Nicolás Federico Villamil Munévar

Análise do metabolismo de polifosfato e
do operon *pst* em *Pseudomonas aeruginosa*

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

São Paulo
2015

Nicolás Federico Villamil Munévar

**Análise do metabolismo de polifosfato e
do operon *pst* em *Pseudomonas aeruginosa***

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Beny Spira

Versão original

São Paulo
2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Munévar, Nicolás Federico Villamil.

Análise do metabolismo de polifosfato e do operon *pst* em *Pseudomonas aeruginosa* / Nicolás Federico Villamil Munévar. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Beny Spira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Genética e adaptação de bactérias ao ambiente com ênfase na captação de fontes de fósforo; mutações adaptativas; evolução dirigida e biorremediação de águas residuárias.

Versão do título para o inglês: Analysis of the metabolism of polyphosphate and the *pst* operon in *Pseudomonas aeruginosa*.

1. *Pseudomonas aeruginosa* 2. Expressão gênica 3. Polifosfato 4. Fosfato 5. Operon *pst* 6. *phoU* I. Spira, Prof. Dr. Beny II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB070/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Nicolás Federico Villamil Munévar.

Título da Dissertação: Análise do metabolismo de polifosfato e do operon *pst* em *Pseudomonas aeruginosa*.

Orientador(a): Prof. Dr. Beny Spira.

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

(☐) **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) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 556/12 referente ao projeto intitulado: “*O metabolismo de polifosfato em P. aeruginosa e a sua relação com o operon pst e o gene pit*” sob a responsabilidade de **Nicolás Federico Villamil Munévar**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP n°196 de 1996.

São Paulo, 10 de outubro de 2012.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

**ESTE TRABAJO ESTÁ DEDICADO A MI FAMILIA Y AMIGOS, PERO,
MUY ESPECIALMENTE, A MIS PADRES, PABLO Y SUSANA, CUYO
INMENSO CARIÑO, COMPAÑÍA Y APOYO EN CADA UNO DE LOS
PROYECTOS EMPRENDIDOS DESDE NIÑO ME PERMITIERON
LLEGAR HASTA EL LUGAR DONDE HE LLEGADO EL DÍA DE HOY.**

AGRADECIMENTOS

Ao prof. Dr. Beny Spira, quem representou meu primeiro contato com o Brasil. Agradeço por abrir-me as portas de seu laboratório. Agradeço pelo apoio constante durante todo o mestrado, pela confiança depositada em mim e em meu trabalho, pelos ensinamentos da área, teóricos e experimentais, e pela extrema paciência. Agradeço também o imensurável apoio na escrita de minha dissertação. Por favor, saiba que tem toda minha admiração e gratidão. Sua dedicação pelo trabalho de seus alunos é realmente admirável.

Em especial, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

À Universidade de São Paulo e ao Departamento de Microbiologia, pela oportunidade de fazer parte de seu corpo discente.

Ao Luiz, meu primeiro companheiro de mestrado. Agradeço por ter sido receptivo sempre que precisei de ajuda em meus experimentos, por seus ensinamentos em técnicas e metodologias empregadas em minha pesquisa, por seus aportes em meu trabalho, e pela imensa ajuda na formatação deste documento. Por fim, agradeço também pela amizade.

À Gard, por ter-me acolhido em sua família e em seu coração. Você sabe que minha vida mudou assim que você chegou ao laboratório. Agradeço também pela ajuda em meus experimentos, e pelas sugestões e correções em meus documentos e em minha pesquisa em geral. Agradeço, também, por seu carinho e pela grande amizade.

Aos meus companheiros e amigos do laboratório 114: à Talita, por tirar de mim sempre um sorriso e por ter sido sempre atenciosa com minhas dúvidas de português; ao Rulho, por ser um exemplo de esforço, dedicação e de amor pela ciência; à Tuanny, por ser uma grande amiga, sempre disposta a me escutar quando precisei me desabafar, e por ter sido minha professora oficial de português ao longo do mestrado; à Jacke e à Auri, pelas conversas e bons momentos; e à Lívia, Jung, Luiza, Natália e ao Alessandro, pela companhia e momentos de descontração no laboratório.

Ao Emílio e à Larissa, pelo inestimável apoio com todas as questões técnicas do laboratório. Sem dúvida, vocês fizeram minha pesquisa muito mais simples. Agradeço também pelas conversas e pela amizade.

À profa. Dra. Cristiane Guzzo, por ter-me fornecido gentilmente o vetor pET-28a(+) e pelas orientações nos experimentos de clonagem, expressão e purificação de PhoB. Agradeço ao prof. Dr. Robson de Souza e, novamente, à profa. Dra. Cristiane Guzzo, por terem-me permitido utilizar os equipamentos de seu laboratório quando precisei purificar a proteína PhoB. Agradeço também a suas estudantes Fernanda e Cecília, pela ajuda com a utilização dos equipamentos e por ter compartilhado comigo suas experiências na área.

À profa. Dra. Regina Baldini, por ter-me fornecido gentilmente o vetor Mini-CTX-lacZ e por suas sugestões oportunas em meu trabalho. Agradeço também aos seus orientados: Ana Laura, Gianluca, Ana Paula e Gilberto, por ampliarem meus conhecimentos

por meio de discussões acadêmicas, as quais foram de grande ajuda em minha pesquisa.

À profa. Dra. Marílis Marques, por ter-me proporcionado a possibilidade de fazer parte de uma das turmas de sua maravilhosa disciplina Fundamentos de Biologia Molecular Bacteriana, e por ter-me permitido utilizar alguns materiais de seu laboratório em minha pesquisa. Agradeço também aos seus orientados: Maristela, Juliana, Ricardo e Carolina, por terem-me supervisionado com algumas questões experimentais ou por terem contribuído com sugestões em meu trabalho.

À profa. Dra. Márcia Mayer, por ter-me acolhido sempre em seu laboratório, permitindo-me utilizar seus equipamentos, que foram de grande ajuda em minha pesquisa. Agradeço também ao pessoal de seu laboratório: ao Maike, Marcela, Bruno, Lucas e, especialmente, ao Léo, pela gentileza sempre que precisei de alguma colaboração de vocês.

Ao prof. Dr. Chuck Farah, por ter-me cedido gentilmente a coluna de afinidade *HiTrap Chelating HP*.

Aos professores: Dr. Gabriel Padilla, Dr. Rodrigo Galhardo, Dr. Carlos Menck, Dr. Luis Carlos Ferreira, Dr. Gregório Gomez, Dr. René Schneider e à Dra. Silvana Cai, por terem-me permitido utilizar vários dos equipamentos de seus laboratório ou por terem contribuído com algum material relevante em minha pesquisa.

À Luci Navarro, funcionária do IQ, por sua colaboração em meus sequenciamentos de DNA, e pelas conversas acadêmicas que contribuíram no aprimoramento deles.

Aos funcionários do ICB II: Bete, Gisele, o pessoal do antigo SAT, o pessoal da limpeza, etc., pela gentileza e dedicação em seus trabalhos, os quais também contribuíram para a consecução deste meu trabalho.

À Renata e a dona Teresa, funcionárias da biblioteca do ICB, pelas correções na formatação deste documento e por toda sua gentileza.

À dona Neli, por ser minha mãe de coração no Brasil, por ter-me ajudado em momentos difíceis e por sempre me fazer sentir como um de seus filhos.

Aos meus pais, Pablo e Susana, e aos meus irmãos, Vivi e Alejo, por terem sempre sido meu chão, meu sustento e meu apoio em todos os caminhos de minha vida. Muito obrigado por confiarem em mim e por me fazerem sentir sempre amparado, mesmo estando fisicamente longe.

À Yas, por sua amizade e companhia, por ter sido a pessoa que me recebeu quando cheguei ao Brasil, pela ajuda com todas as questões referentes a minha permanência no país e por nossos papos, que me permitiram relaxar em momentos de alto estresse.

Aos meus melhores amigos: Liz, Natalia, Jenny e Leonardo, pela amizade ao longo do tempo, pelo apoio, motivação e pelos colóquios e risadas que sempre alegraram meus dias.

Aos meus amigos do ICB: César, Ruth, Vanessa, Roger, Felipe, Camilo, Ángel, Álex e o Luis, pelos momentos divertidos e pelas histórias contadas.

“Except for hydrogen, all the atoms that make each of us up—the iron in our blood, the calcium in our bones, the carbon in our brains—were manufactured in red giant stars thousands of light-years away in space and billions of years ago in time. We are, as I like to say, starstuff.”

— Carl Sagan, *The Demon-Haunted World*

RESUMO

VILLAMIL, N. F. **Análise do metabolismo de polifosfato e do operon *pst* em *Pseudomonas aeruginosa***. 2015. 88 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Pseudomonas aeruginosa é uma γ -*Proteobacteria* que habita diversos ambientes, alguns deles, extremamente limitados em nutrientes. A baixa disponibilidade de fosfato solúvel no meio gera a expressão coordenada dos genes do regulon Pho nessa bactéria, entre eles, o operon *pst*, que codifica um sistema de transporte de fosfato inorgânico (Pi) de alta afinidade. O último gene do operon *pst* codifica a proteína PhoU, que não participa do transporte de Pi, mas que, em conjunto com o sistema Pst, atua como repressora da expressão do regulon Pho quando há excesso desse nutriente no meio. A atividade de PhoU está também associada ao metabolismo de polifosfato (poliP), um polímero formado por dezenas ou centenas de unidades de Pi, dado que o nocaute de *phoU* causa um vasto acúmulo do biopolímero. Neste trabalho é mostrado que o gene *ppk*, que codifica a principal polifosfato quinase de *P. aeruginosa*, e *ppx*, cujo produto é uma exopolifosfatase, têm sua expressão afetada pela mutação *phoU*. Na ausência desse gene, a transcrição de *ppk* mais que dobra, enquanto que o nível de transcrição de *ppx* é quase três vezes menor que o da cepa selvagem. A modulação da expressão dos genes *ppk* e *ppx* explica, ao menos em parte, o acúmulo de poliP observado em mutantes *phoU*. Também, é mostrado que na cepa selvagem, a transcrição de *ppk* e de *ppx* aumenta no início da fase estacionária, e que ela não é afetada de forma positiva pela limitação de Pi. Concluiu-se, portanto, que ambos os genes são expressos a partir de promotores constitutivos não regulados por PhoB, o regulador de resposta do regulon Pho. Além disso, determinou-se que *ppk* é cotranscrito com *hemB*, um gene envolvido na síntese de porfirinas, com o qual forma um operon. A análise transcricional do operon *pst* de *P. aeruginosa* mostrou que o transcrito do primeiro gene do operon, *pstS*, é mais abundante que os demais transcritos do operon. Foi também identificado um promotor imediatamente a montante de *phoU*, o gene mais distal do operon, que estaria contribuindo para a expressão de *phoU* de forma independente da concentração de Pi no meio. Por fim, determinou-se que as sequências regulatórias Pho *box* presentes a montante de *pstS* e a montante de *pstC* são funcionais. Esse resultado sugere que a transcrição do operon *pst* de *P. aeruginosa* deve ocorrer a partir de dois locais diferentes.

Palavras-chave: Polifosfato. *ppk*. *ppx*. Operon *pst*. Fosfato. *Pseudomonas aeruginosa*. *phoU*. Regulon Pho. Transportador Pst. Regulação gênica. Pho *box*. Operon.

ABSTRACT

VILLAMIL, N. F. **Analysis of the metabolism of polyphosphate and of the *pst* operon in *Pseudomonas aeruginosa*.** 2015. 88 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

Pseudomonas aeruginosa is a γ -*Proteobacteria* inhabiting different environments, some of them, extremely limited in nutrients. The low availability of soluble phosphate in the environment generates the coordinated expression of the Pho regulon genes. The *pst* operon, that encodes an orthophosphate (Pi) transport system is a member of the Pho regulon. *phoU*, the last gene of the *pst* operon codes for a protein that does not participate in the transport of Pi, but which, together with the Pst system, represses the expression of the Pho genes when Pi is in excess. PhoU is also associated with metabolism of polyphosphate (polyP), a polymer consisting of tens or hundreds of Pi units, once the knockout of *phoU* results in a huge accumulation of the biopolymer in the cell. Here, it is shown that the *ppk* gene, that encodes the major polyphosphate kinase, and *ppx*, whose product is an exopolyphosphatase, have their expression affected by the *phoU* mutation. In the absence of *phoU*, *ppk* transcription increases more than twice, while the level of *ppx* transcription is only 1/3 of the one presented by the wild-type strain. The effect of the *phoU* mutation on *ppk* and *ppx* expression helps explaining the accumulation of polyP observed in *phoU* mutants. It is also shown that the transcription of *ppk* and *ppx* increases in the early stationary phase and that it is not affected by Pi limitation. It is concluded that both genes are expressed from constitutive promoters that are not regulated by PhoB, the response regulator of the Pho regulon. In addition, it was determined that *ppk* is co-transcribed with *hemB*, a gene involved in the synthesis of porphyrins, with which it forms an operon. Transcriptional analysis of the *pst* operon of *P. aeruginosa* showed that the transcript of *pstS*, the first gene of the operon, is more abundant than that of the other genes. A promoter immediately upstream of *phoU*, was identified. This promoter contributes to the expression of *phoU* under Pi-excess. Finally, it was determined that the two Pho boxes, one located upstream of *pstS* and the other upstream of *pstC* are functional. This result suggests that transcription of the *pst* operon of *P. aeruginosa* initiates at two different locations.

Keywords: Polyphosphate. *ppk*. *ppx*. *pst* operon. *Pseudomonas aeruginosa*. *phoU*. Pho regulon. Pst transporter. Gene regulation. Pho box. Operon.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Processo de captação e assimilação de Pi ambiental em bactéria. Adaptado de (NEIDHARDT, 1996).	23
Figura 2 –	Estrutura e funcionamento de várias proteínas codificadas por genes pertencentes ao regulon Pho de <i>E. coli</i>. PhoE, porina específica para ânions; FA, fosfatase alcalina; UgpB, proteína periplasmática de ligação a G3P; UgpA e UgpE, canais intermembranais para o transporte de G3P; UgpQ, ATPase que energiza o transporte de G3P; PstS, proteína periplasmática de ligação a Pi; PstA e PstC, canais intermembranais para o transporte de Pi; PstB, ATPase que energiza o transporte de Pi; PhoU, produto do gene <i>phoU</i> ; PhoR, histidina quinase, e PhoB, regulador de resposta. Adaptado de (TORRIANI-GORINI et al., 1994).	24
Figura 3 –	Organização dos genes do operon <i>pst</i> de <i>E. coli</i>. As duas <i>Pho box</i> e a sequência -10 a montante de <i>pstS</i> são apresentadas. A seta indica a direção de transcrição do operon.	25
Figura 4 –	Processo de ativação/inativação de PhoB por PhoR, seguido da ativação dos genes do regulon Pho. N e C representam as regiões amino- e carboxi-terminal de PhoB e PhoR. Em limitação de Pi, PhoR autofosforila-se e, a seguir, fosforila PhoB. A fosforilação de PhoB aumenta sua afinidade às sequências <i>Pho box</i> , ativando a transcrição do gene pela interação com a RNA polimerase associada ao fator σ^{70} . Adaptado de (TORRIANI-GORINI et al., 1994).	26
Figura 5 –	Organização dos genes do operon <i>pst</i> de <i>P. aeruginosa</i>. As duas <i>Pho box</i> e as duas sequências -10 a montante de <i>pstS</i> e também de <i>pstC</i> são apresentadas. A seta indica a direção de transcrição do operon.	31
Figura 6 –	Organização dos genes <i>ppk</i> e <i>ppx</i> no cromossomo de <i>P. aeruginosa</i>. As setas indicam a direção em que é transcrito cada gene.	32
Figura 7 –	Mecanismo gênico da integração e excisão do <i>backbone</i> do plasmídeo não replicativo promotor-Mini-CTX-<i>lacZ</i> em PA14 e o mutante <i>phoU</i>. O sítio <i>attP</i> , presente no plasmídeo contendo o promotor clonado, integra-se no cromossomo de PA14 pelo sítio <i>attB</i> por meio da atividade da integrase codificada pelo próprio vetor. Bactérias transformadas são então selecionadas em meio seletivo contendo tetraciclina. Finalmente, a proteína Flp, codificada pelo vetor pFLP2, excisa genes e promotores do plasmídeo integrado que, potencialmente, possam interferir na expressão da fusão transcricional. Adaptado de (BECHER; SCHWEIZER, 2000).	39

- Figura 8 – **Metodologia aplicada na construção de cepas de PA14 carregando fusões transcricionais de cópia única no cromossomo.** Bactérias de S17-1 carregando o plasmídio promotor-Mini-CTX-*lacZ* foram conjugadas com PA14. Exconjugantes de PA14 foram selecionados em placas de meio seletivo contendo tetraciclina e ácido nalidíxico. A seguir, as bactérias Tet^r foram eletroporadas com o vetor pFLP2, e os transformantes foram selecionados em placa contendo carbenicilina. Finalmente, bactérias Tet^s Car^r foram contra-selecionadas em meio L-ágar suplementado com sacarose 5%. Algumas colônias da placa com sacarose 5% foram repicadas em placas com antibiótico, X-gal e XP para confirmar a excisão do *backbone* do vetor, a cura do plasmídio pFLP2 e a atividade basal da β -galactosidase, e, no caso do mutante *phoU*, a atividade da FA. 41
- Figura 9 – **Sequência nucleotídica da porção 3' do gene *hemB* e 5' de *ppk* nas cepas PAO1 e 8830 de *P. aeruginosa*.** Aparecem sublinhadas as sequências Shine-Dalgarno putativas próximas ao códon de iniciação de tradução de PPK de cada cepa (ATG ou GTG). Na sequência correspondente à cepa 8830 aparece indicada a região promotora de *ppk*: são mostrados o sítio de início da transcrição (TSS), determinado por *primer extension* (ZAGO et al., 1999), e os elementos putativos -35 e -10 reconhecidos pelo fator σ^E . A sequência de aminoácidos de PPK predita é apresentada em baixo da sequência nucleotídica. Os números ao lado indicam o comprimento da sequência, e dentro de círculos cinzas aparecem marcados os SNPs encontrados. 52
- Figura 10 – **Deteção do transcrito *hemB-ppk*.** Em (a) são ilustrados os sítios de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados na análise, assim como os tamanhos esperados dos produtos de amplificação correspondentes à etapa de PCR convencional. A imagem não está em escala. Em (b) observa-se o gel de agarose 1% com os produtos finais da reação de RT-PCR. A) produto *hemB-ppk*; B) produto *hemB*; C) produto *ppk*. Controles negativos: oligonucleotídeos PA14-*hemB(g)*-F/PA14-*hemB(g)*-R; D) RT-PCR sem transcriptase reversa; E) RT-PCR sem RNA molde; oligonucleotídeos PA14-*ppk(g)*-F/PA14-*ppk(g)*-R; F) RT-PCR sem transcriptase reversa; G) RT-PCR sem RNA molde. 53
- Figura 11 – **Possível organização dos genes *hemB* e *ppk* no cromossomo de PA14.** São mostradas as regiões clonadas no vetor mini-CTX-*lacZ* para a avaliação de atividade promotora mediante ensaios de β -galactosidase. Os círculos brancos representam regiões intergênicas. 54
- Figura 12 – **Avaliação da atividade de dois possíveis promotores do gene *ppk* em meio DPMM suficiente (1 mM) e limitado (0,2 mM) em Pi.** Bactérias carregando as inserções cromossomais (*hemB-ppk*) *P-lacZ* e *ppkP-lacZ* foram analisadas após 4 e 8 horas de crescimento em relação à atividade da β -galactosidase e fosfatase alcalina. Os valores apresentados e o desvio padrão da média correspondem a réplicas de três experimentos independentes. 55

Figura 13 – Efeito de PhoU sobre a expressão de <i>(hemB–ppk)P-lacZ</i> e <i>ppxP-lacZ</i> . A cepa selvagem PA14 e o mutante <i>phoU</i> , carregando as inserções cromossomais <i>(hemB–ppk)P-lacZ</i> e <i>ppxP-lacZ</i> , foram cultivadas em meio DPMM suficiente em Pi (1 mM). A expressão das fusões foi avaliada a cada 2 horas em ensaios de β -galactosidase. Os valores apresentados e o desvio padrão da média correspondem a três experimentos independentes.	57
Figura 14 – Sequências consenso na região promotora necessárias à regulação do gene <i>ppx</i> de <i>P. aeruginosa</i> PAO1. Fonte: (GALLARATO et al., 2014).	58
Figura 15 – Efeito de PhoU sobre a expressão de <i>(hemB–ppk)P-lacZ</i> e <i>ppxP-lacZ</i> em diferentes condições de crescimento. Bactérias carregando as inserções cromossomais <i>(hemB–ppk)P-lacZ</i> e <i>ppxP-lacZ</i> foram cultivadas em meio DPMM +Pi, -Pi e -N a 37 °C e ensaiadas nos tempos de 4 e 8 horas para a atividade da β -galactosidase e fosfatase alcalina. Os valores apresentados e o desvio padrão da média correspondem a três experimentos independentes.	59
Figura 16 – Alinhamento das sequências <i>Pho box</i> putativas presentes nos promotores de <i>ppx</i> e <i>phoX</i> das espécies <i>P. aeruginosa</i> e <i>P. fluorescens</i> , respectivamente. Foi usada a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) para o alinhamento das sequências. Fonte das sequências: (GALLARATO et al., 2014; MONDS et al., 2006).	62
Figura 17 – Operon <i>pst</i> de <i>P. aeruginosa</i> apresentando as regiões de amplificação por PCR das sondas de DNA utilizadas no ensaio de <i>northern blot</i> . A seta tracejada representa a transcrição da espécie de mRNA detectada correspondente ao transcrito de <i>pstS</i> .	63
Figura 18 – Análise do operon <i>pst</i> por <i>northern blot</i> . Cada sonda biotinizada utilizada para hibridizar com os respectivos transcritos aparece identificada na membrana. O RNA foi extraído de culturas de PA14 cultivadas em meio DPMM em suficiência (+ Pi) ou deficiência (- Pi) de fosfato.	64
Figura 19 – Estrutura secundária com forma de grampo presente na região intergênica entre <i>pstS</i> e <i>pstC</i> . O grampo apresenta uma haste de GCs e 3 uracilas próximas da região 3' do mRNA.	65
Figura 20 – Esquema do operon <i>pst</i> de PA14 no qual aparece indicada a região <i>pstB-phoU</i> amplificada por PCR e clonada no Mini-CTX- <i>lacZ</i> . A atividade promotora dessa região foi avaliada através de ensaios de β -galactosidase.	66
Figura 21 – Avaliação da atividade promotora na região imediatamente a montante de <i>phoU</i> . Bactérias foram cultivadas em meio DPMM +Pi e -Pi a 37 °C. 4 e 8 horas após o início do crescimento, alíquotas de bactérias foram coletadas e avaliadas em ensaios de β -galactosidase. Foi também testada a atividade da fosfatase alcalina de cada cultura. Os valores apresentados e o desvio padrão da média correspondem a três experimentos independentes.	67
Figura 22 – Mini ensaio de indução de PhoB-His. SDS-PAGE (15%) com os extratos de proteína das culturas de BL21 (DE3) crescidas a 30 e 37 °C. As culturas induzidas foram tratadas com IPTG a uma concentração de 1 mM por 4 horas.	68

- Figura 23 – **Purificação de PhoB-His por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados.** A coluna de afinidade carregada com Ni^{2+} foi equilibrada com tampão de ligação (50 mM de tris·HCl (pH 8,0), 200 mM de NaCl e 10 mM de imidazol). Uma cultura de BL21 (DE3), cultivada a 30 °C por 4 horas em LB suplementado com 0,5 mM de IPTG, foi lisada, clarificada e inserida na coluna de afinidade. Depois de várias lavagens com tampão de ligação, a proteína foi eluída com tampão de eluição contendo imidazol (500 mM). (a) O cromatograma apresentado corresponde às diferentes frações de PhoB-His eluídas da coluna. (b) Gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE 15%) com as frações de eluição (2-10) da purificação de PhoB-His. 69
- Figura 24 – **Ensaio de ligação *in vitro* de PhoB nas regiões promotoras dos genes *pstS*, *pstC* e *ppx*.** São apresentados os resultados dos ensaios de retardo da mobilidade eletroforética no estudo da ligação da proteína PhoB-His em três promotores de interesse. Os sítios de ligação encontram-se centrados em suas sequências Pho *box* putativas. Cada sonda foi incubada com 0; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 5; 10; 15 e 20 μM de PhoB-His como mostrado. O DNA livre e o complexo PhoB-His-DNA foram nomeados como L e C, respectivamente. Cada gel foi visualizado por autorradiografia (esquerda) e por análise com *phosphorimager* (direita). 71
- Figura 25 – **Determinação da faixa de linearidade do espectrofotômetro de microplacas EpochTM nos comprimentos de onda de 420 e 600 nm.** Foram preparadas diluições seriadas a partir de uma solução de ONP e de uma cultura de PA14 crescida *overnight* em meio LB. Os valores de DO_{420} e de DO_{600} foram então determinados no espectrofotômetro de placas. 85
- Figura 26 – **Comparação do crescimento de culturas de *P. aeruginosa* PA14 crescidas em tubo de ensaio e em microplaca de 24 poços de 2,2 ml.** As bactérias foram cultivadas em meio DPMM +Pi por 10 horas a 37°C sob agitação de 170 rpm. A DO_{600} foi determinada a cada 2 horas em um espectrofotômetro de microplacas. Os dados representam o resultado de um único experimento. 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cepas e plasmídios utilizados neste trabalho	35
Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

(p)ppGpp	guanosina pentafosfato e tetrafosfato
Amp	ampicilina
ATP	trifosfato de adenosina
AttB	sítio de ligação no cromossomo bacteriano
AttP	sítio de ligação localizado no DNA do fago
BLAST	<i>basic local alignment search tool</i>
Car	carbenicilina
cDNA	DNA complementar
CPM	contagem por minuto
CTAB	brometo de cetiltrimetilamônio
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTP	desoxirribonucleotídeos trifosfatados
DO	densidade óptica
DPMM	meio mínimo definido de fosfato
DTT	ditriotreitol
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
EMSA	ensaio de retardo da mobilidade eletroforética
FA	enzima fosfatase alcalina
Flp	enzima flipase
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kb	quilobases
kDa	quilodaltons
kpb	quilopares de bases
LB	caldo lisogênico
mRNA	RNA mensageiro
nt	nucleotídeos
ONP	o-nitrofenol
ONPG	o-nitrofenil- β -D-galactopiranosídeo

ORF	quadro aberto de leitura
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
Pi	fosfato inorgânico
PNK	enzima polinucleotídeo quinase
pNPP	p-nitrofenilfosfato
PoliP	polifosfato
PPK	enzima polifosfato quinase
PPX	enzima exopolifosfatase
RNA	ácido ribonucleico
RNase	ribonuclease
RT-PCR	reação da transcriptase reversa seguida de PCR
SDS	dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
SNP	polimorfismo de nucleotídeo único
SSC	tampão salino de citrato de sódio
TBE	tampão tris-borato-EDTA
TCEP	tris-[2-carboxietil]-fosfina
Tet	tetraciclina
TSS	sítio de início da transcrição
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
XP	5-bromo-4-cloro-3'-indolilfosfato

SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO 21
2	REFERENCIAL TEÓRICO 23
2.1	Captação de Pi e os processos de regulação gênica envolvidos 23
2.2	Polifosfato 27
2.3	A proteína PhoU 28
2.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> e o metabolismo de Pi 30
3	OBJETIVOS 33
3.1	Objetivos gerais 33
3.2	Objetivos específicos 33
4	MATERIAIS E MÉTODOS 34
4.1	Cepas e plasmídios 34
4.2	Meios de cultura 34
4.3	Construção de fusões transcricionais com o gene <i>lacZ</i> 34
4.3.1	Amplificação das regiões promotoras 34
4.3.2	Clonagem dos promotores nos vetores pTZ57R/T e pGEM [®] -T <i>Easy</i> . 36
4.3.3	Subclonagem dos promotores no vetor Mini-CTX- <i>lacZ</i> 37
4.4	Sequenciamento 38
4.5	Integração cromossomal das fusões transcricionais construídas com o vetor Mini-CTX- <i>lacZ</i> , no cromossomo de PA14 e do mutante <i>phoU</i> 38
4.6	Eletrotransformação de <i>E. coli</i> e <i>P. aeruginosa</i> 38
4.7	Conjugação 40
4.8	Excisão dos genes do <i>backbone</i> do Mini-CTX- <i>lacZ</i> do cromossomo de PA14 e do mutante <i>phoU</i> 40
4.9	Avaliação da faixa de linearidade do espectrofotômetro de microplacas Epoch TM 41
4.10	Ensaio de β -galactosidase em microplaca de 96 poços 42
4.11	Ensaio de fosfatase alcalina 43
4.12	Extração de RNA total 43
4.13	Deteção do transcrito <i>hemB-ppk</i> por RT-PCR 44
4.14	Determinação do padrão de transcrição do operon <i>pst</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> por <i>northern blot</i> 44
4.14.1	Eletroforese em gel de agarose/formaldeído 45
4.14.2	Transferência do RNA para a membrana 45
4.14.3	Preparação das sondas 45
4.14.4	Prehibridização, hibridização e detecção 45
4.15	Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA) 46
4.15.1	Amplificação de <i>phoB</i> e clonagem em pGEM [®] -T <i>Easy</i> 46
4.15.2	Subclonagem no vetor pET-28a(+) 46
4.15.3	Testes de expressão e solubilidade da proteína recombinante PhoB-His 47
4.15.3.1	Mini ensaio de indução 47
4.15.3.2	Testes de solubilidade 47

4.15.4	Purificação de PhoB-His recombinante por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)	48
4.15.5	Fosforilação de PhoB-His	49
4.15.6	Marcação das extremidades dos fragmentos de DNA com [γ - 32 P]-ATP	49
4.15.7	Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA)	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	51
5.1	Identificação do promotor principal do gene <i>ppk</i> de PA14 . .	51
5.2	Avaliação do efeito da mutação <i>phoU</i> sobre a regulação dos genes <i>ppk</i> e <i>ppx</i> de PA14	56
5.3	Determinação do padrão de transcrição do operon <i>pst</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	63
5.3.1	Detecção dos transcritos de <i>pst</i> por <i>northern blot</i>	63
5.3.2	Identificação de um promotor alternativo a montante de <i>phoU</i>	66
5.4	Avaliação da funcionalidade das sequências Pho <i>box</i> do operon <i>pst</i> e da possível regulação de PhoB sobre o gene <i>ppx</i> de PA14	68
6	CONCLUSÕES	73
	REFERÊNCIAS	74
	ANEXOS	84
	ANEXO A – AVALIAÇÃO DA FAIXA DE LINEARIDADE DO ESPECTROFOTÔMETRO DE MICROPLACAS EPOCHTM	85
	ANEXO B – COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO DE CULTURAS DE PA14 EM TUBO DE ENSAIO E EM MICROPLACA DE 24 POÇOS DE 2,2 ML	87

1 INTRODUÇÃO

Fósforo é um nutriente essencial para todas as formas de vida conhecidas, constituindo aproximadamente 3% do peso seco de todos os organismos (WHITE; METCALF, 2007). O fósforo é encontrado na natureza principalmente em sua forma química mais oxidada, (PO_4^{3-}), designada ortofosfato ou simplesmente fosfato inorgânico (Pi). Grande parte do Pi que está na natureza encontra-se na forma de sais minerais insolúveis. Apesar da relativa abundância do nutriente, sua biodisponibilidade no ambiente é baixa, sendo um dos elementos que mais restringe a produtividade biológica em sistemas naturais, tanto aquáticos como terrestres (ANBA et al., 1990; TURNER et al., 2005).

A título de exemplo, na agricultura o Pi deve ser suplementado por meio do uso de fertilizantes. Parte do Pi procedente acaba precipitando, formando complexos insolúveis com componentes do solo, e sofrendo lixiviação. A drenagem desses compostos para corpos de água de ambientes naturais traz como consequência o aumento da concentração de fósforo, sendo esse o principal fator desencadeador do processo de eutrofização em ecossistemas aquáticos (CAMPILLO et al., 1999; YEOMAN et al., 1988). Outro fator significativo que contribui para o aumento nocivo de fósforo nesses ambientes naturais é o lançamento deliberado de rejeitos líquidos, detergentes e outros compostos que contêm fósforo em suas formulações (YEOMAN et al., 1988).

Antes de serem liberadas na natureza, águas residuárias devem passar por um tratamento adequado, que inclui a remoção de fósforo. O tratamento biológico das águas de rejeitos fundamenta-se na capacidade que microrganismos têm em captar grandes quantidades de Pi, armazenando-o principalmente na forma de polifosfato (poliP) (CHRISTENSSON et al., 1998). Parte da remoção biológica do fósforo deve-se à atividade de bactérias de diversos gêneros: *Acinetobacter* spp. (WENTZEL et al., 1986), *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Moraxella*, *Bacillus* e *Corynebacterium* (HIRAISHI; MORISHIMA, 1990; LIN-LIN et al., 2007; STREICHAN et al., 1990).

Considerando-se a técnica de remoção biológica de fósforo como uma alternativa apropriada aos processos clássicos de remoção desse nutriente de águas residuárias, é desejável aprimorar a capacidade de armazenamento de Pi na forma de poliP em bactérias. De fato, já foram descritas cepas modificadas de *E. coli* com capacidade de captar 10 vezes mais Pi e armazená-lo na forma de poliP (HARDOYO et al., 1994; KATO et al., 1993; OHTAKE et al., 1994). A identificação e estudo de bactérias com maior capacidade de

captação de Pi será importante para o aperfeiçoamento dos processos de remoção desse nutriente em áreas contaminadas. Desta forma, o presente trabalho visa contribuir para o entendimento dos fatores que regem as bases moleculares da síntese e degradação de poliP e captação de Pi, contribuindo para a compreensão dos processos associados ao metabolismo de Pi em *P. aeruginosa*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Captação de Pi e os processos de regulação gênica envolvidos

Em bactérias, é possível encontrar fósforo na estrutura de diversas biomoléculas, sendo um constituinte essencial de ácidos nucleicos, carboidratos complexos, proteínas modificadas e fosfolipídios. Ele também está associado a processos de metabolismo energético, em virtude da presença de ligações fosfoanidridas de alta energia, como em moléculas de ATP, fosfoenolpiruvato e acetilfosfato (NEIDHARDT, 1996).

Três tipos de compostos são utilizados por bactérias como fonte principal de P: ortofosfato (P_i), a fonte de P predileta, organofosfatos e fosfonatos (NEIDHARDT, 1996). Independentemente da natureza química do nutriente, seu processo de assimilação compreende duas etapas: a captação, na qual atua algum tipo de transporte ativo, e o metabolismo, no qual o P_i irá geralmente formar moléculas de ATP, que será utilizado como substrato em diversas rotas anabólicas e catabólicas (Figura 1).

Devido à baixa disponibilidade de fósforo solúvel na natureza, as bactérias desenvolveram respostas adaptativas que lhes conferem a capacidade de captar P_i , e outras fontes alternativas de P, de forma eficiente, mesmo quando sua concentração no meio é baixa. A adaptação bacteriana ao crescimento em baixas concentrações de P_i ambiental é executada de maneira coordenada pelos genes pertencentes ao regulon Pho (Figura 2). O controle deste conjunto de genes por P_i extracelular representa o modelo de um sistema regulatório de dois componentes.

Figura 1 – Processo de captação e assimilação de P_i ambiental em bactéria. Adaptado de (NEIDHARDT, 1996).

Figura 2 – Estrutura e funcionamento de várias proteínas codificadas por genes pertencentes ao regulon Pho de *E. coli*. PhoE, porina específica para ânions; FA, fosfatase alcalina; UgpB, proteína periplasmática de ligação a G3P; UgpA e UgpE, canais intermembranais para o transporte de G3P; UgpQ, ATPase que energiza o transporte de G3P; PstS, proteína periplasmática de ligação a Pi; PstA e PstC, canais intermembranais para o transporte de Pi; PstB, ATPase que energiza o transporte de Pi; PhoU, produto do gene *phoU*; PhoR, histidina quinase, e PhoB, regulador de resposta. Adaptado de (TORRIANI-GORINI et al., 1994).

Figura 3 – **Organização dos genes do operon *pst* de *E. coli*.** As duas *Pho box* e a sequência -10 a montante de *pstS* são apresentadas. A seta indica a direção de transcrição do operon.

Em *E. coli*, o regulon Pho é formado por pelo menos 31 genes distribuídos em nove unidades transcricionais, espalhadas aleatoriamente no cromossomo da bactéria (NEIDHARDT, 1996). Entretanto, a descoberta de genes novos que respondem ao estímulo de limitação de Pi indicam que a lista de genes pertencentes ao regulon Pho tende a aumentar (BAEK; LEE, 2006; HAN et al., 1999). Os membros do regulon Pho melhor estudados são: (i) PhoE, uma porina específica para ânions (KORTELAND et al., 1982; KORTELAND et al., 1984); (ii) FA, uma fosfatase alcalina periplasmática (TORRIANI, 1960); (iii) o sistema Ugp, que forma um transportador específico de glicerol-3-fosfato (G3P) e de glicerofosfodiésteres (SCHWEIZER; BOOS, 1984; YANG et al., 2009); (iv) as proteínas envolvidas no transporte e utilização de fosfonatos codificadas pelo operon *phnCDEFGHIJKLMNOP* (MAKINO et al., 1991; WACKETT et al., 1987); (v) PhoU e as proteínas que formam o transportador de Pi de alta afinidade, todas codificadas pelo operon *pst*; e (vi) as proteínas PhoB e PhoR.

No regulon Pho, o sensoriamento das concentrações de Pi ambiental e o processo de transdução de sinal demanda a atividade conjunta de sete proteínas: o sistema de dois componentes PhoB/PhoR e as cinco proteínas codificadas pelo operon *pst*.

Além de participar da regulação de Pho, Pst forma um sistema de transporte do tipo ABC (*ATP-binding cassette*). Sua atividade é exercida por meio das proteínas: PstS, uma proteína periplasmática de elevada afinidade por Pi, PstC e PstA, duas proteínas integrais de membrana através das quais é conduzido Pi, e PstB, uma ATPase associada à membrana citoplasmática, que hidroliza ATP para gerar a energia para o transporte [Chan and Torriani, 1996]. Em *E. coli*, os genes que codificam as proteínas do transportador Pst encontram-se agrupados formando um operon de cinco genes denominado operon *pst* (Figura 3). Os quatro genes proximais do operon (*pstS*, *pstC*, *pstA* e *pstB*) codificam o transportador de Pi. O gene mais distal codifica a proteína PhoU. Esta é uma proteína associada à membrana citoplasmática e que não participa da captação de Pi. A função

exata de PhoU é desconhecida.

A expressão dos genes do regulon Pho é controlada pelo sistema de dois componentes PhoB/PhoR. PhoR é a histidina quinase sensora (MAKINO et al., 1986) e, PhoB, o regulador de resposta. Em *E. coli*, quando Pi está em excesso, PhoR, que é uma proteína bifuncional, desfosforila PhoB, inativando-a (CARMANY et al., 2003; TORRIANI-GORINI et al., 1994). Quando a concentração de Pi no ambiente extracelular é menor que 4 μM (HOCH; SILHAVY, 1995), PhoR autofosforila-se e, em seguida, transfere o grupo fosforil a PhoB (MAKINO et al., 1989; TORRIANI-GORINI et al., 1994). Uma vez fosforilada, PhoB liga-se às regiões promotoras de genes que apresentam sequências consenso características, conhecidas como Pho *box*. Por fim, a interação de PhoB com o fator σ^{70} associado à RNA polimerase propicia o início da transcrição desses genes (MAKINO et al., 1988) (Figura 4).

Figura 4 – Processo de ativação/inativação de PhoB por PhoR, seguido da ativação dos genes do regulon Pho. N e C representam as regiões amino- e carboxi-terminal de PhoB e PhoR. Em limitação de Pi, PhoR autofosforila-se e, a seguir, fosforila PhoB. A fosforilação de PhoB aumenta sua afinidade às sequências Pho *box*, ativando a transcrição do gene pela interação com a RNA polimerase associada ao fator σ^{70} . Adaptado de (TORRIANI-GORINI et al., 1994).

Na levedura *S. cerevisiae*, o Pi intracelular contribui para a regulação da expressão de genes implicados na captação e assimilação de Pi (AUESUKAREE et al., 2004). No entanto, em bactérias isso não acontece, pois não há flutuações significativa nos níveis de Pi intracelular que antecedam a ativação do regulon Pho (TORRIANI-GORINI et al., 1994). Portanto, se o Pi citoplasmático não tem efeito sobre o regulon Pho, como o sinal de carência de Pi chega a PhoR?

Ainda não se compreende de modo exato como PhoR recebe o sinal que estimula a sua ativação, nem como consegue modular as atividades de quinase e fosfatase. Porém, sendo PhoR uma histidina quinase desprovida de domínio sensor periplasmático (CARMANY et al., 2003), acredita-se que ela detecta Pi de maneira indireta: pela interação de seu domínio citoplasmático com as proteínas que compõem o transportador Pst, via PhoU (GARDNER et al., 2014; HSIEH; WANNER, 2010).

2.2 Polifosfato

Polifosfato é uma molécula que constitui a forma polimérica de Pi, sendo formada por monômeros unidos de maneira linear através de ligações fosfoanidridas. Longas moléculas de poliP foram observadas em organismos procarióticos e eucarióticos (KULAEV et al., 2005). Em bactérias, o poliP pode formar complexos com diversos cátions de importância biológica, como Ca^{2+} , Mg^{2+} e K^{+} , e também com cátions de metais pesados, como Sr^{2+} , Ba^{2+} e Mn^{2+} . Por intermédio desses íons divalentes o poliP consegue formar também complexos celulares maiores com moléculas de ácidos nucleicos (i.e., RNA ou DNA) ou proteínas (KULAEV et al., 2005).

A possibilidade de estabelecer complexos com diferentes moléculas biológicas importantes sugere que o biopolímero desempenha funções diversas. Entre elas, podemos citar: (a) fonte de energia e doador de Pi em reações de metabolismo energético (VEEN et al., 1994); (b) reservatório de Pi (HARDOYO et al., 1994; KATO et al., 1993; OHTAKE et al., 1994); e, especialmente, (c) regulação de diferentes processos bacterianos, tais como a adaptação a diferentes tipos de estresses ambientais e nutricionais (GRAY et al., 2014; GRAY; JAKOB, 2015; GRILLO-PUERTAS et al., 2014; KURODA et al., 1999; RAO; KORNBERG, 1996); a sobrevivência na fase estacionária, via ativação do fator σ RpoS (SHIBA et al., 1997), que coordena a resposta geral ao estresse; e, a virulência e patogenicidade (RASHID et al., 2000b; RASHID; KORNBERG, 2000).

No metabolismo de poliP estão envolvidas principalmente duas proteínas: PPK, uma polifosfato quinase, e PPX, uma exopolifosfatase. PPK é uma proteína que sintetiza longas cadeias de poliP (i.e., de 750 a 1000 resíduos de Pi) exclusivamente a partir de ATP em um mecanismo de síntese processivo (AHN; KORNBERG, 1990; RAO et al., 1985; ROBINSON; WOOD, 1986). A enzima utiliza iniciadores de poliP curtos (i.e., 6-80 resíduos de Pi) gerando exclusivamente moléculas de alto peso molecular (KORNBERG et al., 1956; ROBINSON et al., 1987). No entanto, o mecanismo desse processo ainda não foi plenamente elucidado. PPK também consegue catalisar a reação contrária (i.e., a síntese de ATP a partir de poliP) (AHN; KORNBERG, 1990; KORNBERG, 1957; KURODA; KORNBERG, 1997; MURATA et al., 1988). PPX, por sua vez, hidrolisa longas moléculas de poliP a partir da extremidade da molécula em um processo eminentemente processivo (AKIYAMA et al., 1993; BOLESCH; KEASLING, 2000). Em condições de crescimento normal, a atividade conjunta das duas proteínas consegue manter em equilíbrio os níveis intracelulares de poliP na bactéria.

Em *E. coli*, as proteínas PPK e PPX são codificadas pelos genes *ppk* e *ppx*, respectivamente, os quais são cotranscritos e formam, portanto, um operon. (AKIYAMA et al., 1993; KATO et al., 1993). Embora na atualidade exista informação razoável sobre os diferentes estresses ambientais que geram a síntese e o acúmulo de poliP nessa bactéria, pouco é conhecido quanto à expressão dos genes *ppk* e *ppx*. Foi constatado que a limitação de purinas, em mutantes *purF*, cujo gene codifica uma enzima envolvida na rota biosintética de nucleotídeos púricos, parece induzir a expressão do operon *ppk-ppx* (JUNG et al., 2012). Além disso, a deficiência de Pi e aminoácidos no meio de cultura também estimula a expressão desse operon (JUNG et al., 2012). Contudo, a atividade desses genes não parece ser dependente de PhoB (DIEN; KEASLING, 1999; MOROHOSHI et al., 2002; NEIDHARDT, 1996)

2.3 A proteína PhoU

A exata função da proteína PhoU ainda é desconhecida. Ensaio com o sistema de interação duplo-híbrido mostraram que PhoU interage com PhoR e com o transportador Pst (GARDNER et al., 2014). Surpreendentemente, não existe nenhuma referência de outros transportadores ABC bacterianos que apresentem uma proteína PhoU análoga (MUDA et al., 1992).

Em *E. coli*, PhoU é uma proteína periférica de baixo peso molecular (i.e., 27 kDa) associada à membrana citoplasmática (NAKATA et al., 1984), que pertence à superfamília de proteínas PhoU. Pesquisas desenvolvidas com mutantes $\Delta phoU$ relacionaram a atividade de PhoU com outros processos biológicos:

1. **Defeitos no crescimento:** o mutante $\Delta phoU$ apresenta menor taxa de crescimento e rendimento celular. Esse fenótipo pode ser suprimido se houver uma mutação em algum dos genes que codifica o sistema Pst (*pstSCAB*) ou em *phoB*. Isso acontece, possivelmente, porque, na ausência de *phoU*, a expressão constitutiva do transportador Pst é tóxica para a bactéria (STEED; WANNER, 1993). O motivo dessa toxicidade ainda é desconhecido. Porém, resultados preliminares obtidos em nosso laboratório com o mutante *phoU* de *P. aeruginosa* mostraram que o excesso de Pi acumulado pela bactéria estaria quelando íons de magnésio, necessários à síntese proteica e ao funcionamento de diversas enzimas. Uma hipótese seria a de que na presença de PhoU, o Pi captado seria convertido em uma molécula sinalizadora, talvez atuando como substrato na síntese de ATP (STEED; WANNER, 1993).
2. **Acúmulo de polifosfato:** *E. coli* selvagem não exhibe acúmulo considerável de poliP durante o crescimento em meio de cultivo complexo (< 1 nmol de poliP/mg de proteína). Por outro lado, *P. aeruginosa* e *H. pylori* podem acumular até 850 e 190 nmol de poliP/mg proteína, respectivamente (KIM et al., 1998). Já quando *phoU* está ausente, ocorreria um defeito na sinalização, acarretando um superacúmulo de poliP na célula. Assim, o mutante *phoU* de *E. coli* acumula quantidades significativas de poliP no citoplasma sob condições de crescimento normal (400 nmol poliP/mg de proteína) (MOROHOSHI et al., 2002).
3. **Resistência bacteriana:** o mutante $\Delta phoU$ apresenta caracteristicamente maior sensibilidade a diferentes tipos de antibióticos e estresses, como calor, estresse oxidativo, pH ácido, carência nutricional, etc., e também é deficiente no fenômeno de persistência bacteriana (LI; ZHANG, 2007).

Desta maneira, os diversos efeitos pleiotrópicos da mutação *phoU* sugerem um papel regulatório que vai muito além do metabolismo de Pi.

2.4 *Pseudomonas aeruginosa* e o metabolismo de Pi

Bactérias são organismos com uma surpreendente capacidade adaptativa diante de possíveis mudanças no seu microambiente. Esta habilidade é obtida através da correta adequação de seu metabolismo e fisiologia às novas condições do meio, logrando assim colonizar os mais variados ambientes naturais. Esta definição vale perfeitamente para descrever a espécie *P. aeruginosa*, que se encontra universalmente distribuída, em ambientes aquáticos e terrestres (GREEN et al., 1974; MONDS et al., 2006).

P. aeruginosa é um bacilo Gram-negativo do grupo das γ -*Proteobacteria* e de flagelo polar único. Diferentemente de outros membros do gênero *Pseudomonas*, a *P. aeruginosa* é uma espécie patogênica oportunista, sendo a maioria das infecções observadas em indivíduos imunocomprometidos, tais como pacientes com câncer (BENDIG et al., 1987), fibrose cística (FITZSIMMONS, 1993) e AIDS (ALI et al., 1995; KIELHOFNER et al., 1992). A infecção de queimaduras na pele também é frequente (CHURCH et al., 2006).

P. aeruginosa tem requerimentos nutricionais muito versáteis e tem a capacidade de crescer sob condições aeróbias e anaeróbias, usando NO_3 ou arginina como aceptor final de elétrons da cadeia respiratória (REHM, 2008). A produção de vários pigmentos, envolvidos em diferentes processos celulares, é uma característica desta bactéria. Dentre esses, encontram-se: (i) pioverdina e piochelina, potentes agentes quelantes necessários à captação do ferro presente no ambiente; e (ii) piocianina, um fator de virulência de alta toxicidade que gera espécies reativas de oxigênio nas células do hospedeiro (MULLER, 2002).

O genoma da cepa PAO1 de *P. aeruginosa*, de 6,3 milhões de pares de bases, foi o primeiro genoma da espécie a ser sequenciado. Dos genes desta bactéria, 8,4% estão provavelmente envolvidos em algum tipo de regulação, sendo essa uma proporção altíssima não encontrada ainda em nenhuma outra bactéria (STOVER et al., 2000). Tendo um extenso catálogo de genes envolvidos em regulação, transporte, catabolismo, quimiotaxia e efluxo de compostos orgânicos, *P. aeruginosa* torna-se uma bactéria profissional no que tange às estratégias de adaptação e sobrevivência (LEE et al., 2006).

Além de PAO1, os genomas da cepa PA14 e de outras nove cepas de *P. aeruginosa* também são conhecidos. O genoma de PA14 é ligeiramente maior que o de PAO1, tendo aproximadamente 6,5 milhões de pares de bases. Aproximadamente, 95,8% do genoma de PAO1 está presente no genoma de PA14, e 91,7% do genoma de PA14 corresponde

ao genoma de PAO1. Dessa forma, PA14 apresenta genes adicionais, a maioria deles envolvidos em patogenicidade (LEE et al., 2006).

A resposta à limitação de Pi extracelular já foi descrita também em *P. aeruginosa*, apesar de não ter sido tão bem estudada como em *E. coli*. Em limitação de Pi, ocorre a síntese de vários tipos de proteínas, algumas relacionadas com o metabolismo do nutriente e, outras, com a virulência da bactéria. Por exemplo: (i) a fosfatase alcalina (FILLOUX et al., 1988); (ii) a fosfolipase C, um fator de virulência que contribui na formação de lesões da pele características da espécie (CHIN; WATTS, 1988; GRAY et al., 1982; KURIOKA; LIU, 1967; LIU, 1966; STINSON; HAYDEN, 1979); (iii) a proteína P, uma porina com alta especificidade por ânions, (HANCOCK et al., 1982); (iv) as proteínas PhoB/PhoR (ANBA et al., 1990; FILLOUX et al., 1988); e (v) PhoU e as proteínas do transportador Pst.

O operon *pst* de *P. aeruginosa* encontra-se aparentemente dividido em duas partes: *pstS* e *pstCAB-phoU* (KATO et al., 1994; NIKATA et al., 1996; WU et al., 1999). Há um *Pho box* a montante do gene *pstS* (WU et al., 1999), e outro na região intergênica entre *pstS* e *pstC* (NIKATA et al., 1996) (Figura 5).

P. aeruginosa possui ao menos três proteínas envolvidas no metabolismo de poliP: PPK1, PPK2 e PPX. PPK1 é a proteína homóloga de PPK de *E. coli*, sendo a principal enzima envolvida na síntese do biopolímero em *P. aeruginosa* (ISHIGE et al., 1998; RASHID et al., 2000a). PPK1 sintetiza poliP na faixa de tamanho de 500-800 resíduos (ZHANG et al., 2002). PPK2 não está presente em *E. coli*, e difere de PPK1 principalmente em três aspectos: (i) além de ATP, pode utilizar GTP para a síntese de poliP (ISHIGE et al., 2002; ZHANG et al., 2002); (ii) sintetiza moléculas de 200-800 resíduos (ZHANG et al., 2002); (iii) *in vitro*, a taxa de síntese de GTP a partir de poliP é 75 vezes maior do que a taxa de síntese de poliP a partir de GTP. Desse modo, a função principal

Figura 5 – Organização dos genes do operon *pst* de *P. aeruginosa*. As duas *Pho box* e as duas sequências -10 a montante de *pstS* e também de *pstC* são apresentadas. A seta indica a direção de transcrição do operon.

de PPK2 parece ser a de sintetizar GTP a partir de poliP (ISHIGE et al., 2002; ZHANG et al., 2002). PPX de *P. aeruginosa*, a proteína homóloga de PPX de *E. coli*, é a principal enzima de degradação do poliP nessa bactéria (MIYAKE et al., 1999). No entanto, ela tem sido menos estudada do que as proteínas PPK1 e PPK2.

Ao contrário de *E. coli*, na qual os genes *ppk* e *ppx* formam um operon, em *P. aeruginosa* esses dois genes são adjacentes, porém, são transcritos em direções opostas (Figura 6) (ZAGO et al., 1999). A independência transcricional desses genes sugere que eles possam estar sendo regulados de forma antagônica, e poderia explicar por que *P. aeruginosa*, diferentemente de *E. coli*, acumula quantidades significativas de poliP, inclusive em condições normais de crescimento (KIM et al., 1998).

A regulação da expressão de *ppk* e *ppx* ainda é pouco entendida em *P. aeruginosa* e em outras bactérias. Recentemente, foi sugerido que a proteína PhoB atua na regulação de *ppx* em PAO1, uma vez que ensaios com uma fusão transcricional entre o promotor de *ppx* e o gene *lacZ* da β -galactosidase mostraram que *ppx* tem sua expressão aumentada em carência de Pi, de forma dependente de *phoB* (GALLARATO et al., 2014). Foi identificada também uma sequência Pho *box* putativa na região promotora de *ppx*. Até a presente data, a relação de *ppx* com o regulon Pho não foi constatada em nenhuma outra espécie bacteriana.

Figura 6 – Organização dos genes *ppk* e *ppx* no cromossomo de *P. aeruginosa*. As setas indicam a direção em que é transcrito cada gene.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

Considerando-se que *P. aeruginosa* acumula grandes quantidades de poliP, e que, tal como em *E. coli*, o nocaute de *phoU* exacerba ainda mais o acúmulo desse polímero, o objetivo deste trabalho foi investigar o metabolismo de poliP em *P. aeruginosa* PA14 e o papel de PhoU neste processo. Também visou-se analisar o operon *pst* desta bactéria em relação à sua expressão e regulação.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar a região promotora do gene *ppk*.
- Estudar as condições necessárias à expressão dos genes *ppk* e *ppx*.
- Medir os níveis de expressão dos genes *ppk* e *ppx* na cepa selvagem e no mutante *phoU*.
- Verificar se a proteína PhoB interage *in vitro* com a região promotora do gene *ppx*.
- Determinar o padrão de transcrição do operon *pst*.
- Avaliar uma possível atividade promotora a montante do gene *phoU*.
- Determinar a funcionalidade das duas sequências Pho *box* presentes no operon *pst*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Cepas e plasmídios

Cepas e plasmídios utilizados neste trabalho estão descritos na Tabela 1.

4.2 Meios de cultura

Culturas de *P. aeruginosa* foram cultivadas sob agitação a 37 °C em LB ou em meio DPMM (0,5 mM de MgSO₄, 10 µM de FeSO₄, 0,1 M de HEPES, 7 mM de (NH₄)₂SO₄, 20 mM de succinato de sódio, pH 7,4) (HANCOCK et al., 1981; HANCOCK et al., 1982). Uma solução de micronutrientes (1,78 mM de FeCl₃, 1,62 mM de MnCl₂, 2,45 mM de CaCl₂, 13,91 mM de ZnCl₂, 4,69 mM de H₃BO₃ e 0,67 mM de CoSO₄), esterilizada com clorofórmio, foi acrescentada a esse meio a uma concentração final de 0,1% (v/v). Quando acrescido com tampão fosfato (H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻) a uma concentração final de 1 mM, o meio é considerado suficiente em Pi (+Pi) e, quando acrescido de 0,2 mM dessa solução, é considerado deficiente em Pi (-Pi). O meio DPMM preparado com NaNO₃ (20 mM) como fonte de nitrogênio e suficiente em Pi (+Pi) foi usado como meio de crescimento de culturas em condições de limitação de nitrogênio (-N).

Culturas de *E. coli* foram cultivadas sob agitação a 37 °C ou a 30 °C em meio LB. Quando necessário, no meio de cultura foram acrescentados antibióticos nas seguintes concentrações: 150 µg/ml de tetraciclina, 500 µg/ml de carbenicilina ou 100 µg/ml de gentamicina para *P. aeruginosa*, e 200 µg/ml de ampicilina, 15 µg/ml de tetraciclina, 30 µg/ml de ácido nalidíxico ou 50 µg/ml de canamicina para *E. coli*.

4.3 Construção de fusões transcricionais com o gene *lacZ*

4.3.1 Amplificação das regiões promotoras

As diferentes regiões promotoras no genoma de PA14 foram obtidas na base de dados www.pseudomonas.com. O programa Primer-BLAST (YE et al., 2012) foi utilizado no desenho dos oligonucleotídeos. As sequências e características de cada oligonucleotídeo estão descritas na Tabela 2.

Cada região promotora foi amplificada por PCR utilizando-se o *kit GoTaq® Green Master Mix* 2X (Promega). Como DNA molde foi utilizada uma colônia fresca de PA14. Com o mix foi empregado um programa térmico (2 min a 94 °C e 25 ciclos de 30 s a 94 °C,

Tabela 1 – Cepas e plasmídios utilizados neste trabalho

Cepa ou plasmídio	Descrição	Referência ou fonte
<i>E. coli</i>		
DH10B	F ⁻ λ ⁻ <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> φ80 <i>dlacZΔM15 Δ(lacZYA⁻argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), mcrA mcrBCmrr galE</i>	(DURFEE et al., 2008)
MG1655	F ⁻ λ ⁻ <i>ilvG⁻ rfb-50 rph-1</i>	(BLATTNER et al., 1997)
S17-1	Ec294:: [RP4-2(Tc::Mu)(Km::Tn7)] T _p ^r , Sm ^r , tra ⁺ <i>recA, pro, res⁻</i>	(SIMON et al., 1983)
BL21 (DE3)	B F- <i>dcm ompT hsdS(r_B⁻ m_B⁻) gal λ(DE3)</i>	(STUDIER; MOFFATT, 1986)
<i>P. aeruginosa</i>		
UCBPP-PA14	Cepa selvagem	(RAHME et al., 1995)
CB-S7Z	PA14 <i>attB::lacZ</i>	Este trabalho
CB-SBK	PA14 <i>attB::(hemB-ppk)P-lacZ</i>	Este trabalho
CB-S7K	PA14 <i>attB::ppkP-lacZ</i>	Este trabalho
CB-S7X	PA14 <i>attB::ppxP-lacZ</i>	Este trabalho
CB-S7U	PA14 <i>attB::phoU P-lacZ</i>	Este trabalho
LG01	PA14 <i>phoU::pKNOCK-Gm</i>	(ALMEIDA, 2013)
CB-M7Z	PA14 <i>phoU::pKNOCK-Gm attB::lacZ</i>	Este trabalho
CB-MBK	PA14 <i>phoU::pKNOCK-Gm attB::(hemB-ppk)P-lacZ</i>	Este trabalho
CB-M7X	PA14 <i>phoU::pKNOCK-Gm attB::ppxP-lacZ</i>	Este trabalho
Plasmídios		
pGEM [®] -T <i>Easy</i>	Amp ^r ColE1; vetor de clonagem.	Promega
pTZ57R/T	Amp ^r ; vetor de clonagem.	Thermo Scientific
Mini-CTX- <i>lacZ</i>	Tet ^r oriT ⁺ ; vetor integrativo para a construção de fusões transcrpcionais com <i>lacZ</i> , no cromossomo de <i>P. aeruginosa</i>	(BECHER; SCHWEIZER, 2000)
pFLP2	Amp ^r /Car ^r ; plasmídio que contém o gene que codifica a recombinase Flp	(HOANG et al., 1998)
pGEM-K	Promotor de <i>ppk</i> de PA14 clonado no vetor pGEM [®] -T <i>Easy</i>	Este trabalho
pGEM-X	Promotor de <i>ppx</i> de PA14 clonado no vetor pGEM [®] -T <i>Easy</i>	Este trabalho
pTZ-BK	Região de PA14 de 2.075 pb que contém o gene <i>hemB</i> , seu promotor e a região promotora de <i>ppk</i> , clonada no vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pTZ-U	Região imediatamente a montante de <i>phoU</i> de PA14 clonada no vetor pTZ57R/T	Este trabalho
pPVSM-K	Promotor de <i>ppk</i> de PA14 clonado no vetor Mini-CTX- <i>lacZ</i>	Este trabalho
pPVSM-BK	Região de PA14 de 2.075 pb que contém o gene <i>hemB</i> , seu promotor e a região promotora de <i>ppk</i> , clonada no vetor Mini-CTX- <i>lacZ</i>	Este trabalho
pPVSM-X	Promotor de <i>ppx</i> de PA14 clonado no vetor Mini-CTX- <i>lacZ</i>	Este trabalho
pPVSM-U	Região imediatamente a montante de <i>phoU</i> de PA14 clonada no vetor Mini-CTX- <i>lacZ</i>	Este trabalho
pGEM-B	<i>phoB</i> de PA14 clonado no vetor pGEM [®] -T <i>Easy</i>	Este trabalho
pET-28a(+)	Kan ^r ; vetor de expressão que possui o promotor T7lac	Novagen
pET- <i>phoB-his</i> _(6x)	<i>phoB</i> de PA14 clonado no vetor pET-28a(+)	Este trabalho

30 s com uma temperatura de anelamento variável (ver Tabela 2) e uma extensão a 74 °C com tempos diferentes, de acordo com o tamanho do amplicon) em um termociclador Mastercycler® personal (Eppendorf).

Após serem observados em um mini gel de agarose 1%, os produtos de PCR foram purificados com o *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) conforme as recomendações do fabricante, e quantificados no espectrofotômetro Epoch™ (BioTek).

4.3.2 Clonagem dos promotores nos vetores pTZ57R/T e pGEM®-T *Easy*

Os fragmentos amplificados por PCR, *(hemB-ppk)P* e *phoU P*, foram clonados no vetor pTZ57R/T utilizando-se o *kit InsTAclone PCR Cloning* (Thermo Scientific). O mix de ligação foi preparado em um volume final de 30 µl, contendo: 1 µl de pTZ57R/T (55 ng), 3 µl de tampão 10X, 22 µl de dH₂O, 1 µl de T4 DNA ligase e 3 µl do respectivo produto de PCR (≈170 ng). Os fragmentos *ppkP* e *ppxP* foram clonados no vetor pGEM®-T *Easy*. O mix dessa ligação foi feito em um volume total de 10 µl, contendo: 1 µl de vetor (50 ng),

Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho

Alvo/finalidade	Oligonucleotídeo	Sequência	Temperatura hibridização (°C)	Tamanho amplicon (pb)
<i>ppkP</i> /fusão transcricional	PA14- <i>ppk(p)</i> -F	(KpnI) 5'-ATCC GGTACCGCCTT CAAAC-3'	51	368
	PA14- <i>ppk(p)</i> -R	(BamHI) 5'-ATGAGGAGG ATCCT CAGCCG-3'		
<i>(hemB-ppk)P</i> /fusão transcricional	PA14- <i>hemB(pg)</i> - <i>ppk(p)</i> -F	5'-TGTCTTGAACGCGCCGATA-3'	50	2.075
	PA14- <i>hemB(pg)</i> - <i>ppk(p)</i> -R	5'-GAGGAACCTTCAGCCGCTCCA-3'		
<i>ppxP</i> /fusão transcricional	PA14- <i>trxA(g)</i> - <i>ppx(p)</i> -F	(KpnI) 5'-ACGTCGG GTACCG GAATTTA-3'	50	801
	PA14- <i>trxA(g)</i> - <i>ppx(p)</i> -R	(BamHI) 5'-CTGAGATTG GGATCCT CGTC-3'		
<i>phoU P</i> /fusão transcricional	PA-pstB4445F	5'-GATGAACATTCCGAAGCAG-3'	49	1.334
	PA-phoU5778R	5'-GGGTCTTCCATCATGTAGGT-3'		
Região interna <i>hemB</i> /RT-PCR	PA14- <i>hemB(g)</i> -F	5'-TCCTCAACGACGTCAGCATC-3'	55	391
	PA14- <i>hemB(g)</i> -R	5'-GCGCGGAATTCATCCTTAC-3'		
Região interna <i>ppk</i> /RT-PCR	PA14- <i>ppk(g)</i> -F	5'-AGAAGCAGATCACCTTCGCC-3'	55	299
	PA14- <i>ppk(g)</i> -R	5'-GAGGCTCTTGTTACACAGCA-3'		
Final de <i>hemB</i> e início de <i>ppk</i> /RT-PCR	PA14- <i>hemB(g)</i> -F	descrita acima	55	1.198
	PA14- <i>ppk(g)</i> -R	descrita acima		
Região interna <i>pstS</i> /northern blot	pstS384F	5'-GAGTACAAGCGCCTCTATCC-3'	50	519
	pstS902R	5'-CTTGTAGCCGATACCGGAG-3'		
Região interna <i>pstC</i> /northern blot	pstC1053F	5'-GTGAAAGCCATCTACCTCGAC-3'	57	760
	pstC1812R	5'-CCTCCATCAGCTCGATCAC-3'		
Região interna <i>phoU</i> /northern blot	phoU5398F	5'-CGACGACCAGATCAACCAG-3'	50	381
	phoU5778R	5'-GGGTCTTCCATCATGTAGGT-3'		
<i>pstS P</i> /gel shift	PA14- <i>pstS</i> (EMSA)-F	5'-GGCTTGCGGAAAAATGTCGG-3'	45	124
	PA14- <i>pstS</i> (EMSA)-R	5'-TCCTTGGACAGGATGGGGTT-3'		
<i>pstC P</i> /gel shift	PA14- <i>pstC</i> (EMSA)-F	5'-GTCCAGGCATGAAGGCTCT-3'	48	176
	PA14- <i>pstC</i> (EMSA)-R	5'-GCAAGGGAGGAGTTTCATCGG-3'		
<i>ppx P</i> /gel shift	PA14- <i>ppx</i> (EMSA)-F	5'-GTCTCTATCGTTGGTCGGC-3'	45	119
	PA14- <i>ppx</i> (EMSA)-R	5'-AGGTTTTTGCGGCATGCTT-3'		
<i>phoB</i> /gel shift	phoB(g)-F	(NdeI) 5'-CGAGTTAC CAATATG TTGGCAAGACAATCCTCATC-3'	50 e 58	710
	phoB(g)-R	(HindIII) 5'-CGT AAGCTT TCAGCTCTTGTTGGAGAAACGAT-3'		

As sequências sublinhadas mostram o sítio de restrição da enzima anotada. Letras de menor tamanho indicam a presença de *mismatches*, introduzidos para formar o sítio de restrição desejado. Em negrito aparecem indicados os códons de iniciação e parada de *phoB*.

5 µl de *Rapid Ligation buffer* 2X, 1 µl de T4 DNA ligase e 3 µl do respectivo produto de PCR (≈ 170 ng).

Cada reação de ligação foi incubada *overnight* a 4 °C. No dia seguinte, 2 µl do produto de cada ligação foram utilizados para eletroporar 50 µl de *E. coli* DH10B eletrocompetente. As células foram plaqueadas e incubadas *overnight* a 37 °C em placas de L-água suplementadas com ampicilina, 80 µg/ml de X-gal (Thermo Scientific) e 0.5 mM de IPTG (Bio Basic Inc) para a seleção de colônias por α -complementação.

Colônias brancas foram isoladas e cultivadas *overnight* em meio LB. Os plasmídios foram extraídos pelo método de lise alcalina (SAMBROOK; RUSSELL, 2001), digeridos com enzimas de restrição e analisados em gel de agarose.

Os plasmídios derivados de pGEM[®]-T *Easy* foram digeridos com EcoRI, enquanto que os derivados de pTZ57R/T foram digeridos com KpnI e BamHI. Para determinar a orientação de clonagem dos fragmentos *(hemB-ppk)P* e *phoU P*, clonados em pTZ57R/T, foi aproveitada a presença de um sítio de restrição XhoI interno próximo da extremidade 3' da sequência de *phoU P* e um sítio BamHI interno próximo da extremidade 3' do fragmento *(hemB-ppk)P*.

4.3.3 Subclonagem dos promotores no vetor Mini-CTX-*lacZ*

Os plasmídios recombinantes pTZ-U (promotor de *phoU*), pGEM-K (promotor de *ppk*), pGEM-X (promotor de *ppx*) e o vetor Mini-CTX-*lacZ* foram digeridos com KpnI (Thermo Scientific) e BamHI (Thermo Scientific). Já o plasmídio pTZ-BK (promotor de *hemB*) e o vetor Mini-CTX-*lacZ* foram digeridos com KpnI (Thermo Scientific) e HindIII (Thermo Scientific). Após a digestão, os fragmentos de DNA relevantes foram separados em gel de agarose e purificados utilizando-se o *kit Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

Os fragmentos de DNA foram ligados ao vetor Mini-CTX-*lacZ* utilizando-se a a proporção 1:3 (vetor:inserto). As reações foram incubadas a 16 °C *overnight*. A enzima foi então inativada a 70 °C por 5 min e 1 µl de cada ligação foi eletroporado na cepa DH10B. Colônias azuis foram repicadas e cultivadas em meio LB suplementado com tetraciclina para a extração dos plasmídios. A presença dos insertos foi determinada através de uma análise de restrição com as enzimas respectivas empregadas nas reações de digestão prévias ao processo de clonagem. Os plasmídios resultantes foram denominados: pPVSM-K, pPVSM-BK, pPVSM-X e pPVSM-U.

4.4 Sequenciamento

Todos os plasmídios foram sequenciados utilizando-se o *kit BigDye terminator* version 3.1 (Applied Biosystems) e separados na plataforma ABI PRISM® 3100 *Genetic Analyzer* (HITACHI) para sequenciamento por eletroforese capilar.

4.5 Integração cromossomal das fusões transcricionais construídas com o vetor Mini-CTX-*lacZ*, no cromossomo de PA14 e do mutante *phoU*

Para inserir as fusões em *P. aeruginosa*, primeiro, a cepa S17-1, que carrega no cromossomo os genes do sistema RP4 de conjugação, foi eletrotransformada com as fusões Mini-CTX-*lacZ*. Em seguida, os transformantes contendo as fusões foram utilizados como doadores em um processo de conjugação para a cepa PA14.

O Mini-CTX-*lacZ* é inserido no sítio *attB* do cromossomo da bactéria por recombinação sítio específica. Essa recombinação é mediada pela proteína integrase codificada pelo próprio vetor (Figura 7). Uma vez inserida a fusão no cromossomo da bactéria, esta é transformada com o vetor pFLP2, que codifica a recombinase Flp. Essa proteína catalisa a excisão da maioria dos genes do vetor, permanecendo no cromossomo de *P. aeruginosa* apenas uma cópia da fusão promotor-*lacZ* junto com a “cicatriz” da recombinação.

4.6 Eletrotransformação de *E. coli* e *P. aeruginosa*

Para a eletrotransformação de *E. coli*, bactérias cultivadas *overnight* a 37 °C em 2 ml de meio LB foram centrifugadas à velocidade máxima por 1 minuto. Cada *pellet* foi ressuspensionado em 2 ml de água destilada gelada estéril e recentrifugado. A mesma lavagem foi repetida mais duas vezes utilizando-se 1 ml de água e 500 µl de uma solução gelada de glicerol 10% estéril. Finalmente, cada *pellet* foi ressuspensionado em um volume de 50 µl da solução de glicerol 10% gelada. Após aplicar um pulso (25 µF, 200 Ω e 2,5 kV, no eletroporador MicroPulser™ (Bio-Rad)) foram acrescentados 950 µl de meio LB. A seguir, as bactérias foram transferidas para um tubo de ensaio estéril. Após serem incubadas a 37 °C por 90 min com LB, as bactérias foram plaqueadas e incubadas a 37 °C *overnight* em L-ágar suplementado com o antibiótico apropriado.

Na eletroporação de PA14, empregou-se a metodologia descrita em (CHOI et al., 2006). Brevemente, bactérias cultivadas em 6 ml de LB a 37 °C *overnight* foram centrifugadas a 8.000 rpm por 5 min. Cada *pellet* foi ressuspensionado em 10 ml de uma solução

Figura 7 – Mecanismo gênico da integração e excisão do *backbone* do plasmídeo não replicativo promotor-Mini-CTX-*lacZ* em PA14 e o mutante *phoU*. O sítio *attP*, presente no plasmídeo contendo o promotor clonado, integra-se no cromossomo de PA14 pelo sítio *attB* por meio da atividade da integrase codificada pelo próprio vetor. Bactérias transformadas são então selecionadas em meio seletivo contendo tetraciclina. Finalmente, a proteína Flp, codificada pelo vetor pFLP2, excisa genes e promotores do plasmídeo integrado que, potencialmente, possam interferir na expressão da fusão transcricional. Adaptado de (BECHER; SCHWEIZER, 2000).

estéril de sacarose 300 mM a temperatura ambiente. As culturas foram então centrifugadas por 5 min à velocidade máxima e cada *pellet* foi ressuspensionado novamente em 10 ml da solução de sacarose. A lavagem anterior foi repetida duas vezes. Por fim, os *pellets* foram ressuspensionados em 100 µl da solução de sacarose. Após aplicado o pulso (1,8 kV) em 80 µl de cultura eletrocompetente, foram acrescentados 920 µl de LB. As bactérias eletroporadas foram incubadas a 37 °C por 2 horas e plaqueadas em L-ágar suplementado com antibiótico.

4.7 Conjugação

A mobilização das fusões transcricionais em PA14 e no mutante *phoU* foi feita via conjugação utilizando-se a cepa de *E. coli* S17-1 como doadora. PA14 e S17-1, portadora de cada fusão, foram cultivadas em meio LB a 37 °C *overnight*. A seguir, foram feitas subculturas em LB. Cada subcultura foi cultivada até uma DO₆₀₀ de aproximadamente 0,4. Nesse momento, 0,5 ml de cada S17-1 foram misturados com 0,5 ml de PA14. Os pares conjugantes foram incubados a 37 °C por um período de 4 a 5 horas sob agitação de 150 rpm. No final, eles foram plaqueados em L-ágar suplementado com ácido nalidíxico e tetraciclina, e incubados a 37 °C por aproximadamente 48 horas. Colônias exconjugantes foram repicadas em placas da mesma composição.

4.8 Excisão dos genes do *backbone* do Mini-CTX-*lacZ* do cromossomo de PA14 e do mutante *phoU*

Os exconjugantes foram eletrotransformados com o vetor pFLP2. Os transformantes foram selecionados em placas de L-ágar suplementado com carbenicilina. Bactérias Tet^s Car^r foram então curadas do plasmídio pFLP2 repicando as bactérias em placas de L-ágar/sacarose 5%. o pFLP2 carrega o gene *sacB* de *Bacillus subtilis* que codifica a enzima levansacarose que, na presença de sacarose, gera o acúmulo tóxico de levana, um biopolímero de frutose, no periplasma de bactérias Gram-negativas, inibindo seu crescimento (GAY et al., 1985). Portanto, só bactérias que perderam o plasmídio, ou cujo gene *sacB* foi inativado, conseguirão crescer em meio ágar com sacarose (Figura 8).

As cepas resultantes, descritas na Tabela 1, foram avaliadas para confirmar o excisão do *backbone* do vetor Mini-CTX-*lacZ*, a perda do vetor pFLP2 e atividade basal da β -galactosidase, por repique em placas de L-ágar suplementado com tetraciclina, carbenicilina ou X-gal. Com as cepas do mutante *phoU*, além dos testes descritos acima, foi feito um plaqueamento adicional para confirmar sua Pho constitutividade em L-ágar suplementado com 40 μ g/ml de XP (Thermo Scientific).

Figura 8 – Metodologia aplicada na construção de cepas de PA14 carregando fusões transcricionais de cópia única no cromossomo. Bactérias de S17-1 carregando o plasmídeo promotor-Mini-CTX-*lacZ* foram conjugadas com PA14. Exconjugantes de PA14 foram selecionados em placas de meio seletivo contendo tetraciclina e ácido nalidíxico. A seguir, as bactérias Tet^r foram eletroporadas com o vetor pFLP2, e os transformantes foram selecionados em placa contendo carbenicilina. Finalmente, bactérias Tet^s Car^r foram contra-selecionadas em meio L-ágar suplementado com sacarose 5%. Algumas colônias da placa com sacarose 5% foram repicadas em placas com antibiótico, X-gal e XP para confirmar a excisão do *backbone* do vetor, a cura do plasmídeo pFLP2 e a atividade basal da β -galactosidase, e, no caso do mutante *phoU*, a atividade da FA.

4.9 Avaliação da faixa de linearidade do espectrofotômetro de microplacas Epoch™

Foram preparadas diluições seriadas de o-nitrofenol (ONP) nas faixas de absorbâncias de 0 a 3. O mesmo foi feito para uma cultura de PA14 cultivada em meio LB *overnight* a 37 °C. A seguir, foram transferidos em duplicata 200 μ l de cada amostra a uma microplaca de 96 poços e foi determinada a DO₄₂₀ das diluições de ONP e a DO₆₀₀ das diluições das culturas. As leituras de absorbância foram feitas e reportadas utilizando-se a opção de correção automática do caminho óptico do espectrofotômetro de placas.

4.10 Ensaios de β -galactosidase em microplaca de 96 poços

Os ensaios de β -galactosidase em placa de 96 poços foram baseados nas metodologias descritas em (GRIFFITH; WOLF JR., 2002; ZHANG; BREMER, 1995). Brevemente, colônias de cada cepa a ser avaliada foram inoculadas em poços contendo meio DPMM (+Pi, -Pi ou -N) de uma microplaca estéril de 24 poços. Alguns poços com meio não inoculado foram usados como controle negativo. A microplaca com os inóculos foi tampada e selada com fita. As culturas foram cultivadas a 37 °C a 160 rpm por pelo menos 17 horas. A DO_{600} de cada cultura foi determinada. Em seguida, as culturas foram diluídas a uma DO_{600} de aproximadamente 0,050 no meio de cultura respectivo em uma nova microplaca estéril de 24 poços. As subculturas foram cultivadas a 37 °C a 150 rpm por tempos variáveis, entre 8 e 24 horas.

Alíquotas de cada cultura foram coletadas em diferentes momentos do crescimento para ensaios de β -galactosidase. Primeiro, foi determinada a DO_{600} e, em seguida, alíquotas de 20 μ l de cada cultura foram transferidas para uma microplaca de 96 poços contendo 80 μ l/poço da solução de permeabilização recém preparada (100 mM de Na_2HPO_4 , 20 mM de KCl, 2 mM de $MgSO_4$, 0,6 mg/ml de CTAB, 0,4 mg/ml de deoxicolato de sódio, 2,7 mM de TCEP e carbenicilina). A microplaca contendo as células permeabilizadas foi tampada e mantida a 4 °C até sua utilização.

Após serem permeabilizadas todas as amostras, foram transferidos 25 μ l de cada cultura permeabilizada a uma nova microplaca de 96 poços. O ensaio foi iniciado pela adição de 175 μ l de uma solução de substrato recém preparada (60 mM de Na_2HPO_4 , 40 mM de NaH_2PO_4 , 4 mg/ml de ONPG e 1,35 mM de TCEP) às células permeabilizadas. A microplaca foi protegida da luz e centrifugada por 5 min a 1.400 rpm para eliminar possíveis interferências nas leituras espectrofotométricas devido à formação de bolhas em cada poço como consequência da pipetagem. A placa foi introduzida no leitor de microplacas, foi determinada a DO_{550} e a reação foi monitorada a uma DO_{420} a cada 15 min por 14 horas a temperatura ambiente. Cada experimento foi realizado em triplicata técnica e em pelo menos triplicata biológica. As unidades de β -galactosidase foram calculadas empregando-se a equação 4.1 como descrito em (MILLER, 1992).

$$\text{Unidades de } \beta\text{-galactosidase} = \frac{1000 \times DO_{420} - (1,75 \times DO_{550})}{t \times v \times DO_{600}} \quad (4.1)$$

Onde:

DO_{420} = absorbância da amostra, a 420 nm.

DO_{550} = absorbância a 550 nm. Quando multiplicada por 1,75 permite determinar a contribuição dos restos bacterianos à absorbância a 420 nm.

t = tempo de reação, em min.

v = volume de células utilizadas no ensaio, em ml.

DO_{600} = concentração celular a 600 nm.

4.11 Ensaio de fosfatase alcalina

Os ensaios foram efetuados como descrito em (SPIRA et al., 1995). Utilizou-se pNPP (Amresco) como substrato da enzima, a uma concentração de 1 mg/ml em tampão tris·HCl 1 M (pH 8,0). Na parte final de cada ensaio, as amostras foram centrifugadas por 5 min a 10.000 rpm antes da leitura espectrofotométrica a 410 nm. A atividade da enzima foi calculada com base na equação 4.2.

$$\text{Unidades de fosfatase alcalina} = \frac{A_{410} \times fd}{t \times DO_{600}} \quad (4.2)$$

Onde:

A_{410} = absorbância da amostra, a 410 nm.

t = tempo de reação, em min.

fd = fator de diluição das células testadas.

DO_{600} = concentração celular a 600 nm.

4.12 Extração de RNA total

Culturas de PA14 cultivadas *overnight* a 37 °C foram centrifugadas por 15 min a 5.500 rpm a temperatura ambiente. Cada *pellet* bacteriano foi ressuscitado em 1 ml de Trizol® e aquecido a 65 °C por 10 min. Posteriormente, foram acrescentados 200 µl de clorofórmio a cada amostra e elas foram misturadas manualmente de forma vigorosa. Cada amostra foi incubada a temperatura ambiente por 5 min e depois foi centrifugada a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C. Em seguida, 580 µl do sobrenadante foi tratado com 1 volume de isopropanol. Cada amostra foi incubada a -80 °C por 30 min e, em seguida, centrifugada a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C. O *pellet* foi lavado com 1 ml de etanol 75% e recentrifugado por 5 min a 12.000 rpm a 4 °C. O RNA foi seco por 10 min a

temperatura ambiente e ressuspendido em 50 µl de dH₂O. A qualidade de cada extração foi avaliada em gel de agarose 1,2%/formaldeído (2,2 M), e o RNA foi quantificado espectrofotometricamente.

4.13 Detecção do transcrito *hemB*-*ppk* por RT-PCR

Na identificação de um longo transcrito que inclui os genes *hemB* e *ppk* foram usados os oligonucleotídeos descritos na Tabela 2. Foi extraído o RNA total a partir de uma cultura de PA14 cultivada em meio mínimo de fosfato (-Pi) até uma DO₆₀₀ de aproximadamente 0,5. Para remover qualquer contaminação de DNA, foi realizado um tratamento com DNase (*DNA-free*TM Kit, Ambion) a 8,5 µg de RNA. O tratamento enzimático foi repetido até não ser observada nenhuma banda de amplificação em uma PCR convencional. O RNA foi quantificado espectrofotometricamente.

Cada mix da reação de transcrição reversa foi preparado em um volume de 20 µl, contendo: 4 µl de ImProm-II 5X *Reaction Buffer* (Promega), 1,5 mM de MgCl₂ (Promega), 0,5 mM de cada dNTP (Eppendorf), 20 unidades de *Recombinant RNasin*[®] *Ribonuclease Inhibitor* (Promega), 7,8 µl de água do kit, 1 µl ImProm-IITM *Reverse Transcriptase* (Promega), 0,46 µg de RNA (livre de DNA) e 15 pmol do respectivo oligonucleotídeo reverso, (PA14-*hemB*(g)-R ou PA14-*ppk*(g)-R). Foram utilizados dois controles negativos por cada conjunto de oligonucleotídeos: um continha o mesmo mix de acima, exceto a enzima transcriptase reversa e, o outro, o mix sem RNA molde. O cDNA foi sintetizado por incubação de 1 hora a 42 °C. Posteriormente, a enzima foi inativada a 70 °C por 15 min. A seguir, o cDNA sintetizado foi amplificado através de uma PCR convencional junto com os produtos dos controles empregando-se o seguinte programa térmico: 2 min a 94 °C e 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 55 °C e 90 s a 74 °C, com uma extensão final de 10 min a 74 °C. Cada produto de PCR foi visualizado em um gel de agarose 1%.

4.14 Determinação do padrão de transcrição do operon *pst* de *Pseudomonas aeruginosa* por *northern blot*

Culturas de PA14 foram cultivadas em meio mínimo de fosfato (+Pi) e (-Pi) até uma DO₆₀₀ de aproximadamente 0,6. Em seguida, foi realizado um ensaio de atividade da fosfatase alcalina para confirmar que as culturas cultivadas em meio limitado de Pi já houvessem atingido a fase de carência. Posteriormente, foi realizada a extração de RNA das culturas.

4.14.1 Eletroforese em gel de agarose/formaldeído

Em um gel de agarose 1,4% com formaldeído 2,2 M foram carregados 20 µg de RNA por poço, com tampão de carga (2X *RNA Loading Dye*, Thermo Scientific). Foram utilizados dois marcadores de peso molecular de RNA: 0,2-6,0 kb (Thermo Scientific) e 0,16-1,77 kb (Invitrogen). A corrida eletroforética foi feita a 120 V por 2,5 horas. Finalmente, o gel foi fotodocumentado em transiluminador.

4.14.2 Transferência do RNA para a membrana

O gel foi lavado três vezes com dH₂O em intervalos de 10 min e incubado em tampão SSC 10X (1,5 M de NaCl e 0,15 M de citrato de sódio dihidratado) por 45 min. Uma membrana de náilon neutra (*GeneScreen Hybridization Transfer Membrane*, NEN DuPont) foi lavada brevemente em dH₂O e em tampão SSC 10X por 15 min. Em seguida, o RNA foi transferido por capilaridade para a membrana por 12 horas com o esquema de transferência descrito em (STREIT et al., 2009). Após a transferência, o RNA foi fixado à membrana pela exposição a radiação UV de comprimento de onda de 254 nm por 10 min. Por fim, a membrana foi seca por 30 min a 80 °C no *Gel Dryer Model 583* (Bio-Rad).

4.14.3 Preparação das sondas

Foram utilizadas sondas biotinizadas correspondentes a regiões internas dos genes *pstS*, *pstC* e *phoU*. Na amplificação das sondas de DNA, o programa térmico empregado foi: 2 min a 94 °C e 35 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s à temperatura indicada na Tabela 2, de acordo com o conjunto de oligonucleotídeos usados, e 1 min a 74 °C com uma extensão final de 10 min a 74 °C. Cada produto de PCR foi purificado e quantificado no espectrofotômetro.

Na marcação do DNA foi utilizado o *kit Biotin DecaLabel DNA Labeling* (Thermo Scientific). Foi marcado 1 µg de cada produto de PCR purificado, segundo recomendações do fabricante.

4.14.4 Prehibridização, hibridização e detecção

Cada membrana contendo o RNA total foi colocada na solução de prehibridização (0,5 M de tampão de Na₂HPO₄/H₃PO₄, 1 mM de EDTA e 7% de SDS, pH 7,2) a 70 °C por 2,5 horas. Em seguida, foram adicionadas as sondas desnaturadas. A hibridização foi realizada a 55 °C por 16 horas. As membranas foram então lavadas: uma vez com a solução A (SDS 1% e SSC 1X) a temperatura ambiente e três vezes com a solução B (SDS

0,1% e SSC 0,5X) a 68 °C. Cada membrana foi seca brevemente em papel Whatman e as sondas foram detectadas utilizando-se o *kit Biotin Chromogenic Detection* (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante.

4.15 Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA)

4.15.1 Amplificação de *phoB* e clonagem em pGEM®-T *Easy*

Foi amplificada a ORF de PhoB através de uma PCR empregando-se os oligonucleotídeos descritos na tabela 2 e as condições térmicas a seguir: 2 min a 94 °C e 5 ciclos iniciais de 30 s a 94 °C, 30 s a 50 °C e 1 min a 74 °C; e mais 20 ciclos empregando-se as mesmas condições descritas anteriormente, porém com uma temperatura de anelamento de 58 °C. Como DNA molde empregou-se uma colônia fresca de PA14.

O fragmento amplificado foi purificado e clonado no vetor pGEM®-T *Easy* (Promega) adotando as mesmas metodologias descritas em 4.3.2. O plasmídeo recombinante resultante, carregando o gene *phoB*, foi denominado pGEM-B.

4.15.2 Subclonagem no vetor pET-28a(+)

Foram digeridos os plasmídios pGEM-B e pET-28a(+) com as enzimas HindIII (Thermo Scientific) e NdeI (Thermo Scientific). Cada produto de digestão foi purificado excisando-se a banda correspondente em um gel de agarose 1% e quantificado espectrofotometricamente.

Na ligação entre o fragmento liberado, contendo a ORF de PhoB, com o vetor digerido pET-28a(+) empregou-se a proporção 1:8 (vetor:inserto). A reação foi incubada a 16 °C *overnight*. Ato contínuo, a enzima foi inativada a 70 °C por 5 min e 1 µl do produto da ligação foi eletroporado em DH10B. As bactérias foram plaqueadas e incubadas *overnight* a 37 °C em L-ágar suplementado com canamicina. Colônias crescidas após esse tempo foram repicadas em novas placas da mesma composição.

Clones positivos foram confirmados através de uma PCR de colônia empregando-se oligonucleotídeos que flanqueavam a região de clonagem. A construção resultante, o plasmídeo pET-*phoB-his*_(6x), foi sequenciado e eletroporado na cepa BL21 (DE3) de *E. coli*.

4.15.3 Testes de expressão e solubilidade da proteína recombinante PhoB-His

4.15.3.1 Mini ensaio de indução

A partir de uma cultura de transformantes de BL21 (DE3) crescida *overnight* foram feitas subculturas por diluição em LB suplementado com canamicina, a uma DO_{600} de aproximadamente 0,050. Uma cultura foi cultivada a 37 °C e outra a 30 °C até ambas atingirem uma DO_{600} de aproximadamente 0,9. Neste ponto, foi retirado 1 ml de cada cultura, para servir de controle negativo (culturas não induzidas), e o restante da cultura foi tratado com IPTG a uma concentração final de 1 mM. As culturas foram cultivadas por mais 4 horas. Posteriormente, 1 ml de cada cultura foi coletado e centrifugado a 8.000 rpm por 5 min e o restante foi usado em ensaios de solubilidade, descritos na seção seguinte. Cada *pellet* foi ressuspensionado em 50 μ l de tampão de aplicação 1X (50 mM de tris·HCl (pH 6,8), 100 mM de DTT, 2% de SDS, 0,1% de azul de bromofenol e 10% de glicerol (v/v)) e aquecido em banho de água fervente por 3 min. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 5 min. 10 μ l de cada sobrenadante foram aplicados no gel junto com o marcador de peso molecular *SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard: 4-250* kDa (tris-glicina, Life Technologies).

Na separação eletroforética (SDS-PAGE) foi utilizada acrilamida 15%. A corrida eletroforética foi efetuada a 200 V por 2,75 horas. O gel foi corado por 4 horas com uma solução de azul de *Coomassie* R-250 (0,25% de azul de *Coomassie* R-250, 50% de metanol (v/v) e 10% de ácido acético glacial (v/v)) sob agitação branda a temperatura ambiente e descorado por 4 horas com uma solução de 50% de metanol (v/v) e 10% de ácido acético (v/v).

4.15.3.2 Testes de solubilidade

Para testar a solubilidade da proteína recombinante, 3 ml das culturas induzidas com IPTG foram centrifugados a 8.000 rpm por 5 min e o *pellet* foi ressuspensionado em 700 μ l de tampão de lise gelado (50 mM de tris·HCl (pH 8,0), 200 mM de NaCl, 25% de sacarose, 1 mM de $MgCl_2$ e 5% de glicerol (v/v)). As amostras foram incubadas no gelo por 10 min. A seguir, a suspensão celular foi sonicada empregando-se o sonicador de células *Sonics Vibra-Cell™* modelo CV 334, em banho de gelo por pulsos de 10 s com 20 s de intervalo entre cada pulso por 10 min e uma amplitude de 40%. As amostras foram centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min a 4 °C. Por fim, o sobrenadante foi guardado a -20 °C (fração de proteína solúvel) e o *pellet* foi ressuspensionado em 700 μ l de tampão de

lise gelado (fração de proteína insolúvel). Foram separados 15 µl de cada fração em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE 15%) misturados com 6 µl do *Lane Marker Reducing Sample Buffer* (5X) (Thermo Scientific) junto com o marcador de peso molecular *Precision Plus Protein™ Dual Color Standards* (Bio-Rad).

4.15.4 Purificação de PhoB-His recombinante por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados (IMAC)

O transformante BL21(DE3), contendo o plasmídio pET-*phoB-his*_(6x), foi cultivado a 37 °C sob agitação de 150 rpm *overnight* em LB suplementado com canamicina. Essa cultura foi, então, diluída em um volume de 1,5 l de LB suplementado com canamicina a uma DO₆₀₀ inicial de aproximadamente 0,025 e cultivada a 30 °C sob agitação de 160 rpm até uma DO₆₀₀ de 0,6-0,7. Nesse ponto, foi acrescentado IPTG a uma concentração final de 0,5 mM e o crescimento foi mantido a 30 °C por um período de mais 4 horas. Em seguida, a cultura foi centrifugada a 5.000 rpm por 10 min. O *pellet* foi ressuspendido em 30 ml de tampão de lise gelado contendo, adicionalmente, 1 mg/ml de lisozima e 10 mM de imidazol. A suspensão bacteriana foi incubada a 30 °C por 1 hora com agitação branda e depois foi mantida no gelo por pelo menos 15 min. A suspensão bacteriana foi sonicada em banho de gelo com pulsos de 20 s e 50 s de intervalo entre cada pulso a uma amplitude de 30% por 30 min. A suspensão com as células lisadas foi clarificada por centrifugação a 12.000 rpm por 15 min a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi inserido na coluna *HiTrap Chelating HP* (GE) de 5 ml de *Chelating Sepharose™ High Performance* carregada com NiSO₄ (300 mM) e equilibrada com tampão de ligação (50 mM de tris·HCl (pH 8,0), 200 mM de NaCl e 10 mM de imidazol), processo automatizado pelo emprego do equipamento *ÄKTA start* (GE). Após várias lavagens da coluna com tampão de ligação, a proteína recombinante PhoB-His foi eluída com tampão de eluição (50 mM de tris·HCl (pH 8,0), 200 mM de NaCl e 500 mM de imidazol).

No processo de purificação, foram coletadas 10 frações de 5 ml cada, cuja pureza foi avaliada por SDS-PAGE, como descrito em 4.15.3. As frações contendo a maior quantidade de proteína recombinante foram reunidas e dialisadas contra o tampão de armazenamento (50 mM de tris·HCl (pH 7,0), 200 mM de NaCl, 0,1 mM de EDTA e 0,1 mM de DTT). Na diálise foi empregada a membrana *SnakeSkin Dialysis Tubing* (Thermo Scientific) de 3,5K MWCO. PhoB-His dialisada foi filtrada em filtro de 0,22 µm, sua con-

centração foi determinada utilizando-se o espectrofotômetro EpochTM, e foi estocada a 4 °C.

4.15.5 Fosforilação de PhoB-His

A reação de fosforilação de PhoB-His foi baseada nas metodologias descritas em (MCCLEARY; STOCK, 1994; MCCLEARY, 1996). Brevemente, foi preparado o seguinte mix de reação em um volume de 1 ml: 50 mM de tris·HCl (pH 7,0), 20 mM de MgCl₂, 0,1 mM de DTT, 30 mM de acetilfosfato (estoque preparado em 50 mM de tris·HCl (pH 7,0), 30 µM de PhoB-His e 3,4 µl de dH₂O. O mix foi incubado a 37 °C por 2 horas. A proteína fosforilada foi mantida a 4 °C.

4.15.6 Marcação das extremidades dos fragmentos de DNA com [γ -³²P]-ATP

Fragmentos de DNA correspondentes aos promotores dos genes *pstS*, *pstC* e *ppx* foram amplificadas por PCR. Empregaram-se os oligonucleotídeos descritos na Tabela 2, com o seguinte programa térmico: 2 min a 94 °C e 25 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s à temperatura reportada na Tabela 2, de acordo com o conjunto de oligonucleotídeos usados, e 30 s a 74 °C. Como DNA molde utilizou-se DNA cromossômico de PA14, extraído empregando-se o *kit Wizard® Genomic DNA Purification* (Promega) a partir de uma cultura cultivada em meio LB a 37 °C *overnight*. Cada produto de PCR foi separado em gel de agarose 1%, seguido pela excisão de banda e purificação do DNA com o *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega).

A marcação radioativa de cada sonda foi feita em um volume de 50 µl, contendo: 10 pmol de DNA, 5 µl de tampão 10X de T4 PNK (*forward reaction*, Thermo Scientific), 10 unidades de T4 PNK (Thermo Scientific), 6 µl de [γ -³²P]-ATP 3,33 µM (PerkinElmer) e dH₂O até completar o volume de reação. Cada mix de marcação foi incubado a 37 °C por 90 min e a reação foi terminada utilizando-se 2 µl de EDTA 0.5 M (pH 8,0). A enzima foi inativada a 75 °C por 10 min. Cada sonda radiomarcada foi purificada mediante precipitação com etanol e ressuspendida em 50 µl de dH₂O. A incorporação radioativa de cada sonda foi determinada no cintilador líquido Tri-Carb B2910TR *Liquid Scintillation Analyzer* (PerkinElmer). As sondas radiomarcadas foram estocadas a -20 °C.

4.15.7 Ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA)

Cada reação de interação foi feita em um volume final de 20 µl, contendo: 50 mM de tris·HCl (pH 7,0), 10 mM de MgCl₂, 1 mM de DTT, 100 µg/ml de BSA, 4% de

glicerol, 50 ng/ μ l de DNA de esperma de salmão e 0,5 mM de EDTA, proteína e sonda radiomarcada. No ensaio de EMSA, concentrações crescentes de PhoB-His fosforilada (0; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 5; 10; 15 e 20 μ M) foram adicionadas a um microtubo contendo o meio de interação sem sonda (ver acima). As proteínas foram incubadas no gelo por 15 min. Em seguida, aproximadamente 6.000 cpm de DNA marcado (1 μ l de sonda diluída) foram acrescentados e as reações foram incubadas a 37 °C por 30 min. Após esse período, foram acrescentados 3 μ l de tampão de amostra 6X (*DNA Loading Dye*, Thermo Scientific) em cada reação e o DNA foi separado em gel de poliacrilamida 10% não desnaturante a 100 V em tampão TBE 1X a 4 °C por 90 min. Posteriormente, os géis foram colocados sobre papel Whatman e foram secos no *Gel Dryer Model 583* (Bio-Rad) por 1 hora e 20 min no vácuo. Cada gel foi então visualizado no *Cyclone® Plus Storage Phosphor System* (PerkinElmer) e pela exposição a um filme de raio-X.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Identificação do promotor principal do gene *ppk* de PA14

Tendo em vista que um dos objetivos deste projeto era investigar a regulação do promotor de *ppk*, foi necessário primeiro identificar a localização desse promotor. Há, aparentemente, uma discrepância na literatura a esse respeito: segundo (ZAGO et al., 1999), a sequência promotora de *ppk* da cepa 8830 encontra-se na região intergênica entre os genes *ppk* e *hemB* (Figura 9a). Por outro lado, em PAO1, o promotor situa-se a montante do gene *hemB* (ISHIGE et al., 1998) (Figura 9b). A diferença na posição do promotor não apenas afetaria o tamanho e a regulação do transcrito, mas também alteraria o tamanho da ORF de *ppk* em cada cepa: em 8830, a proteína PPK teria 690 aminoácidos (ZAGO et al., 1999), enquanto que a PPK de PAO1 teria 736 aminoácidos (ISHIGE et al., 1998). O produto do gene *hemB* não está relacionado com o metabolismo de Pi: o gene codifica uma proteína envolvida na síntese de porfirinas (FRANKENBERG et al., 1998).

Segundo Ishige et al. (1998), predições computacionais mostraram que, em PAO1, o ATG de *ppk* situa-se apenas 18 pb a jusante do códon de parada de *hemB* (Figura 9b). Portanto, sugeriu-se que o promotor de *ppk* deve encontrar-se a montante de *hemB*, sendo talvez comum a ambos os genes. No entanto, na cepa 8830, ensaios de *primer extension* e predições computacionais mostraram que o códon de iniciação de *ppk*, GTG, situa-se mais a jusante, ou seja, 156 pb a jusante do códon de parada do gene *hemB*, o que resultaria em uma proteína com 46 aminoácidos a menos na porção N-terminal (ZAGO et al., 1999) (Figura 9a).

Se o promotor de *ppk* for o mesmo de *hemB*, isso significa que os dois genes formam uma única unidade transcricional. Para esclarecer se *hemB* e *ppk* formam um operon na cepa PA14, foi realizada uma análise de RT-PCR. Nessa análise, empregaram-se os oligonucleotídeos PA14-*hemB*(g)-R e PA14-*ppk*(g)-R, que correspondem a sequências específicas nas ORFs de *hemB* e *ppk*, respectivamente. O sítio de anelamento de cada oligonucleotídeo e os tamanhos dos produtos de amplificação esperados estão descritos na Figura 10.

O resultado da análise de RT-PCR evidenciou a presença de uma banda de aproximadamente 1,2 kb (Figura 10). Esse produto de amplificação deve corresponder ao transcrito de mRNA resultante da cotranscrição de *ppk* com *hemB*. É possível concluir, portanto,

(a) Gene *ppk* da cepa 8830. (b) Gene *ppk* da cepa PAO1.

Figura 9 – Sequência nucleotídica da porção 3' do gene *hemB* e 5' de *ppk* nas cepas PAO1 e 8830 de *P. aeruginosa*. Aparecem sublinhadas as sequências Shine-Dalgarno putativas próximas ao códon de iniciação de tradução de PPK de cada cepa (ATG ou GTG). Na sequência correspondente à cepa 8830 aparece indicada a região promotora de *ppk*: são mostrados o sítio de início da transcrição (TSS), determinado por *primer extension* (ZAGO et al., 1999), e os elementos putativos -35 e -10 reconhecidos pelo fator σ^E . A sequência de aminoácidos de PPK predita é apresentada em baixo da sequência nucleotídica. Os números ao lado indicam o comprimento da sequência, e dentro de círculos cinzas aparecem marcados os SNPs encontrados.

(a) Esquema representativo dos oligonucleotídeos empregados na RT-PCR. São apresentados também os tamanhos dos produtos de amplificação esperados.

(b) Gel de agarose 1% com os produtos da análise por RT-PCR.

Figura 10 – **Deteção do transcrito *hemB-ppk*.** Em (a) são ilustrados os sítios de anelamento dos oligonucleotídeos utilizados na análise, assim como os tamanhos esperados dos produtos de amplificação correspondentes à etapa de PCR convencional. A imagem não está em escala. Em (b) observa-se o gel de agarose 1% com os produtos finais da reação de RT-PCR. A) produto *hemB-ppk*; B) produto *hemB*; C) produto *ppk*. Controles negativos: oligonucleotídeos PA14-*hemB*(g)-F/PA14-*hemB*(g)-R: D) RT-PCR sem transcriptase reversa; E) RT-PCR sem RNA molde; oligonucleotídeos PA14-*ppk*(g)-F/PA14-*ppk*(g)-R: F) RT-PCR sem transcriptase reversa; G) RT-PCR sem RNA molde.

Figura 11 – Possível organização dos genes *hemB* e *ppk* no cromossomo de PA14. São mostradas as regiões clonadas no vetor mini-CTX-*lacZ* para a avaliação de atividade promotora mediante ensaios de β -galactosidase. Os círculos brancos representam regiões intergênicas.

que, em PA14, esses dois genes devem ser cotranscritos em um operon, como também foi sugerido para PAO1. Sendo assim, o promotor a montante de *hemB* provavelmente deve regular a expressão de *ppk*. Porém, isso não descarta a possibilidade de *ppk* ser regulado por dois promotores: um promotor localizado a montante de *hemB* e o outro imediatamente a montante de *ppk*. A intensidade da banda de amplificação pertencente a esse transcrito é bem mais fraca do que as bandas correspondentes aos controles positivos. Essa diferença se deve ao fato de que a PCR de fragmentos pequenos é mais eficiente do que a de fragmentos grandes. Os controles negativos estão limpos, mostrando que todo o produto de amplificação por PCR foi gerado a partir de cDNA.

O próximo passo foi analisar a atividade promotora a montante do gene *hemB* e imediatamente a montante do gene *ppk*. Com esse intuito, foram construídas duas fusões transcricionais no vetor Mini-CTX-*lacZ* (Figura 11): uma continha um fragmento de PCR de 2.075 pb englobando a porção 3' do gene PA14_69250 (localizado a montante de *hemB*), a totalidade do gene *hemB* e também a porção 5' do gene *ppk*. A outra construção continha um fragmento de 368 pb correspondente a 92 pb da região 3' do gene *hemB* e uma porção de 122 pb no 5' de *ppk* (empregando-se o gene *ppk* de 8830 como referência). As construções foram integradas no cromossomo de PA14, conforme descrito na seção 4.5. Finalmente, avaliou-se a expressão promotora desses fragmentos de DNA através de ensaios de β -galactosidase (Figura 12a). As culturas testadas foram cultivadas em meio DPMM +Pi e -Pi.

Os ensaios de β -galactosidase tornaram evidente a fraca atividade promotora da região localizada imediatamente a montante de *ppk*, avaliada por meio da fusão *ppkP-lacZ*. De

(a) Ensaio de β -galactosidase na determinação do promotor de *ppk* em PA14.

(b) Ensaio de fosfatase alcalina.

Figura 12 – **Avaliação da atividade de dois possíveis promotores do gene *ppk* em meio DPMM suficiente (1 mM) e limitado (0,2 mM) em Pi.** Bactérias carregando as inserções cromossomais (*hemB-ppk*)*P-lacZ* e *ppkP-lacZ* foram analisadas após 4 e 8 horas de crescimento em relação à atividade da β -galactosidase e fosfatase alcalina. Os valores apresentados e o desvio padrão da média correspondem a réplicas de três experimentos independentes.

fato, a expressão dessa fusão foi só ligeiramente maior que a expressão da β -galactosidase observada na cepa carregando o gene *lacZ* sem promotor. No entanto, a fusão (*hemB-ppk*)*P-lacZ*, que incluía o promotor de *hemB*, apresentou uma atividade promotora pelo menos 39 vezes maior do que a observada com a fusão *ppkP-lacZ*. Esse resultado sugere que na região promotora de *hemB* inicia-se a síntese de um longo mRNA que é transcrito até o final de *ppk*, não havendo nenhum terminador transcricional entre esses dois genes. Contudo, o promotor fraco, imediatamente a montante de *ppk*, poderia ter algum papel importante em alguma condição fisiológica desconhecida ainda não testada.

A atividade do promotor de *hemB* foi inibida em condições de carência de Pi. Este resultado indica que *ppk* não pertence ao regulon Pho de PA14, assim como ocorre em *E. coli* (DIEN; KEASLING, 1999; MOROHOSHI et al., 2002; NEIDHARDT, 1996). A inibição da atividade promotora é provavelmente devida ao estresse nutricional causado pela carência de Pi, que causa a interrupção do crescimento e diminuição do metabolismo celular. Portanto, aparentemente, o promotor que regula a expressão de *ppk* é ativado de forma constitutiva. De fato, análises da expressão de *hemB* mostraram que ele não é regulado por oxigênio, nitrato, heme ou ferro (FRANKENBERG et al., 1998), sendo que, seu

promotor apresenta sequências consenso putativas -35 e -10 reconhecidas pelo fator σ^{70} , não havendo indícios da presença de outras sequências regulatórias (FRANKENBERG et al., 1998). Conforme esperado, a atividade da fosfatase alcalina aumentou de forma substancial nas bactérias limitadas em Pi (Figura 12b).

5.2 Avaliação do efeito da mutação *phoU* sobre a regulação dos genes *ppk* e *ppx* de PA14

Para testar se a mutação *phoU* afeta a expressão de *ppk* e de *ppx*, foram utilizados os plasmídios integrativos (*hemB-ppk*)*P*-MCl e *ppx**P*-MCl, inseridos no cromossomo da cepa selvagem e do mutante *phoU*. A atividade promotora foi inicialmente avaliada em meio DPMM +Pi (meio mínimo suficiente em Pi). Como observado na Figura 13, a expressão de *ppk**P-lacZ* foi 4,9 vezes maior no mutante *phoU* do que na cepa selvagem durante as duas primeiras horas de crescimento. Daí em diante, essa diferença caiu para um pouco mais do dobro. Já em relação a *ppx**P-lacZ*, o mutante *phoU* apresentou 5 a 9 vezes menos atividade do que a cepa selvagem durante a fase exponencial de crescimento, e aproximadamente duas vezes menos no começo da fase estacionária. Ambos os promotores apresentaram um nível basal de atividade não desprezível, que foi aumentando conforme as bactérias iam entrando na fase estacionária. Esse dado é compatível com o que se sabe sobre a atividade desses genes em *E. coli*, na qual a expressão do operon *ppk-ppx* aumenta na fase estacionária (JUNG et al., 2012).

Alguma das limitações que dificultaram o planejamento desses experimentos foi a falta de informações na literatura no que diz respeito à regulação dos genes *ppk* e *ppx* de *P. aeruginosa*, e até mesmo de *E. coli*. Embora já tenham sido descritos os estímulos ambientais que levam ao acúmulo de poliP, eles nem sempre afetam a expressão de *ppk* e/ou de *ppx* ao nível de transcrição (JUNG et al., 2012).

Em *E. coli*, foi observado o rápido acúmulo de poliP em resposta aos estresses osmótico e nutricional (limitação de nitrogênio ou Pi e aminoácidos) (AULT-RICHÉ et al., 1998; RAO et al., 1998). Já em *P. aeruginosa*, o acúmulo de poliP foi evidenciado em condições de limitação de Pi e aminoácidos (AULT-RICHÉ et al., 1998). Portanto, esses fatores de estresse poderiam representar o estímulo necessário para aumentar de forma significativa a transcrição de *ppk* e/ou de *ppx*. De fato, foi mostrado que a limitação de Pi ou de nitrogênio estimula a transcrição de *ppx* em PAO1 (GALLARATO et al.,

Figura 13 – Efeito de PhoU sobre a expressão de $(hemB-ppk)P-lacZ$ e $ppxP-lacZ$. A cepa selvagem PA14 e o mutante $phoU^-$, carregando as inserções cromossômicas $(hemB-ppk)P-lacZ$ e $ppxP-lacZ$, foram cultivadas em meio DPMM suficiente em Pi (1 mM). A expressão das fusões foi avaliada a cada 2 horas em ensaios de β -galactosidase. Os valores apresentados e o desvio padrão da média correspondem a três experimentos independentes.

Figura 14 – Sequências consenso na região promotora necessárias à regulação do gene *ppx* de *P. aeruginosa* PAO1. Fonte: (GALLARATO et al., 2014).

2014). Esses autores descreveram na região promotora de *ppx* uma sequência consenso de ligação da proteína ativadora NtrC, e uma sequência promotora reconhecida pelo fator σ^{54} (Figura 14). Foi identificada também uma sequência *Pho box* putativa próxima a uma possível região -10. Para corroborar esses dados, a expressão de *(hemB-ppk)P-lacZ* e *ppxP-lacZ* também foi avaliada em condições de limitação de Pi ou de nitrogênio.

Para induzir nas bactérias uma resposta fisiológica à limitação de nitrogênio, empregou-se a metodologia descrita em (WENNER et al., 2013). Dessa forma, as bactérias foram cultivadas em meio DPMM suplementado com NO_3^- ao invés de NH_4^+ , a forma química preferencial de nitrogênio. NO_3^- não é uma boa fonte de nitrogênio, pois não é eficientemente captado pela bactéria (KIRCHMAN, 1994; WENNER et al., 2013). A expressão promotora de *(hemB-ppk)P-lacZ* e *ppxP-lacZ* foi avaliada 4 horas (fase exponencial) e 8 horas (fase de carência nutricional) após a diluição das bactérias nos meios limitantes.

O padrão de expressão da β -galactosidase de *(hemB-ppk)P-lacZ* nas cepas cultivadas em meio DPMM -Pi assemelha-se ao observado em meio DPMM +Pi, sendo a expressão de *(hemB-ppk)P-lacZ* no mutante *phoU* maior do que na cepa selvagem (Figura 15a). Em meio limitado em N, observou-se pouca diferença entre a cepa selvagem e o mutante *phoU* em relação à expressão dessa fusão. Com referência à fusão *ppxP-lacZ*, a cepa selvagem apresentou maior atividade em todos os casos, quando comparada ao mutante *phoU*, especialmente nos meios -N e +Pi (Figura 15b). O mutante *phoU* apresentou expressão constitutiva da fosfatase alcalina, enquanto que a cepa selvagem apresentou alta atividade

(a) Ensaio de β -galactosidase em PA14 e o mutante *phoU* carregando a inserção cromossomal $(hemB-ppk)P-lacZ$.

(b) Ensaio de β -galactosidase em PA14 e o mutante *phoU* carregando a inserção cromossomal *ppxP-lacZ*.

(c) Ensaio de fosfatase alcalina nas cepas carregando a inserção cromossomal $(hemB-ppk)P-lacZ$.

(d) Ensaio de fosfatase alcalina nas cepas carregando a inserção cromossomal *ppxP-lacZ*.

Figura 15 – Efeito de PhoU sobre a expressão de $(hemB-ppk)P-lacZ$ e *ppxP-lacZ* em diferentes condições de crescimento. Bactérias carregando as inserções cromossomais $(hemB-ppk)P-lacZ$ e *ppxP-lacZ* foram cultivadas em meio DPMM +Pi, -Pi e -N a 37 °C e ensaiadas nos tempos de 4 e 8 horas para a atividade da β -galactosidase e fosfatase alcalina. Os valores apresentados e o desvio padrão da média correspondem a três experimentos independentes.

da enzima somente na fase de carência de Pi, conforme esperado (Figura 15c-d).

Os resultados apresentados sugerem as seguintes conclusões:

1. **Na ausência de *phoU* há aumento da expressão do gene *ppk* e redução da expressão de *ppx*:** isto levaria a um maior acúmulo de poliP no mutante *phoU*, de acordo com o observado em (ALMEIDA et al., 2015). Pesquisas desenvolvidas em nosso laboratório demonstraram que o mutante *phoU*, além de acumular poliP, acumula o nucleotídeo (p)ppGpp (ALMEIDA et al., 2015). Em *E. coli*, foi demonstrado que o (p)ppGpp inibe a atividade da proteína PPX *in vitro* (KURODA et al., 1997) e que quando se apresenta o acúmulo de poliP nessa bactéria, não há alteração aparente nas atividades de PPK e de PPX (KURODA et al., 1997). Portanto, foi proposto que o acúmulo de poliP no mutante *phoU* de *E. coli* seria consequência de uma diminuição na degradação enzimática do bipolímero devido à inibição da atividade de PPX causada por (p)ppGpp.

Em *E. coli* e em espécies relacionadas, *ppk* e *ppx* estão arrançados na forma de um operon. Por esse motivo, nessas bactérias pareceria realmente necessário algum tipo de regulação pós-transcricional que, através do desequilíbrio nos processos de síntese/degradação, levasse finalmente ao acúmulo de poliP. Todavia, em *P. aeruginosa*, *ppk* e *ppx* formam unidades transcricionais independentes. Desse modo, um aumento da transcrição de *ppk* e uma diminuição da transcrição de *ppx*, como observado no mutante *phoU* neste trabalho, poderia gerar as condições necessárias para o acúmulo de poliP nesta bactéria. Além disso, haveria a contribuição de (p)ppGpp para o acúmulo de poliP através da inibição de PPX. Em conjunto, esses três fenômenos poderiam explicar por que *P. aeruginosa* acumula muito mais poliP do que *E. coli*.

2. **A forma de regulação dos genes *ppk* e *ppx* é controversa:** embora existam atualmente diversos trabalhos detalhando uma ampla variedade de estímulos que geram a síntese de poliP, há realmente pouca informação sobre a regulação transcricional e pós-transcricional dos genes *ppk* e *ppx*. Além disso, as informações existentes não são conclusivas, e são comuns trabalhos com resultados contraditórios, tendo como exemplo: fusões transcricionais construídas com o promotor do operon *ppk-ppx* de *E. coli* mostraram que se trata de um promotor fraco e constitutivo, cuja atividade aumenta ligeiramente em limitação de Pi, porém PhoR/PhoB

não estão envolvidos nessa regulação (DIEN; KEASLING, 1999; JUNG, 2008). Por outro lado, (KATO et al., 1993) mostraram que uma fusão construída com o mesmo promotor parece indicar que a atividade de *ppk* é dependente de PhoB.

Atualmente, sabe-se que genes envolvidos na síntese de purinas ativam a transcrição do operon *ppk-ppx* em *E. coli*, e de *ppk* em várias bactérias —*K. pneumoniae*, *V. cholerae*, *Acinetobacter* sp. ADP1 e *S. typhimurium*— (JUNG et al., 2012). Em *Acinetobacter* sp. foi observada a regulação de *ppk* em limitação de Pi, porém os dois promotores que regulam sua transcrição não apresentam sequências consenso reconhecidas por PhoB (GEISSDÖRFER et al., 1998). Em *K. aerogenes*, a sequência promotora de *ppk* parece possuir um Pho *box* e sua regulação é dependente de PhoB (KATO et al., 1993). Em *P. fluorescens*, a transcrição de *ppk* é regulada por PhoB e por algum outro mecanismo desconhecido (SILBY et al., 2009).

A regulação de *ppx* foi ainda menos estudada. GALLARATO et al. demonstraram que *ppx* possui pelo menos dois tipos de controle a nível transcricional: um promotor que responde às limitações de nitrogênio, regulado pelo ativador NtrC e reconhecido pelo fator σ^{54} , e outro promotor que responde às carências/limitações de Pi regulado por PhoB. No entanto, os resultados aqui apresentados mostraram que nem *ppx* nem *ppk* têm sua expressão aumentada nessas condições. No caso de *ppx*, a cepa selvagem cultivada em meio deficiente em N apresentou um perfil de expressão similar ao da cultura em meio não limitado. Por outro lado, foi evidenciada uma ligeira queda na expressão de *ppx* em meio limitado em Pi. Concluimos, portanto, que *ppk* e *ppx* são expressos a partir de promotores que não respondem à carência de Pi ou N.

Em (BAINS et al., 2012) estudaram o perfil de genes diferencialmente expressos na deficiência de Pi em *P. aeruginosa* PAO1 através da técnica de microarranjos. O resultado dessa análise mostrou que 842 genes tiveram sua expressão afetada pela deficiência de Pi, dos quais 495 tiveram sua expressão aumentada e 347 diminuída. Um estudo similar de análise de transcriptoma foi realizado em (ZABORIN et al., 2009), no qual grande parte dos resultados coincidem com os dados da análise de microarranjos de (BAINS et al., 2012). Contudo, em nenhuma dessas duas análises de expressão gênica foram detectadas alterações nos níveis de expressão de *ppk* (PA5242) ou de *ppx* (PA5241) em deficiência ou carência total de Pi. Em outra pesquisa, uma fusão transcricional do promotor de *ppx* de *P. aeruginosa* 8830 com

lacZ, não mostrou qualquer tipo de modulação na transcrição desse gene (ZAGO et al., 1999). Por fim, mutantes *phoU* de *E. coli* e de *P. aeruginosa* são caracteristicamente Pho constitutivos e acumuladores de poliP (ALMEIDA et al., 2015; MOROHOSHI et al., 2002). Portanto, se *ppx* possuísse um Pho *box*, e ele respondesse positivamente à deficiência de Pi, seria esperado que a expressão desse gene fosse afetada positivamente pela mutação *phoU*. Isso não foi observado nos ensaios de β -galactosidase com a cepa *phoU*⁻ *ppx* *P-lacZ* em qualquer uma das condições nutricionais avaliadas. Além disso, a atividade aumentada da exopolifosfatase deveria degradar grande parte do poliP presente na bactéria, sendo seu acúmulo inatingível. Como isso não ocorre (ALMEIDA et al., 2015), concluímos que, pelo menos no caso da cepa PA14, *ppx* não deve ser ativado pela deficiência de Pi.

GALLARATO et al. identificaram uma possível sequência Pho *box* a montante de *ppx*, cuja identidade com o Pho *box* do gene *phoX* de *P. fluorescens* (MONDS et al., 2006), segundo eles, é de 64%. Porém, uma rápida inspeção por BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) permitiu verificar que a identidade é menor, de 50% (Figura 16). Além disso, a jusante da suposta Pho *box* há apenas uma sequência -10 com baixíssima similaridade ao consenso TATAAT. Tomados todos esses dados em conjunto, em nossa opinião, a possibilidade de *ppx* e/ou *ppk* pertencerem ao regulon Pho de *P. aeruginosa* não parece ser muito provável.

FONTE	ALINHAMENTO	Pho <i>box</i>	IDENTIDADE
GALLARATO et al., 2014	CTGCCGCATTGGCGACCC	<i>ppxP</i> (<i>P. aeruginosa</i>)	9/18 (50%)
MONDS et al., 2006	CTGCAACGAAAGCGTCAT	<i>phoXP</i> (<i>P. fluorescens</i>)	

Figura 16 – Alinhamento das sequências Pho *box* putativas presentes nos promotores de *ppx* e *phoX* das espécies *P. aeruginosa* e *P. fluorescens*, respectivamente. Foi usada a ferramenta BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) para o alinhamento das sequências. Fonte das sequências: (GALLARATO et al., 2014; MONDS et al., 2006).

5.3 Determinação do padrão de transcrição do operon *pst* de *Pseudomonas aeruginosa*

5.3.1 Detecção dos transcritos de *pst* por *northern blot*

Um dos objetivos do projeto era analisar o padrão transcricional do operon *pst* de *P. aeruginosa*. Isso porque o sistema Pst é o principal meio de captação de Pi, sendo fundamental para o acúmulo de poliP e, também, porque *phoU*, cuja mutação é analisada neste trabalho, pertence ao operon *pst*. A técnica de *northern blot* é a única ferramenta que permite avaliar o tamanho dos transcritos de um operon. Para essa análise, foram utilizadas sondas de DNA biotinizadas que hibridizam com regiões internas dos transcritos de *pstS*, *pstC* ou *phoU* (Figura 17).

Apesar de diversas tentativas e diversas modificações no protocolo, conseguiu-se detectar apenas um produto de hibridização com a sonda *pstS*, correspondendo a um transcrito de 0,97 kb (Figura 18). A partir desse transcrito deve ser codificada a proteína periplasmática PstS. O método cromogênico de detecção utilizado no ensaio de *northern blot* tem baixa sensibilidade, quando comparado com outros sistemas de detecção de sondas marcadas. Por esse motivo acreditamos que demais espécies de mRNA não foram detectadas.

Em outros operons que codificam sistemas de transporte do tipo ABC, normalmente o transcrito mais abundante corresponde ao primeiro gene do operon, que codifica a proteína periplasmática de ligação ao substrato (HIGGINS et al., 1982; HORAZDOVSKY; HOGG, 1987). Em *E. coli*, o operon *pst* é transcrito em uma longa molécula de mRNA que, após sua síntese, é rapidamente processada, gerando moléculas de menor tamanho (AGUENA et al., 2002). Próximo da extremidade 3' do gene *pstS*, foi identificada uma sequência REP putativa que estabiliza essa região do mRNA, evitando sua degradação pela atividade de

Figura 17 – Operon *pst* de *P. aeruginosa* apresentando as regiões de amplificação por PCR das sondas de DNA utilizadas no ensaio de *northern blot*. A seta tracejada representa a transcrição da espécie de mRNA detectada correspondente ao transcrito de *pstS*.

Figura 18 – **Análise do operon *pst* por *northern blot*.** Cada sonda biotinilada utilizada para hibridizar com os respectivos transcritos aparece identificada na membrana. O RNA foi extraído de culturas de PA14 cultivadas em meio DPMM em suficiência (+ Pi) ou deficiência (- Pi) de fósforo.

ribonucleases (AGUENA et al., 2002; AGUENA et al., 2008). Assim, o transcrito de *pstS* torna-se o mais abundante, quando comparado com os mRNAs correspondentes aos outros genes do operon. Isso também foi observado no operon *pst* da bactéria Gram-positiva *B. subtilis* (ALLENBY, 2004).

Na análise da transcrição do operon *pst* de outro bacilo Gram-positivo, *Clostridium acetobutylicum*, foram observados unicamente dois transcritos de mRNA de abundâncias diferentes: um correspondente ao gene *pstS*, o mais abundante, e outro correspondente ao transcrito do operon completo (FISCHER et al., 2006). Nessa análise, mostrou-se que próximo do final do gene *pstS* existe uma sequência que poderia atuar como um terminador de transcrição. Portanto, em *C. acetobutylicum*, esse pequeno transcrito parece ser gerado pela terminação prematura de sua transcrição e não pelo processamento do longo mRNA.

A relativa abundância da proteína PstS, em comparação com os outros componentes do transportador Pst, poderia tornar o processo de captação de Pi mais eficiente, pois, como observado em outros transportadores ABC, a ligação da proteína periplasmática a seu substrato é geralmente o processo que limita a velocidade do transporte (PODBIELSKI et al., 1996). Além disso, um único canal intermembranar poderia ser utilizado por várias cópias da proteína periplasmática, aumentando a eficiência do transporte do nutriente (ALLENBY, 2004).

Segundo a análise de microarranjos mencionada acima, foi observado que o gene *pstS* apresentou um nível de expressão de 8 a 12 vezes mais intenso do que os demais genes do operon *pst* nas limitações de Pi (BAINS et al., 2012). O operon *pst* de *P. aeruginosa* possui duas *Pho box*: um a montante de *pstS* e outro a montante de *pstC* (Figura 17). Essa independência transcricional permitiria à bactéria empregar uma estratégia diferente da observada em *E. coli* para modular, já no nível da transcrição, os níveis de expressão de *pstS* em relação aos demais genes do operon. Ou seja, haveria um terminador de transcrição imediatamente a jusante de *pstS* e, em seguida, viria o promotor de *pstC*. Uma análise com o programa *mfold* (ZUKER, 2003) revelou a presença de um terminador de transcrição putativo 51 nt após o códon de parada de *pstS* e 43 nt antes da sequência *Pho box* a montante de *pstC*. Esse aparente terminador apresenta uma haste de 9 pb composta por GCs, uma alça de 8 nt, e 3 uracilas próximas à região 3' do mRNA (Figura 19).

Embora só tenha sido observada uma banda de hibridização no *northern blot*, acreditamos que os demais transcritos possam ser detectados empregando-se essa técnica. No

Figura 19 – **Estrutura secundária com forma de grampo presente na região intergênica entre *pstS* e *pstC*.** O grampo apresenta uma haste de GCs e 3 uracilas próximas da região 3' do mRNA.

futuro, serão aprimoradas as condições experimentais utilizando-se um *kit* de marcação e hibridização mais sensível ou sondas de DNA radiomarcadas.

5.3.2 Identificação de um promotor alternativo a montante de *phoU*

No operon *pst* de *E. coli*, além do promotor principal, a montante de *pstS*, foram encontrados promotores internos de atividade fraca a montante de *pstC*, *pstB* e *phoU* (SPIRA et al., 2010). Diferentemente do promotor principal, esses promotores atuam de forma constitutiva, mesmo quando a concentração de Pi no meio é alta. A expressão basal do promotor principal, em conjunto com a expressão constitutiva dos promotores internos, permitiria que o transportador Pst mantivesse um nível de transcrição mínimo e que contribuísse para o transporte de Pi, mesmo quando a concentração do nutriente no meio fosse alta (SPIRA et al., 2010).

Complementando a análise do padrão de transcrição do operon *pst* de PA14, foi abordada a viabilidade da presença de promotores internos nesse operon. Foi inicialmente estudada essa possibilidade para o gene *phoU*, pois o foco de atenção da presente pesquisa recaí particularmente sobre ele.

Para avaliar a existência de uma possível atividade promotora a montante de *phoU*, foi amplificada uma região de 1.334 pb que engloba parte de *pstB* e a região 5' de *phoU* (Figura 20). Esse fragmento de DNA foi clonado no vetor Mini-CTX-*lacZ* e o vetor resultante foi transformado em PA14. Bactérias carregando a fusão foram cultivadas em meio DPMM +Pi e -Pi.

Os ensaios de β -galactosidase mostraram que a expressão de *phoU*-*P-lacZ* foi de 4 a 10 vezes maior do que a observada na cepa carregando apenas um gene *lacZ* (Figura 21a), sendo ligeiramente maior em condições de abundância de Pi. Isto sugere que deve haver um promotor funcional constitutivo na região a montante de *phoU*. A atividade da fosfa-

Figura 20 – Esquema do operon *pst* de PA14 no qual aparece indicada a região *pstB-phoU* amplificada por PCR e clonada no Mini-CTX-*lacZ*. A atividade promotora dessa região foi avaliada através de ensaios de β -galactosidase.

Figura 21 – **Avaliação da atividade promotora na região imediatamente a montante de *phoU***. Bactérias foram cultivadas em meio DPMM +Pi e -Pi a 37 °C. 4 e 8 horas após o início do crescimento, alíquotas de bactérias foram coletadas e avaliadas em ensaios de β -galactosidase. Foi também testada a atividade da fosfatase alcalina de cada cultura. Os valores apresentados e o desvio padrão da média correspondem a três experimentos independentes.

tase alcalina confirma que as culturas cultivadas em meio mínimo -Pi haviam entrado na fase de carência de Pi (Figura 21b).

Pode haver mais de um motivo para a presença de um promotor próprio constitutivo governando a transcrição de *phoU*. A ausência de *phoU* foi associada a vários fenótipos distintos, tais como acúmulo de poliP, diminuição da resistência a antibióticos e aos estresses osmótico, oxidativo, térmico e nutricional, e menor persistência (LEE et al., 2009; LI; ZHANG, 2007; SHI; ZHANG, 2010; WANG et al., 2013). É possível que a expressão de *phoU* a partir de seu próprio promotor seja necessária para manter um nível de proteína PhoU suficiente para evitar os efeitos nocivos causados pela ausência de *phoU*. A atividade de PhoU não se limita ao seu papel de repressor do regulon Pho pois, na sua ausência, genes envolvidos em processos fisiológicos e metabólicos diferentes são afetados (LI; ZHANG, 2007).

Finalmente, no futuro espera-se caracterizar melhor o papel de *phoU* e de seu promotor, e também avaliar a presença de outros promotores internos no operon *pst* de PA14.

5.4 Avaliação da funcionalidade das sequências Pho *box* do operon *pst* e da possível regulação de PhoB sobre o gene *ppx* de PA14

Para testar se as duas sequências Pho *box* putativas presentes no operon *pst* são funcionais, foi realizado um ensaio de retardo da mobilidade eletroforética (EMSA).

Como primeiro passo, foi necessário clonar a ORF de PhoB, e expressar e purificar a proteína. Para isso, *phoB* foi amplificado por PCR e clonado no vetor de expressão pET-28a(+). Essa construção foi eletroporada na cepa BL21 (DE3) de *E. coli* e foi realizado um ensaio da expressão da proteína PhoB-His em pequena escala. Testaram-se as temperaturas de crescimento de 30 e 37 °C. A separação das proteínas do extrato de células por SDS-PAGE mostrou de forma clara uma banda intensa do tamanho próximo ao esperado, de 26,6 kDa, nas culturas induzidas com IPTG em ambas as temperaturas de crescimento (Figura 22). Além disso, ensaios de solubilidade mostraram que a maior parte da proteína expressada encontrava-se na fração solúvel (dados não apresentados).

A proteína PhoB-His foi então purificada em coluna de afinidade, originando um pico intenso correspondente à espécie proteica principal das frações coletadas, assim como pequenos ombros nas laterais desse pico, principalmente nas frações finais (Figura 23a). O gel de poliacrilamida que avaliou a pureza da proteína nas frações eluídas, mostrou bandas intensas e relativamente puras nas frações 4 e 5 (Figura 23b). Essas frações foram utilizadas para o ensaio de EMSA. A proteína PhoB-His purificada foi fosforilada *in vitro* utilizando-se acetil fosfato como doador do grupo fosforil. Fragmentos de DNA

Figura 22 – Mini ensaio de indução de PhoB-His. SDS-PAGE (15%) com os extratos de proteína das culturas de BL21 (DE3) crescidas a 30 e 37 °C. As culturas induzidas foram tratadas com IPTG a uma concentração de 1 mM por 4 horas.

(a)

(b)

Figura 23 – **Purificação de PhoB-His por cromatografia de afinidade por íons metálicos imobilizados.** A coluna de afinidade carregada com Ni^{2+} foi equilibrada com tampão de ligação (50 mM de tris-HCl (pH 8,0), 200 mM de NaCl e 10 mM de imidazol). Uma cultura de BL21 (DE3), cultivada a 30 °C por 4 horas em LB suplementado com 0,5 mM de IPTG, foi lisada, clarificada e inserida na coluna de afinidade. Depois de várias lavagens com tampão de ligação, a proteína foi eluída com tampão de eluição contendo imidazol (500 mM). (a) O cromatograma apresentado corresponde às diferentes frações de PhoB-His eluídas da coluna. (b) Gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE 15%) com as frações de eluição (2-10) da purificação de PhoB-His.

correspondentes à região regulatória de *pstS* e de *pstC* foram marcados radioativamente em suas extremidades utilizando-se [γ - 32 P]-ATP e a enzima PNK, incubados na presença de PhoB-P, e separados em um gel nativo, conforme descrito detalhadamente nas seções 4.15.6 e 4.15.7.

O ensaio de EMSA mostrou que PhoB interagiu *in vitro* com as duas sondas contendo as sequências Pho *box* putativas localizadas a montante dos genes *pstS* e *pstC* (Figura 24). A interação com cada sequência de DNA foi observada em todas as faixas de concentração de proteína avaliadas (i.e., 0,1-20 μ M). Considerando-se o resultado do ensaio de *northern blot*, no qual foi detectado um transcrito correspondente ao gene *pstS*, esperava-se que o Pho *box* localizado a montante desse gene fosse completamente funcional. Contudo, não havia evidência direta sobre a funcionalidade do segundo Pho *box* localizado na região intergênica entre *pstS* e *pstC*. Esse resultado sugere que o operon *pst* de PA14 deve ser transcrito a partir de dois locais diferentes, gerando-se pelo menos dois transcritos: *pstS* e *pstCABphoU*. Interessantemente, em (BAINS et al., 2012) foi observado que o nível de expressão dos genes *pstC*, *pstA*, *pstB* e *phoU* é similar, porém diferente ao nível de expressão do gene *pstS*.

De acordo com (GALLARATO et al., 2014), deve haver um Pho *box* funcional a montante de *ppx*. Porém, os resultados com a fusão *ppxP-lacZ* aqui apresentados, mostraram claramente que *ppx* não responde à carência de Pi. Desta maneira, resolvemos testar se o Pho *box* putativo, sugerido por (GALLARATO et al., 2014), é funcional. A interação de PhoB-His com o Pho *box* putativo de *ppx* mostrou-se muito fraca quando comparada com aquela observada para os Pho *box* de *pstS* e *pstC*. Além disso, PhoB-His ligou-se à sonda *ppx* somente quando presente em altas concentrações (i.e., ≥ 10 μ M), porém, mesmo na maior concentração de PhoB-His (i.e., 20 μ M), a quantidade de sonda ligada continuou sendo baixa. Isto sugere que o fraco sinal observado referente ao *shift* da banda de *ppx* deve ser fruto de uma interação inespecífica de PhoB-His com o DNA.

Em conclusão, a presença de um Pho *box* funcional a montante de *ppx* é improvável, dada a fraca interação entre PhoB-His e o DNA a montante de *ppx*. Portanto, considerando-se:

1. Os ensaios de β -galactosidase com a fusão *ppxP-lacZ*, que mostraram que *ppx* não é induzido em carência de Pi

Figura 24 – Ensaio de ligação *in vitro* de PhoB nas regiões promotoras dos genes *pstS*, *pstC* e *ppx*. São apresentados os resultados dos ensaios de retardo da mobilidade eletroforética no estudo da ligação da proteína PhoB-His em três promotores de interesse. Os sítios de ligação encontram-se centrados em suas sequências Pho *box* putativas. Cada sonda foi incubada com 0; 0,1; 0,3; 0,5; 0,7; 0,9; 5; 10; 15 e 20 μM de PhoB-His como mostrado. O DNA livre e o complexo PhoB-His-DNA foram nomeados como L e C, respectivamente. Cada gel foi visualizado por autorradiografia (esquerda) e por análise com *phosphorimager* (direita).

2. O ensaio de EMSA, que mostrou que PhoB-His interage fracamente com o suposto Pho *box* a montante de *ppx*
3. O acúmulo de poliP que ocorre de forma exacerbada no mutante *phoU* Pho constitutivo (ALMEIDA et al., 2015)

é muito provável que a suposta dependência de *ppx* por PhoB, descrita para PAO1 (GALLARATO et al., 2014), não seja relevante para a cepa PA14.

6 CONCLUSÕES

- Os genes *hemB* e *ppk* são transcritos juntamente, formando um operon.
- Os genes *ppk* e *ppx* são expressos a partir de promotores constitutivos, não sendo evidenciado nenhum aumento em sua expressão em condições de limitação de Pi ou de N.
- Constatou-se alterações significativas nos níveis de expressão dos genes *ppk* e *ppx* no mutante *phoU*. A inibição parcial de *ppx*, e o aumento na expressão de *ppk* devem contribuir para o acúmulo de poliP característico da cepa *phoU*⁻.
- Foi detectado o transcrito *pstS* do operon *pst*. No entanto, por limitações técnicas, não foi possível determinar o padrão de transcrição completo desse operon
- Há um promotor localizado imediatamente a montante da ORF de PhoU, que não responde à disponibilidade de Pi no meio.
- O operon *pst* contém duas Pho *box* funcionais.
- A Pho *box* a montante de *ppx* aparentemente não é funcional.

REFERÊNCIAS^{*}

- AGUENA, M.; FERREIRA, G. M.; SPIRA, B. Stability of the *pstS* transcript of *Escherichia coli*. **Archives of Microbiology**, v. 191, n. 2, p. 105–112, set. 2008.
- AGUENA, M.; YAGIL, E.; SPIRA, B. Transcriptional analysis of the *pst* operon of *Escherichia coli*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 268, n. 4, p. 518–524, dez. 2002.
- AHN, K.; KORNBERG, A. Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 20, p. 11734–11739, 1990.
- AKIYAMA, M.; CROOKE, E.; KORNBERG, A. An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 1, p. 633–639, jan. 1993.
- ALI, N. J.; KESSEL, D.; MILLER, R. F. Bronchopulmonary infection with *Pseudomonas aeruginosa* in patients infected with human immunodeficiency virus. **Genitourinary Medicine**, v. 71, n. 2, p. 73–77, abr. 1995.
- ALLENBY, N. E. E. Post-transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* *pst* operon encoding a phosphate-specific ABC transporter. **Microbiology**, v. 150, n. 8, p. 2619–2628, ago. 2004.
- ALMEIDA, L. G. de. **Acúmulo de polifosfato e o papel do gene *phoU* em *Pseudomonas aeruginosa***. Dissertação (Mestrado) — Universidade de São Paulo, dez. 2013.
- 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, maio 2015.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, out. 1990.
- ANBA, J. et al. Nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa* *phoR* gene, the regulatory gene for the phosphate regulon. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 8, p. 4685–4689, ago. 1990.
- AUESUKAREE, C. et al. Intracellular phosphate serves as a signal for the regulation of the PHO pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 17, p. 17289–17294, abr. 2004.
- AULT-RICHÉ, D. et al. Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 7, p. 1841–1847, abr. 1998.
- BAEK, J. H.; LEE, S. Y. Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 264, n. 1, p. 104–109, nov. 2006.
- BAINS, M.; FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Phosphate starvation promotes swarming motility and cytotoxicity of *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 18, p. 6762–6768, set. 2012.

^{*}De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- BECHER, A.; SCHWEIZER, H. P. Integration-proficient *Pseudomonas aeruginosa* vectors for isolation of single-copy chromosomal *lacZ* and *lux* gene fusions. **BioTechniques**, v. 29, n. 5, p. 948–952, nov. 2000.
- BENDIG, J. W. et al. Two neutropenic patients with multiple resistant *Pseudomonas aeruginosa* septicaemia treated with ciprofloxacin. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 80, n. 5, p. 316–317, maio 1987.
- BLATTNER, F. R. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. **Science**, v. 277, n. 5331, p. 1453–1462, set. 1997.
- BOLESCH, D. G.; KEASLING, J. D. Polyphosphate binding and chain length recognition of *Escherichia coli* exopolyphosphatase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 43, p. 33814–33819, out. 2000.
- CAMPILLO, M. C. D.; ZEE, S. E. A. T. M. V. D.; TORRENT, J. Modelling long-term phosphorus leaching and changes in phosphorus fertility in excessively fertilized acid sandy soils. **European Journal of Soil Science**, v. 50, n. 3, p. 391–399, set. 1999.
- CARMANY, D. O.; HOLLINGSWORTH, K.; MCCLEARY, W. R. Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 3, p. 1112–1115, fev. 2003.
- CHIN, J. C.; WATTS, J. E. Biological properties of phospholipase C purified from a fleecerot isolate of *Pseudomonas aeruginosa*. **Microbiology**, v. 134, n. 9, p. 2567–2575, set. 1988.
- CHOI, K.-H.; KUMAR, A.; SCHWEIZER, H. P. A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 64, n. 3, p. 391–397, mar. 2006.
- CHRISTENSSON, M.; BLACKALL, L. L.; WELANDER, T. Metabolic transformations and characterisation of the sludge community in an enhanced biological phosphorus removal system. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 49, n. 2, p. 226–234, fev. 1998.
- CHURCH, D. et al. Burn wound infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 2, p. 403–434, abr. 2006.
- DIEN, S. J. V.; KEASLING, J. D. Control of polyphosphate metabolism in genetically engineered *Escherichia coli*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 24, n. 1, p. 21–25, 1999.
- DURFEE, T. et al. The complete genome sequence of *Escherichia coli* DH10B: insights into the biology of a laboratory workhorse. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 7, p. 2597–2606, abr. 2008.
- FILLOUX, A. et al. Phosphate regulation in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning of the alkaline phosphatase gene and identification of *phoB*- and *phoR*-like genes. **Molecular & General Genetics**, v. 212, n. 3, p. 510–513, 1988.

- FISCHER, R. J. et al. Transcription of the *pst* Operon of *Clostridium acetobutylicum* Is Dependent on Phosphate Concentration and pH. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 15, p. 5469–5478, jul. 2006.
- FITZSIMMONS, S. C. The changing epidemiology of cystic fibrosis. **The Journal of Pediatrics**, v. 122, n. 1, p. 1–9, 1993.
- FRANKENBERG, N. et al. Cloning, mapping and functional characterization of the *hemB* gene of *Pseudomonas aeruginosa*, which encodes a magnesium-dependent 5-aminolevulinic acid dehydratase. **Molecular & General Genetics**, v. 257, n. 4, p. 485–489, fev. 1998.
- GALLARATO, L. A. et al. Exopolyphosphatase of *Pseudomonas aeruginosa* is essential for the production of virulence factors, and its expression is controlled by NtrC and PhoB acting at two interspaced promoters. **Microbiology**, v. 160, n. Pt 2, p. 406–417, fev. 2014.
- 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, maio 2014.
- GAY, P. et al. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 164, n. 2, p. 918–921, nov. 1985.
- GEISSDÖRFER, W. W.; RATAJCZAK, A. A.; HILLEN, W. W. Transcription of *ppk* from *Acinetobacter* sp. strain ADP1, encoding a putative polyphosphate kinase, is induced by phosphate starvation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 3, p. 896–901, mar. 1998.
- GRAY, G. L.; BERKA, R. M.; VASIL, M. L. Phospholipase C regulatory mutation of *Pseudomonas aeruginosa* that results in constitutive synthesis of several phosphate-repressible proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 150, n. 3, p. 1221–1226, jun. 1982.
- GRAY, M. J.; JAKOB, U. Oxidative stress protection by polyphosphate — new roles for an old player. **Current Opinion in Microbiology**, v. 24, p. 1–6, abr. 2015.
- GRAY, M. J. et al. Polyphosphate is a primordial chaperone. **Molecular Cell**, v. 53, n. 5, p. 689–699, mar. 2014.
- GREEN, S. K. et al. Agricultural plants and soil as a reservoir for *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 987–991, dez. 1974.
- GRIFFITH, K. L.; WOLF JR., R. E. Measuring β -galactosidase activity in bacteria: cell growth, permeabilization, and enzyme assays in 96-well arrays. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, n. 1, p. 397–402, jan. 2002.
- GRILLO-PUERTAS, M. et al. Copper tolerance mediated by polyphosphate degradation and low-affinity inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. **BMC Microbiology**, v. 14, n. 1, p. 72, mar. 2014.
- HAN, J. S. et al. PhoB-dependent transcriptional activation of the *iciA* gene during starvation for phosphate in *Escherichia coli*. **Molecular & General Genetics**, v. 262, n. 3, p. 448–452, out. 1999.

- HANCOCK, R. E. R.; POOLE, K.; BENZ, R. Outer membrane protein P of *Pseudomonas aeruginosa* regulation by phosphate deficiency and formation of small anion-specific channels in lipid bilayer membranes. **Journal of Bacteriology**, v. 150, n. 2, p. 730–738, 1982.
- HANCOCK, R. E. R.; RAFFLE, V. J. V.; NICAS, T. I. T. Involvement of the outer membrane in gentamicin and streptomycin uptake and killing in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 19, n. 5, p. 777–785, maio 1981.
- HARDOYO et al. Production and release of polyphosphate by a genetically engineered strain of *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 60, n. 10, p. 3485–3490, out. 1994.
- HIGGINS, C. F. et al. A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. **Nature**, v. 298, n. 5876, p. 760–762, ago. 1982.
- HIRAISHI, A.; MORISHIMA, Y. Capacity for polyphosphate accumulation of predominant bacteria in activated-sludge showing enhanced phosphate removal. **Journal of Fermentation and Bioengineering**, v. 69, n. 6, p. 368–371, 1990.
- HOANG, T. T. et al. A broad-host-range Flp-FRT recombination system for site-specific excision of chromosomally-located DNA sequences: application for isolation of unmarked *Pseudomonas aeruginosa* mutants. **Gene**, v. 212, n. 1, p. 77–86, maio 1998.
- HOCH, J. A.; SILHAVY, T. J. **Two-component Signal Transduction**. Herndon, Virginia, U.S.A: ASM Press, 1995. (American Society Mic Series).
- HORAZDOVSKY, B. F. B.; HOGG, R. W. R. High-affinity L-arabinose transport operon. Gene product expression and mRNAs. **Journal of Molecular Biology**, v. 197, n. 1, p. 27–35, set. 1987.
- HSIEH, Y.-J.; WANNER, B. L. Global regulation by the seven-component Pi signaling system. **Current Opinion in Microbiology**, p. 1–6, fev. 2010.
- ISHIGE, K. et al. The polyphosphate kinase gene of *Pseudomonas aeruginosa*. **DNA Research**, v. 5, n. 3, p. 157–162, jun. 1998.
- ISHIGE, K.; ZHANG, H.; KORNBERG, A. Polyphosphate kinase (PPK2), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 26, p. 16684–16688, dez. 2002.
- JUNG, S. **Two types of transcriptional controls on polyphosphate kinase (PPK) gene promoters in different bacteria**. Tese (Doutorado) — Purdue University, 2008.
- JUNG, S. et al. Effect of purine limitation caused by an amidophosphoribosyl transferase (*purF*) mutation on polyphosphate kinase 1 (*ppk1*) gene expression. **Genes & Genomics**, v. 34, n. 1, p. 27–34, jan. 2012.
- KATO, J. et al. Genetic improvement of *Escherichia coli* for enhanced biological removal of phosphate from wastewater. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 59, n. 11, p. 3744–3749, nov. 1993.

KATO, J. J. et al. Cloning and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene involved in the negative regulation of phosphate taxis. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 18, p. 5874–5877, set. 1994.

_____. Cloning, sequence and characterization of the polyphosphate kinase-encoding gene (*ppk*) of *Klebsiella aerogenes*. **Gene**, v. 137, n. 2, p. 237–242, dez. 1993.

KIELHOFNER, M. et al. Life-threatening *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with human immunodeficiency virus infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 14, n. 2, p. 403–411, fev. 1992.

KIM, H. Y. et al. Alginate, inorganic polyphosphate, GTP and ppGpp synthesis co-regulated in *Pseudomonas aeruginosa*: implications for stationary phase survival and synthesis of RNA/DNA precursors. **Molecular Microbiology**, v. 27, n. 4, p. 717–725, fev. 1998.

KIRCHMAN, D. L. The uptake of inorganic nutrients by heterotrophic bacteria. **Microbial Ecology**, v. 28, n. 2, p. 255–271, set. 1994.

KORNBERG, A.; KORNBERG, S. R.; SIMMS, E. S. Metaphosphate synthesis by an enzyme from *Escherichia coli*. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 20, n. 1, p. 215–227, 1956.

KORNBERG, S. R. Adenosine triphosphate synthesis from polyphosphate by an enzyme from *Escherichia coli*. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 26, n. 2, p. 294–300, 1957.

KORTELAND, J.; DEGRAAFF, P.; LUGTENBERG, B. PhoE protein pores in the outer-membrane of *Escherichia coli* K-12 not only have a preference for Pi and Pi-containing solutes but are general anion-preferring channels. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 778, n. 2, p. 311–316, 1984.

KORTELAND, J.; TOMMASSEN, J.; LUGTENBERG, B. PhoE protein pore of the outer membrane of *Escherichia coli* K12 is a particularly efficient channel for organic and inorganic phosphate. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 690, n. 2, p. 282–289, 1982.

KULAEV, I.; VAGABOV, V.; KULAKOVSKAYA, T. **The Biochemistry of Inorganic Polyphosphates**. Southern Gate Chichester, West Sussex, England: Wiley, 2005. (Wiley InterScience online books).

KURIOKA, S.; LIU, P. V. Effect of the hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa* on phosphatides and on phospholipase C activity. **Journal of Bacteriology**, v. 93, n. 2, p. 670–674, fev. 1967.

KURODA, A.; KORNBERG, A. Polyphosphate kinase as a nucleoside diphosphate kinase in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 2, p. 439–442, jan. 1997.

KURODA, A. et al. Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 34, p. 21240–21243, ago. 1997.

_____. Inorganic polyphosphate kinase is required to stimulate protein degradation and for adaptation to amino acid starvation in *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 25, p. 14264–14269, dez. 1999.

LEE, D. G. et al. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence is combinatorial. **Genome biology**, v. 7, n. 10, p. R90, 2006.

LEE, K. et al. Overexpression of outer membrane protein OprT and increase of membrane permeability in *phoU* mutant of toluene-tolerant bacterium *Pseudomonas putida* GM730. **The Journal of Microbiology**, v. 47, n. 5, p. 557–562, out. 2009.

LI, Y.; ZHANG, Y. PhoU is a persistence switch involved in persister formation and tolerance to multiple antibiotics and stresses in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 2092–2099, maio 2007.

LIN-LIN, B. et al. Phosphorus accumulation by bacteria isolated from a continuous-flow two-sludge system. **Journal of Environmental Sciences**, v. 19, n. 4, p. 391–395, 2007.

LIU, P. V. The roles of various fractions of *Pseudomonas aeruginosa* in its pathogenesis: II. Effects of lecithinase and protease. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 116, n. 1, p. 112–116, fev. 1966.

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, abr. 1991.

_____. Nucleotide sequence of the *phoR* gene, a regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**, v. 192, n. 3, p. 549–556, jan. 1986.

_____. Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*. Activation of *pstS* transcription by PhoB protein *in vitro*. **Journal of Molecular Biology**, v. 203, n. 1, p. 85–95, set. 1988.

MAKINO, K. K. et al. Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. **Journal of Molecular Biology**, v. 210, n. 3, p. 551–559, dez. 1989.

MCCLEARY, W. R. The activation of PhoB by acetylphosphate. **Molecular Microbiology**, v. 20, n. 6, p. 1155–1163, jun. 1996.

MCCLEARY, W. R.; STOCK, J. B. Acetyl phosphate and the activation of two-component response regulators. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 50, p. 31567–31572, dez. 1994.

MILLER, J. H. **A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia Coli and Related Bacteria**. Los Angeles, California, U.S.A: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.

MIYAKE, T. et al. The gene for an exopolyphosphatase of *Pseudomonas aeruginosa*. **DNA Research**, v. 6, n. 2, p. 103–108, abr. 1999.

MONDS, R. D. et al. Conservation of the Pho regulon in *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1910–1924, mar. 2006.

- MOROHOSHI, T. et al. Accumulation of inorganic polyphosphate in *phoU* mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. strain PCC6803. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 4107–4110, 2002.
- MUDA, M.; RAO, N. N.; TORRIANI, A. Role of PhoU in phosphate transport and alkaline phosphatase regulation. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 24, p. 8057–8064, dez. 1992.
- MULLER, M. Pyocyanin induces oxidative stress in human endothelial cells and modulates the glutathione redox cycle. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 11, p. 1527–1533, dez. 2002.
- MURATA, K. et al. Polyphosphate kinase: distribution, some properties and its application as an ATP regeneration system (microbiology & fermentation industry). **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1471–1477, jun. 1988.
- NAKATA, A.; AMEMURA, M.; SHINAGAWA, H. Regulation of the phosphate regulon in *Escherichia coli* K-12: regulation of the negative regulatory gene *phoU* and identification of the gene product. **Journal of Bacteriology**, v. 159, n. 3, p. 979–985, set. 1984.
- NEIDHARDT, F. C. ***Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology 2**. Washington D.C., U.S.A: American Society for Microbiology, 1996.
- NIKATA, T. et al. Molecular analysis of the phosphate-specific transport (*pst*) operon of *Pseudomonas aeruginosa*. **Molecular & General Genetics**, v. 250, n. 6, p. 692–698, abr. 1996.
- OHTAKE, H. et al. Genetic approach to enhanced biological phosphorus removal. **Water Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 185–192, 1994.
- PODBIELSKI, A. et al. Molecular characterization of group A streptococcal (GAS) oligopeptide permease (Opp) and its effect on cysteine protease production. **Molecular Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 1087–1099, set. 1996.
- RAHME, L. G. et al. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. **Science**, v. 268, n. 5219, p. 1899–1902, jun. 1995.
- RAO, N. N.; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 5, p. 1394–1400, mar. 1996.
- RAO, N. N.; LIU, S.; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 8, p. 2186–2193, abr. 1998.
- RAO, N. N.; ROBERTS, M. F.; TORRIANI, A. Amount and chain length of polyphosphates in *Escherichia coli* depend on cell growth conditions. **Journal of Bacteriology**, v. 162, n. 1, p. 242–247, abr. 1985.
- RASHID, M. H.; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 9, p. 4885–4890, abr. 2000.

- RASHID, M. H.; RAO, N. N.; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 1, p. 225–227, jan. 2000.
- RASHID, M. H. et al. Polyphosphate kinase is essential for biofilm development, quorum sensing, and virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 17, p. 9636–9641, ago. 2000.
- REHM, B. H. A. **Pseudomonas: Model Organism, Pathogen, Cell Factory**. Germany: Wiley, 2008.
- ROBINSON, N. A.; WOOD, H. G. Polyphosphate kinase from *Propionibacterium shermanii*. Demonstration that the synthesis and utilization of polyphosphate is by a processive mechanism. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 10, p. 4481–4485, abr. 1986.
- ROBINSON, N. A. N.; CLARK, J. E. J.; WOOD, H. G. H. Polyphosphate kinase from *Propionibacterium shermanii*. Demonstration that polyphosphates are primers and determination of the size of the synthesized polyphosphate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 11, p. 5216–5222, abr. 1987.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, New York, U.S.A: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SCHWEIZER, H.; BOOS, W. Characterization of the *ugp* region containing the genes for the *phoB* dependent sn-glycerol-3-phosphate transport system of *Escherichia coli*. **Molecular & General Genetics**, v. 197, n. 1, p. 161–168, 1984.
- SHI, W.; ZHANG, Y. PhoY2 but not PhoY1 is the PhoU homologue involved in persisters in *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 6, p. 1237–1242, jun. 2010.
- SHIBA, T. et al. Inorganic polyphosphate and the induction of *rpoS* expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 21, p. 11210–11215, out. 1997.
- SILBY, M. W.; NICOLL, J. S.; LEVY, S. B. Requirement of polyphosphate by *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 for competitive fitness and heat tolerance in laboratory media and sterile soil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 12, p. 3872–3881, jun. 2009.
- SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. **Nature Biotechnology**, v. 1, n. 9, p. 784–791, nov. 1983.
- SPIRA, B. et al. Alternative promoters in the *pst* operon of *Escherichia coli*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 284, n. 6, p. 489–498, out. 2010.
- SPIRA, B. B.; SILBERSTEIN, N. N.; YAGIL, E. E. Guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 14, p. 4053–4058, jul. 1995.

- 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, n. 21, p. 6797–6809, nov. 1993.
- STINSON, M. W.; HAYDEN, C. Secretion of phospholipase C by *Pseudomonas aeruginosa*. **Infection and Immunity**, v. 25, n. 2, p. 558–564, ago. 1979.
- STOVER, C. K. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. **Nature**, v. 406, n. 6799, p. 959–964, 2000.
- STREICHAN, M.; GOLECKI, J. R.; SCHÖN, G. Polyphosphate-accumulating bacteria from sewage plants with different processes for biological phosphorus removal. **FEMS Microbiology Letters**, v. 73, n. 2, p. 113–124, 1990.
- STREIT, S. et al. Northern blot analysis for detection and quantification of RNA in pancreatic cancer cells and tissues. **Nature Protocols**, v. 4, n. 1, p. 37–43, 2009.
- STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **Journal of Molecular Biology**, v. 189, n. 1, p. 113–130, maio 1986.
- TORRIANI, A. Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatases by *Escherichia coli*. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 38, p. 460–469, mar. 1960.
- TORRIANI-GORINI, A.; YAGIL, E.; SILVER, S. **Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology**. Washington D.C., U.S.A: ASM Press, 1994.
- TURNER, B. L.; FROSSARD, E.; BALDWIN, D. S. **Organic Phosphorus in the Environment**. Cambridge, MA, U.S.A: CABI Pub., 2005.
- VEEN, H. W. van et al. Generation of a proton motive force by the excretion of metal-phosphate in the polyphosphate-accumulating *Acinetobacter johnsonii* strain 210A. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 47, p. 29509–29514, nov. 1994.
- 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, abr. 1987.
- WANG, C. et al. PhoY2 of *Mycobacteria* is required for metabolic homeostasis and stress response. **Journal of Bacteriology**, v. 195, n. 2, p. 243–252, jan. 2013.
- WENNER, N. et al. NrsZ: a novel, processed, nitrogen-dependent, small non-coding RNA that regulates *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence. **Environmental Microbiology**, v. 16, n. 4, p. 1053–1068, out. 2013.
- WENTZEL, M. C. et al. Metabolic behavior of *Acinetobacter* spp in enhanced biological phosphorus removal -a biochemical-model. **Water SA**, v. 12, n. 4, p. 209–224, out. 1986.
- WHITE, A. K.; METCALF, W. W. Microbial metabolism of reduced phosphorus compounds. **Annual Review of Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 379–400, out. 2007.

- WU, H. H. et al. Cloning and characterization of *Pseudomonas putida* genes encoding the phosphate-specific transport system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 87, n. 3, p. 273–279, jan. 1999.
- 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, jun. 2009.
- YE, J. et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, p. 134–145, 2012.
- YEOMAN, S. et al. The removal of phosphorus during wastewater treatment: a review. **Environmental Pollution**, v. 49, n. 3, p. 183–233, jan. 1988.
- ZABORIN, A. et al. Red death in *Caenorhabditis elegans* caused by *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 15, p. 6327–6332, abr. 2009.
- ZAGO, A. A.; CHUGANI, S. S.; CHAKRABARTY, A. M. A. Cloning and characterization of polyphosphate kinase and exopolyphosphatase genes from *Pseudomonas aeruginosa* 8830. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 5, p. 2065–2071, maio 1999.
- ZHANG, H.; ISHIGE, K.; KORNBERG, A. A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 26, p. 16678–16683, dez. 2002.
- ZHANG, X.; BREMER, H. Control of the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter strength by ppGpp. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 19, p. 11181–11189, maio 1995.
- ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3406–3415, jul. 2003.

Anexos

ANEXO A – AVALIAÇÃO DA FAIXA DE LINEARIDADE DO ESPECTROFOTÔMETRO DE MICROPLACAS EPOCH™

Técnicas de análises química que utilizam a luz como ferramenta para a determinação de concentrações químicas são amplamente empregadas. Nessas análises, o parâmetro mais indicado para ser empregado é absorbância, dado que, de acordo com a lei de Beer, ela é diretamente proporcional à concentração da espécie analisada. Contudo, essa relação apresenta desvios do modelo ideal, por razões químicas e técnicas, valendo apenas para soluções diluídas. Dessa forma, em qualquer experimento e equipamento utilizados para relacionar a absorbância com a concentração de uma espécie determinada, a faixa de linearidade desses dois parâmetros sempre deve ser tomada em consideração.

De acordo com as informações fornecidas pelo fabricante, o espectrofotômetro de microplacas Epoch™ possui uma linearidade nas faixas de absorbância de 0 a 2,5. Apesar disso, essa faixa de linearidade foi avaliada experimentalmente. Nessa avaliação, foram utilizados os comprimentos de onda empregados nos ensaios de β -galactosidase: 600 e 420 nm.

(a) Faixa de linearidade avaliada no comprimento de onda de 420 nm.

(b) Faixa de linearidade avaliada no comprimento de onda de 600 nm.

Figura 25 – **Determinação da faixa de linearidade do espectrofotômetro de microplacas Epoch™ nos comprimentos de onda de 420 e 600 nm.** Foram preparadas diluições seriadas a partir de uma solução de ONP e de uma cultura de PA14 crescida *overnight* em meio LB. Os valores de DO_{420} e de DO_{600} foram então determinados no espectrofotômetro de placas.

Como observado na Figura 25, existe uma relação linear entre a DO_{420} e a concentração de o-nitrofenol em toda a faixa de absorbância avaliada, ou seja, até uma DO_{420}

de aproximadamente 3,0. Essa linearidade, curiosamente, encontra-se em uma faixa mais ampla que a especificada pelo fabricante. Entretanto, a relação linear entre a DO_{600} e a densidade celular foi bem mais estreita, sendo $<0,25$. Portanto, nas leituras espectrofotométricas feitas no leitor de microplacas, sempre que necessário, as amostras foram diluídas para trabalhar nas faixas de linearidade descritas anteriormente: $DO_{420} < 3$ e $DO_{600} < 0,25$.

Em espectrofotometria “vertical”, em que as amostras contidas em uma microplaca são atravessadas de maneira vertical pelo feixe de luz, o caminho óptico da luz é definido pelo volume da amostra no poço. Assim sendo, volumes ligeiramente diferentes em cada poço, devido a erros inerentes à pipetagem, podem gerar caminhos ópticos diferentes por cada amostra. Isso poderia acarretar erros nas absorbâncias reportadas pelo equipamento. Em consequência, a opção de *correção automática do caminho óptico* no leitor de microplacas foi usada em todas as leituras espectrofotométricas. Nessa correção, os valores de absorbância de cada amostra são normalizados pelo equipamento a um valor de caminho óptico de 1 cm. Além de tudo, essa correção também faz possível a comparação de dados de β -galactosidase obtidos pelo ensaio clássico, que emprega um espectrofotômetro com cubeta de caminho óptico padrão de 1 cm, com os dados obtidos em microplaca de 96 poços.

ANEXO B – COMPARAÇÃO DO CRESCIMENTO DE CULTURAS DE PA14 EM TUBO DE ENSAIO E EM MICROPLACA DE 24 POÇOS DE 2,2 ML

O crescimento de PA14 em microplacas poderia gerar condições de crescimento subótimas devido a uma possível baixa oxigenação. Para avaliar essa possibilidade, culturas de PA14 foram cultivadas em tubo de ensaio e em microplaca de 24 poços.

Como observado na Figura 26 a taxa de crescimento e o rendimento celular das culturas crescidas tanto em tubo de ensaio como em microplaca de 24 poços foi o mesmo nas condições testadas. Dessa forma, todas as culturas avaliadas por ensaios de β -galactosidase foram crescidas em placas de 24 poços de 2,2 ml.

Figura 26 – Comparação do crescimento de culturas de *P. aeruginosa* PA14 crescidas em tubo de ensaio e em microplaca de 24 poços de 2,2 ml. As bactérias foram cultivadas em meio DPMM +Pi por 10 horas a 37°C sob agitação de 170 rpm. A DO₆₀₀ foi determinada a cada 2 horas em um espectrofotômetro de microplacas. Os dados representam o resultado de um único experimento.