpFK* operon encoding glycerol glycerol diffusion facilitator and glycerol kinase of *Escherichia coli* K-12. *Biochemistry*, v. 267, n. 9, p. 6122–6131, 1992. Citado 2 vezes nas páginas 62 e 64.

WILLSKY, G. R.; MALAMY, M. H. Control of the synthesis of alkaline phosphatase and the phosphate binding protein in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 127(1), p. 595–609, 1976. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 58.

WILLSKY, G. R.; MALAMY, M. H. Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, v. 144, n. 1, p. 356–365, Out. 1980. Citado na página 97.

YAMADA, M. et al. Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: Analysis of mutant *phoB* and *phoR* genes causing different phenotypes. *Journal of Bacteriology*, v. 171, n. 10, p. 5601–5606, 1989. Citado na página 68.

YANG, B.; LARSON, T. J. Multiple promoters are responsible for transcription of the *glpEGR* operon of *Escherichia coli* K-12. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1369, n. 1, p. 114–126, 1998. Citado na página 64.

YANG, K.; WANG, M.; METCALF, W. W. Uptake of glycerol-2-phosphate via the *ugp*-encoded transporter in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, v. 191, n. 14, p. 4667–4670, July 2009. Citado na página 87.

YANG, Z.; LU, Z.; WANG, A. Study of adaptative mutations in *Salmonella typhimurium* by using a super-repressing mutant of a trans regulatory gene *purR*. *Mutation research*, v. 48, p. 95–102, 2001. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 73.