

**DANIELA ELEUTERIO DA LUZ**

**ESTUDO DO PAPEL DO SISTEMA DE CAPTAÇÃO DE FOSFATO  
INORGÂNICO (Pst) NA FISIOLOGIA E PATOGÊNESE DE  
*Streptococcus mutans***

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

São Paulo  
2010

**DANIELA ELEUTERIO DA LUZ**

**ESTUDO DO PAPEL DO SISTEMA DE CAPTAÇÃO DE FOSFATO  
INORGÂNICO (P<sub>st</sub>) NA FISIOLOGIA E PATOGÊNESE DE  
*Streptococcus mutans***

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

Área de Concentração: Microbiologia

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Rita de Cássia  
Café Ferreira.

São Paulo  
2010

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

Luz, Daniela Eleuterio da.

Estudo do papel do sistema de captação de fosfato inorgânico (Pst) na fisiologia e patogênese de *Streptococcus mutans* / Daniela Eleuterio da Luz. -- São Paulo, 2010.

Orientador: Rita de Cassia Café Ferreira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Fisiologia bacteriana.

Versão do título para o inglês: Study of the role of inorganic phosphate uptake system (Pst) in the physiology and pathogenesis of *Streptococcus mutans*.

Descritores: 1. Sistema Pst 2. *Streptococcus mutans* 3. Importação de Pi 4. ABC transportador 5. Fosfato 6. PstS I. Ferreira, Rita de Cassia Café II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0181/2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Daniela Eleuterio da Luz.

Título da Dissertação: Estudo do papel do sistema de captação de fosfato inorgânico (Pst) na fisiologia e patogênese de *Streptococcus mutans*.

Orientador(a): Rita de Cassia Café Ferreira.

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

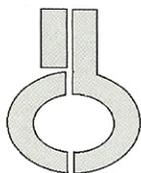
**Aprovado(a)**

**Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob n° **102** nas fls. **61** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Rita de Cássia Café Ferreira, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Estudo do papel do sistema de captação de fosfato inorgânico (Pst) na patogênese de Streptococcus mutans**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Daniela Eleutério da Luz, Roberto Nepomuceno de Souza Lima**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **12.02.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 13 de fevereiro de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA  
Coordenador  
CEEA - ICB/USP

Prof. Dra. PATRÍCIA CASTELÚCCI  
Secretária  
CEEA - ICB/USP

Este trabalho foi realizado sob orientação da Prof Dra Rita de Cássia Café Ferreira no laboratório de genética e fisiologia bacteriana no Departamento de Microbiologia do instituto de Ciências Biomédicas da Unievrside de São Paulo, com apoio financeiro do CNPQ e FAPESP.

Ao meu marido William pelo amor, incentivo,  
estímulo, e paciência durante todos os  
anos em que estamos juntos.

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer primeiramente à Profa. Dra. Rita de Cássia Café Ferreira, pela oportunidade de estágio e consequente mestrado em seu laboratório, pela confiança, pela orientação e paciência durante a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luis Carlos de Souza Ferreira pela colaboração no trabalho, pelos conselhos e discussões sempre muito produtivas, pela paciência e disponibilidade que contribuíram muito para a realização deste trabalho.

Ao Prof Beny Spira pela ajuda nos ensaios de radioativos, por ceder seu laboratório, pelas discussões e pela colaboração no trabalho.

Ao amigo e colega de laboratório Roberto Lima, pela amizade, parceria, por me ensinar a dar os primeiros passos no laboratório durante o estágio, por me ajudar muito durante o desenvolvimento deste projeto, pelas discussões, conversas, conselhos e tempo compartilhado que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho. Não caberia aqui tudo que tenho a lhe agradecer.

Às amigas e colegas de laboratório Aline, Priscila, Karine, Débora, Carolina e Loren, pela amizade, pelas conversas científicas e outras nem tanto, pelas risadas, pelos conselhos, enfim, por deixar o ambiente de trabalho mais alegre.

Aos amigos e colegas de laboratório, em especial, Jaime, Bruna, Rafael, Vinícius, Cariri e Renata pela amizade, conversas científicas, conselhos e dicas que ajudaram muito na realização do trabalho.

A todos os funcionários do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas.

Ao funcionários do biotério do Departamento de Parasitologia pela ajuda e auxílio com os experimentos em camundongos.

Ao meu marido William por ter segurado as pontas durante o tempo sem bolsa, pelo apoio, pela paciência, pelo carinho e amor, pela compreensão dos momentos estressantes do trabalho, enfim, por tudo que ele fez e faz por mim desde sempre.

Às mulheres da minha vida, minha mãe Sandra, minha irmã Thalissa e minha avó Lourdes que ficaram no Paraná, por aguentar a saudade, pelo apoio, amor, carinho, por simplesmente fazerem parte da minha vida, não seria nada sem elas.

E a todos que de uma maneira direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

“A imaginação é mais importante que o conhecimento” (Albert Einstein)

## RESUMO

LUZ, D. E. **Estudo do papel do sistema de captação de fosfato inorgânico (Pst) na fisiologia e patogênese de *Streptococcus mutans***. 2010. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

O fosfato inorgânico é um composto essencial por estar relacionado com diversos processos metabólicos e biossíntese de moléculas relevantes à sobrevivência celular. Em bactéria são conhecidos dois tipos principais de transportadores específicos de fosfato inorgânico, o sistema Pit, de baixa afinidade, e o sistema Pst de alta afinidade, um ABC transportador, ativado sob carência de fosfato extracelular. O papel deste sistema na fisiologia e patogênese de *Streptococcus mutans*, o principal agente etiológico da cárie dental, foi estudado neste trabalho. Os genes que codificam o sistema Pst de *S. mutans* UA159, estão organizados em um óperon policistrônico (*pstS*, *pstC1*, *pstC*, *pstB*, *smu.1134* e *phoU*). A análise das sequências de aminoácidos das proteínas do sistema Pst de *S. mutans* com ortólogos do gênero *Streptococcus* demonstrou maior identidade com bactérias da cavidade oral. Análise de prevalência do gene *pstS*, que codifica a proteína ligadora, demonstrou conservação entre todas as cepas laboratoriais e de origem clínicas avaliadas. A deleção de *pstS* reduziu a capacidade de incorporação de ortofosfato que se refletiu na diminuição da taxa de replicação celular em meios com diferentes concentrações de fosfato inorgânico. A mutação também reduziu a capacidade da bactéria em aderir à superfícies abióticas e diminuiu a hidrofobicidade de superfície, além de aumentar a resistência intrínseca a pH ácido. No entanto, não houve alteração na frequência de transformação bacteriana. Por fim, o gene *pstS* de *S. mutans* foi clonado, expresso e a proteína purificada utilizada para obter anticorpos que inibiram o crescimento de *S. mutans in vitro*. Deste modo, sugere-se que o sistema Pst seja relevante na fisiologia e patogênese de *S. mutans*.

**Palavras-chave:** Sistema Pst. *Streptococcus mutans*. Importação de Pi. ABC transportador. Fosfato. PstS.

## ABSTRACT

LUZ, D. E. **Study of the role of inorganic phosphate uptake system (Pst) in the physiology and pathogenesis of *Streptococcus mutans***. 2010. 87 f. Master thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Inorganic phosphate is an essential compound related for several metabolic pathways and for the biosynthesis of molecules relevant to cellular survival. Bacteria are known to possess two main specific inorganic phosphate transporters types; the low-affinity Pit system, and the high affinity Pst system, an ABC transporter, activated by phosphate starvation. The aim of this work was to study the role of Pst system in the physiology and pathogenesis of *Streptococcus mutans*, the main etiological agent of dental caries. The *S. mutans* UA159 Pst system genes are organized in a polycistronic operon (*pstS*, *pstC1*, *pstC*, *pstB*, *smu.1134* and *phoU*). The amino acid sequence analysis of Pst proteins of *S. mutans* and orthologs found among the *Streptococcus* genus, showed that highest identity values are found in oral cavity bacteria. The PstS binding protein was present in all tested *S. mutans* clinical and laboratory strains. The *pstS* mutant showed a reduced orthophosphate uptake which led to growth deficiency in different phosphate concentrations. The gene deletion also caused a reduction in bacteria adherence to abiotic surfaces, a lower cell surface hydrophobicity and a small increase in acid resistance. Otherwise, there was no change in the bacterial transformation frequency. Finally, the *S. mutans pstS* gene was cloned, expressed and the purified protein was used to obtain antibodies that inhibited the *in vitro* growth of *S. mutans*. Taking together, these results suggest that the Pst transport system plays an important role in physiology and pathogenesis *S. mutans*.

**Keywords:** *Streptococcus mutans*. Pst System. ABC transporters. Phosphate. PstS.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC – *ATP-binding cassette*

ATP – *Adenosine Tri-Phosphate* (Tri Fosfato de Adenosina)

BHI- *Brain Heart Infusion* (Infusão de Cérebro e Coração)

Bis - N-N'metileno-Bis-acrilamida

BLAST- *Basic Local Alignment Search Tool* (Ferramenta de Busca de Alinhamento Básico Local)

BM- *Biofilm media* (Meio Biofilme)

CIAP - *Calf Intestinal, Alkaline Phosphatase*

Cm – Cloranfenicol

CSP-*Competence Stimulating Peptide* (Peptídeo Estimulador de Competência)

CTAB - *Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide*

DIM- Domínio Integral de Membrana

DLN- Domínio de Ligação de Nucleotídeos

DO – Densidade Óptica

EDTA - *Ethylenediamine tetraacetic acid*

Em – Eritromicina

FPLC - *Fast Protein Liquid Chromatography* (Cromatografia de proteína líquida)

GBP- Proteínas ligadoras de glucanos

GlpT- *sn*-glicerol-3-fosfato

GTF- Glicosiltransferases

IMAC – Imobilização Metálica

IPTG - *Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside*

KEGG- *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (Enciclopédia de Kyoto de genes e genomas)

Km- Canamicina

LB – Luria Bertani

LS- Domínio Ligador de Substrato

MOPS - *3-N-morpholino propanesulfonic acid*

NCBI- *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)

PBS - *Phosphate Buffered Saline* (Tampão fosfato salina)  
PCR – *Polymerase Chain Reaction* (Reação da Cadeia da Polimerase)  
PECs- Polissacarídeos extracelulares  
Pho- Regulon Fosfato  
Pi- Fosfato Inorgânico  
Pit- *Inorganic Phosphate Transport* (Transporte de Fosfato Inorgânico)  
PMSF - *phenylmethanesulfonylfluoride*  
PSI- *Phosphate Starvation-Induced* (Induzido por carência de fosfato)  
Pst- *Phosphate Specific Transport* (Transporte Específico de Fosfato)  
PUM- *Phosphate/Urea/Magnesium buffer* (Tampão Fosfato/ Uréia/  
Magnésio)  
ORF- *Open reading frame* (Quadro de leitura aberto)  
SDS - *Sodium Dodecyl Sulphate*  
TAE - Tris/Acetato/EDTA  
TBS - *Tris Buffered Saline* (Tampão Tris salina)  
TE- Tris/EDTA  
Tet - Tetraciclina  
UhpT- Glicose-6-fosfato  
X-gal - 5-bromo-4-chloro-3-indolil-b-D-galactopiranosídeo

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Representação esquemática de um transportador ABC em bactéria gram-positiva .....	<b>22</b>
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática de transportadores de fosfato em <i>E. coli</i> .....	<b>23</b>
<b>Figura 3.</b> Organização do óperon <i>pst</i> em <i>E. coli</i> .....	<b>25</b>
<b>Figura 4.</b> Modelo esquematizado do sistema Pst em <i>E. coli</i> .....	<b>25</b>
<b>Figura 5.</b> Organização do óperon <i>pst</i> em <i>S. mutans</i> UA159.....	<b>49</b>
<b>Figura 6.</b> Análise da organização do óperon <i>pst</i> em diferentes espécies de <i>Streptococcus</i> .....	<b>50</b>
<b>Figura 7.</b> Árvore não-enraizada com valores de identidade compartilhados pelas proteínas PstS codificadas por 14 espécies de bactérias.....	<b>52</b>
<b>Figura 8.</b> Detecção do gene <i>pstS</i> em diferentes linhagens de <i>S. mutans</i> .....	<b>53</b>
<b>Figura 9.</b> Representação esquemática da mutagênese do gene <i>pstS</i> de <i>S. mutans</i> .....	<b>54</b>
<b>Figura 10.</b> Amplificação dos genes <i>gtfβ</i> e <i>pstS</i> nas cepas selvagem e mutada de <i>S. mutans</i> .....	<b>55</b>
<b>Figura 11.</b> Internalização de ortofosfato ( <sup>32</sup> P) em linhagens de <i>S. mutans</i> .....	<b>56</b>
<b>Figura 12.</b> Curvas de crescimento das linhagens UA159 e DL1 de <i>S. mutans</i> em meio FMC com diferentes concentrações de fosfato.....	<b>57</b>
<b>Figura 13.</b> Eficiência de transformação das linhagens UA159 e DL1 de <i>S. mutans</i> .....	<b>58</b>
<b>Figura 14.</b> Adesão das linhagens UA159 e DL1 <i>S. mutans</i> .....	<b>59</b>
<b>Figura 15.</b> Perfil de hidrofobicidade das linhagens UA159 e DL1 de <i>S. mutans</i> .....	<b>60</b>
<b>Figura 16.</b> Sensibilidade à acidez das linhagens UA159 e DL1 de <i>S. mutans</i> .....	<b>61</b>
<b>Figura 17.</b> Clonagem do gene <i>pstS</i> no vetor pGEM-Teasy.....	<b>62</b>

<b>Figura 18.</b> Construção do plasmídeo pQpstS a partir da subclonagem do gene <i>pstS</i> no vetor pQE-30.....	<b>63</b>
<b>Figura 19.</b> Construção do plasmídeo pETpstS, obtido com a inserção do gene <i>pstS</i> no vetor pET-28a.....	<b>64</b>
<b>Figura 20.</b> Construção do plasmídeo pHT08pstS, obtido com a inserção do gene <i>pstS</i> de <i>S. mutans</i> no vetor pHT08.....	<b>65</b>
<b>Figura 21.</b> Imunodeteccção da proteína recombinante PstS de <i>S. mutans</i> expressa por linhagem de <i>B. subtilis</i> .....	<b>66</b>
<b>Figura 22.</b> Purificação da proteína recombinante PstS de <i>S. mutans</i> ..	<b>67</b>
<b>Figura 23.</b> Purificação da proteína recombinante PstS por eletroeluição.....	<b>67</b>
<b>Figura 24.</b> Imunodeteccção com anticorpos anti-PstS monoespecíficos	<b>68</b>
<b>Figura 25.</b> Efeito do soro anti-PstS no crescimento da linhagem de <i>S. mutans</i> UA159.....	<b>69</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Linhagens de bactérias utilizadas .....	<b>33</b>
<b>Tabela 2</b> - Vetores e plasmídeos utilizados .....	<b>35</b>
<b>Tabela 3</b> - Oligonucleotídeos utilizados .....	<b>36</b>
<b>Tabela 4</b> - Massas moleculares preditas das proteínas do sistema Pst e análise de similaridade dentre os ortólogos de <i>Streptococcus</i> ....	<b>51</b>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
<b>1.1 <i>Streptococcus mutans</i></b> .....	<b>19</b>
<b>1.2 Transportadores de fosfato inorgânico em bactérias</b> .....	<b>20</b>
<b>1.3 Sistema Pst de transporte de fosfato inorgânico</b> .....	<b>24</b>
<b>1.4 Pleiotropismo do sistema Pst</b> .....	<b>26</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>28</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
<b>3.1 Identificação e análise computacional do operon <i>pst</i></b> .....	<b>29</b>
3.1.1 BLAST .....	29
3.1.2 ProtParam.....	29
3.1.3 Phylip.....	30
3.1.4 SignalP 3.0.....	30
<b>3.2 Meios de cultura e soluções</b> .....	<b>30</b>
<b>3.3 Cepas, plasmídeos e oligonucleotídeos</b> .....	<b>33</b>
<b>3.4 Análise de prevalência do gene <i>pstS</i> em cepas de <i>S. mutans</i></b> .....	<b>36</b>
3.4.1 Isolamento do DNA genômico de <i>S. mutans</i> .....	36
3.4.2 Amplificação de <i>pstS</i> de <i>S. mutans</i> por PCR.....	37
<b>3.5 Construção do mutante deletado no gene <i>pstS</i></b> .....	<b>37</b>
3.5.1 Obtenção do mutante DL1.....	37
3.5.2 Transformação de <i>S. mutans</i> .....	38
<b>3.6 Caracterização do mutante DL1</b> .....	<b>38</b>
3.6.1 Experimento de internalização de fosfato radioativo ( <sup>32</sup> P).....	38
3.6.2 Curvas de crescimento em diferentes concentrações de fosfato.....	39
3.6.3 Teste de eficiência de transformação de <i>S. mutans</i> .....	39
3.6.4 Teste de aderência/produção de biofilme.....	40
3.6.5 Teste de hidrofobicidade.....	40
3.6.6 Teste de resistência a ácido.....	41
<b>3.7 Clonagem e expressão da proteína PstS</b> .....	<b>41</b>
3.7.1 Extração de DNA plasmidial. (MIDI-PREP).....	41

3.7.2 Digestão de DNA com enzimas de restrição enzimas modificadas.....	42
3.7.3 Ligação de moléculas de DNA.....	42
3.7.4 Transformação química de bactérias.....	43
3.7.5 Eletrotransformação de bactérias.....	43
3.7.6 Clonagem do gene <i>pstS</i> .....	44
3.7.7 Subclonagens do gene <i>pstS</i> em vetores de expressão.....	44
3.7.8 Indução da expressão da proteína PstS.....	45
<b>3.8 Extração e purificação da proteína PstS.....</b>	<b>45</b>
<b>3.9 Produção de anticorpos anti-PstS.....</b>	<b>46</b>
3.9.1 Imunodeteção com soro anti-PstS.....	47
<b>3.10 Efeito dos anticorpos anti-PstS sobre o crescimento de <i>S. mutans</i>.....</b>	<b>47</b>
<b>3.11 Sequenciamento de DNA.....</b>	<b>47</b>
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>49</b>
<b>4.1 Análise computacional do óperon <i>pst</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>4.2 Prevalência de <i>pstS</i> em linhagens de <i>S. mutans</i>.....</b>	<b>50</b>
<b>4.3 Papel do sistema Pst na fisiologia e patogênese de <i>S. mutans</i>.....</b>	<b>53</b>
4.3.1 Construção da linhagem DL1 ( $\Delta$ <i>pstS</i> ) de <i>S. mutans</i> .....	53
4.3.2 Efeito da mutação no gene <i>pstS</i> no crescimento e captação de fosfato em <i>S. mutans</i> .....	55
4.3.3 Efeito da deleção do gene <i>pstS</i> na frequência de transformação de <i>S. mutans</i> .....	56
4.3.4 Efeito da deleção do gene <i>pstS</i> na expressão de fatores relacionados a virulência de <i>S. mutans</i> .....	58
<b>4.4 Obtenção de anticorpos policlonais anti-PstS.....</b>	<b>61</b>
4.4.1 Construção de vetores para expressão da proteína recombinante PstS de <i>S. mutans</i> .....	61
4.4.2 Expressão da proteína PstS em <i>E. coli</i> e <i>B. subtilis</i> .....	65
4.4.3 Geração dos anticorpos policlonais anti-PstS em camundongos.....	68

4.4.4 Efeito do anticorpo anti-PstS no crescimento de <i>S. mutans</i> .....	68
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>70</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	<b>76</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 *Streptococcus mutans*

A bactéria *Streptococcus mutans* é uma eubactéria, firmicute, imóvel, anaeróbia facultativa que se apresenta na forma de cocos pertencentes à microbiota autóctone da cavidade oral (HAMADA et al., 1980). O *S. mutans* é um dos colonizadores primários do biofilme supragengival e em conjunto com algumas espécies de *Lactobacillus*, representa o principal agente infeccioso associado à cárie dental, a patologia infecciosa mais prevalente em humanos (HARDIE, 1992; VAN HOUTE, 1994). Um aspecto importante relacionado ao microambiente oral é a variação na disponibilidade de nutrientes, o que torna necessário aos microrganismos que nela habitam, o desenvolvimento de mecanismos de sobrevivência que permitam a captação de nutrientes essenciais. Essa necessidade é destacada quando da análise do genoma de *S. mutans* UA159, sequenciado em 2002 pela Universidade de Oklahoma (NC 004350), foram encontrados cerca de 280 genes - 15% do total de ORFs - codificadores de sistemas de transporte (AJDÍC et al., 2002). Os sistemas de transporte ativos da família ABC são os mais abundantes com mais de 60 transportadores, ou seja, 10% do número total de ORFs, da espécie.

Inúmeros estudos demonstram que esta bactéria possui vários fatores de virulência importantes para sua patogenicidade como: (i) sua habilidade de aderir firmemente à superfície dental; (ii) produção de ácidos a partir de um grande número de carboidratos provenientes da dieta do hospedeiro (acidogenicidade); (iii) capacidade de sobreviver e replicar em ambientes ácidos (aciduricidade) (MICHALEK et al., 1981; HAMADA et al., 1984). Entre esses, destaca-se a capacidade de aderência/produção de biofilme por se tratar do passo inicial e essencial para o desenvolvimento da cárie dental. Além de permitir o contato direto da bactéria - e por conseguinte de seus produtos metabólicos - à superfície dental, o biofilme dificulta o acesso da saliva à superfície do dente, impedindo a promoção de sua ação tamponante na presença do ácido láctico produzido por *S. mutans* (HAMADA et al., 1980). A adesão de *S. mutans* à superfície dental

envolve dois passos: o primeiro estágio, chamada de sacarose-independente é reversível - garante a interação da bactéria às proteínas salivares e macromoléculas bacterianas associadas à superfície mineralizada dos elementos dentais – e se refere à adesão a película adquirida, (BURNE, 1998). Nesta etapa, adesinas bacterianas como antígeno I/II (ou proteína SpaP, ou proteína P1) são fundamentais. O segundo estágio, sacarose-dependente, caracteriza-se pela produção de glucanos insolúveis, denominados PECs que são produzidas pelas enzimas GTF a partir de sacarose e sua interação com as adesinas GBP (HAMADA et al., 1984; BOWEN et al., 1991; CROWLEY et al., 1999; RUSSELL, 2006). A capacidade dessa bactéria em aderir à superfície dental pode ser aferida, de modo indireto *in vitro*, pela aderência a superfícies abióticas, como placas de microtitulação (BERLUTTI et al., 2004).

## **1.2 Transportadores de fosfato inorgânico em bactérias**

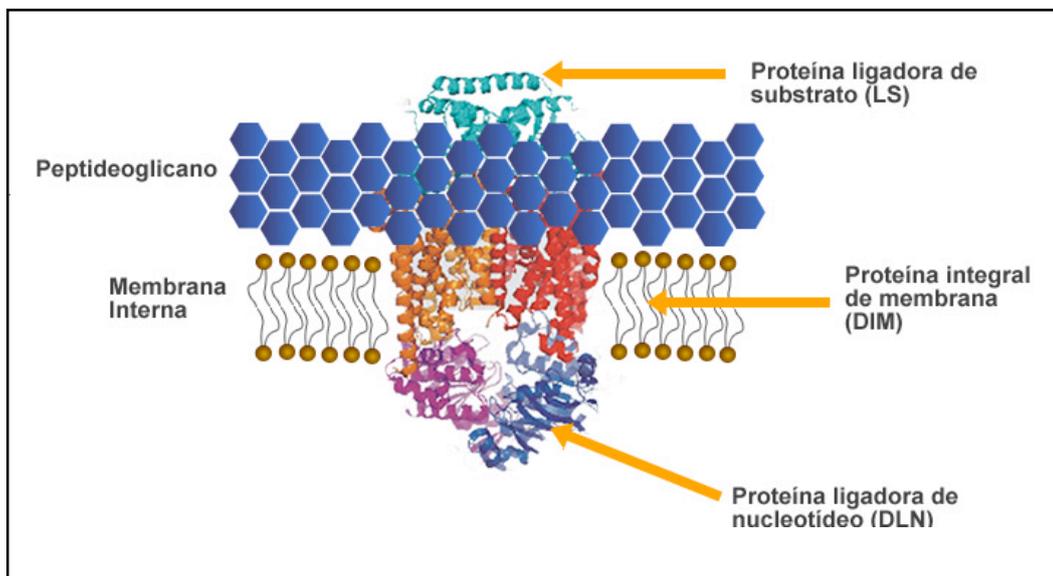
O transporte de fosfato inorgânico (Pi), em conjunto com o transporte de componentes organo-fosfatados, é essencial para o controle e regulação interna da homeostase de fosfato relacionado a fontes de energia, biossíntese de DNA, RNA e fofolípídeos (VAN VEEN et al., 1994). Os microrganismos devem acumular fósforo e nutrientes que contenham fósforo do ambiente, esses compostos devem passar pelo envelope celular antes de chegarem ao citoplasma (VAN VEEN et al., 1994). A captação de substâncias através da membrana citoplasmática, em particular de bactérias, é realizada por diferentes processos, como a difusão passiva, facilitada, ou ainda, por mecanismos de transporte ativo. Sistemas de transporte de nutrientes em bactérias, incluindo o fosfato, podem ser divididos em dois grupos: os sistemas primários e os sistemas secundários (VAN VEEN et al., 1994).

Os sistemas primários, por definição, medeiam um movimento vetorial do soluto através da membrana citoplasmática juntamente com uma reação química, são sensíveis ao choque osmótico e sua fonte de energia

vem diretamente da hidrólise de ATP, dentro deste tipo de sistemas destaca-se, os ABC transportadores.

Os transportadores do tipo ABC estão presentes nos três grandes reinos biológicos e são empregados por archea, eubactérias e eucariotos, sendo utilizados tanto para captar, como para exportar diferentes substâncias (HIGGINS, 1992; HIGGINS, 2001). Os sistemas importadores do tipo ABC são restritos às bactérias e archeas, em geral, constituem 5% dos genomas bacterianos conhecidos e são constituídos por três componentes funcionais e estruturais (Figura 1), dentre esses dois estão associados à membrana citoplasmática enquanto o terceiro mostra-se solúvel nas bactérias gram-negativas, ou associados à membrana citoplasmática nas gram-positivas (MOUTRAN et al., 2003; LINTON et al., 1998).

Os componentes associados à membrana interna são responsáveis pela formação de um poro por onde a substância será transportada, esses componentes são, em geral, formados por duas proteínas hidrofóbicas que atravessam a membrana citoplasmática, e por isso, são denominados de domínio integral de membrana (DIM) (MOUREZ et al., 1997). O segundo componente desses sistemas ABC de transporte em bactérias é representado domínios geradores de energia, que são proteínas associadas à face interna da membrana citoplasmática e ligam ATP, sendo chamadas de domínios de ligação de nucleotídeos (DLN) (YOUNG et al., 1999). O terceiro componente denominado domínio ligador de substrato (LS), é responsável pela especificidade e afinidade do sistema, sendo encontrado solúvel no periplasma de bactérias gram-negativas enquanto que em gram-positivas, são encontrados na forma de lipoproteínas ancoradas por meio de um resíduo de acil-gliceril-cisteína N-terminal à face externa da membrana citoplasmática (DASSA, 2000).

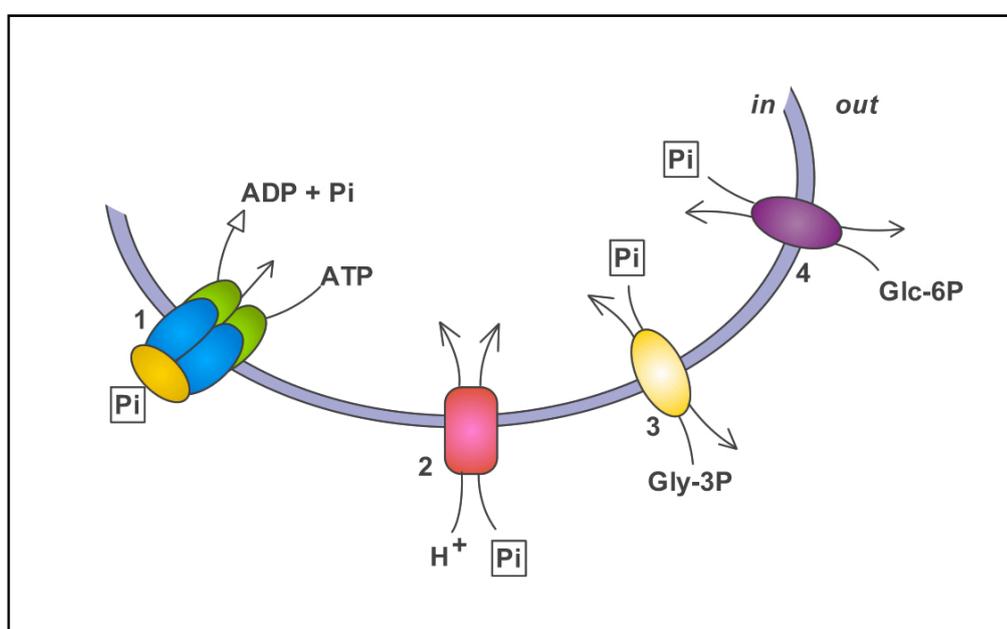


**Figura 1.** Representação esquemática de um transpotador ABC em bactéria gram-positiva. Os três domínios contituíntes de um sistema importador estão destacados.

Os sistemas secundários por sua vez, catalizam a translocação do nutriente através da membrana de maneira uniporte, simporte ou antiporte com outro soluto, sem estar associado com uma reação química, são insensíveis ao choque osmótico e utilizam o gradiente eletroquímico da membrana para extrair a energia necessária para o seu funcionamento (HAROLD, 1986). Assim, enquanto transportadores primários são intrinsecamente unidirecionais, os transportadores secundários mediam fluxo de captação ou efluxo de solutos de acordo com um gradiente eletroquímico predito (KONINGS et al., 1994).

Em *Escherischia coli* são conhecidos quatro sistemas de transporte de fosfato que podem ser classificados com base na especificidade ao substrato, bioenergética e critérios estruturais (Figura 2) (VAN VEEN, 1997). O sistema Pst e o sistema Pit são específicos para fosfato inorgânico e são controlados pelo seu movimento. Há também dois sistemas de transporte de fosfato inorgânico mediados por troca iônica, onde o fosfato inorgânico é aceito como um análogo de um organo-fosfato, como os sistemas que transporta *sn*-glicerol-3-fosfato (GlpT) e o transportador de Glicose-6-fosfato (UhpT) (LARSON, 1987; MALONEY et al., 1990). Pit, GlpT e UhpT são considerados sistemas de transporte secundários. Pit funciona como um sistema simporte  $H^+$ / soluto. GlpT e

UhpT são sistemas antiporte que acopla a acumulação de açúcares fosfatados à liberação de fosfato sob condições fisiológicas (AMBUDKAR et al., 1986; SONNA et al., 1988). Pit, GlpT e UhpT não utilizam uma proteína ligadora periplasmática e aparentemente consistem em uma única proteína transmembrânica (EIGLMEIER et al., 1987; ELVIN et al., 1986). O sistema Pst, por outro lado, opera como um mecanismo de transporte primário, sua estrutura é bem mais complexa, envolvendo várias proteínas de membrana, e também uma proteína ligadora de fosfato (SURIN et al., 1987).



**Figura 2.** Representação esquemática de transportadores de fosfato em *E. coli*. 1) Sistema de transporte específico de fosfato inorgânico (Pst); 2) Transportador de fosfato inorgânico (Pit); 3) Sistema antiporte de ligação ao fosfato *sn*-glicerol-3-Fosfato; 4) Sistema antiporte de ligação ao fosfato Glicose-6-Fosfato.

Fonte: Adaptado de Van Veen, 1997.

O transporte de íons fosfato via Pit, Pst, GlpT e UhpT em *E. coli* tem geralmente sido interpretada em termos de translocação de fosfato monobásico ou dibásico. Assim, Pst mediará a translocação de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  e  $\text{HPO}_4^{2-}$  (ROSENBERG, 1987). Os antiporters ligadores de fosfato GlpT e UhpT medeiam a troca eletroneutra de  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , ânions organo fosfatos ou ambos (MALONEY et al., 1990). Em adição, é geralmente assumido que  $\text{HPO}_4^{2-}$  é a espécie de íon fosfato que é transportado por Pit (VAN VEEN, 1997).

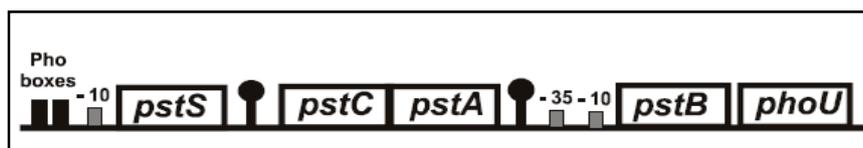
Mais recentemente, tem sido descrito em bactérias como *E. coli* e *Mycobacterium smegmatis*, um segundo sistema pertencente à família ABC com afinidade a fosfito/fosfato, regulado pela baixa concentração destes compostos, conhecido como sistema Phn, que é codificado por um óperon de três genes, possuindo grandes semelhanças com o sistema Pst, sendo sugerido substituí-lo no transporte de fosfato, quando este está ausente (GEBHARD et al., 2006; ELASHVILI et al., 1998).

### 1.3 Sistema Pst de transporte de fosfato inorgânico

O sistema Pst de transporte pertence a grande família dos ABC transportadores, e se caracteriza por possuir uma alta afinidade ao fosfato inorgânico (HIGGINS et al., 1990).

A caracterização desse transportador em *E. coli* mostrou que este é codificado por um óperon policistrônico contendo cinco genes, sendo que quatro codificam os componentes estruturais do sistema de transporte (Figura 3).

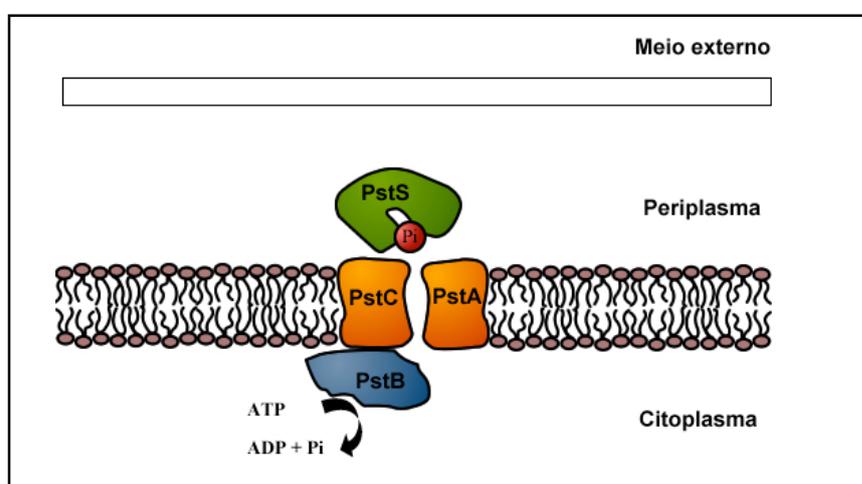
O primeiro cístron consiste no gene *pstS* e codifica a proteína ligadora de fosfato, caracterizada pela alta afinidade e especificidade a esse íon. A jusante são encontrados os genes *pstA* e *pstC*, que codificam proteínas hidrofóbicas com seis hélices transmembrânicas e são responsáveis pela formação do poro pelo qual o fosfato passa após ser ligado por PstS. Análises mutacionais de PstA e PstC sugerem que o fosfato é translocado através delas via “cadeia de fosfato” formada por uma ponte salina contendo três resíduos de arginina/glutamato (ou aspartato). É necessário o movimento participativo das hélices de PstA e PstC para abrir ou fechar o canal de fosfato, isto é ativado pela isomerização cis-trans de dois pares de resíduos de cisteína energizadas pelo ATP hidrolizado por PstB (BRANDL et al., 1986; WEBB et al., 1992). PstB consiste na proteína ligadora de nucleotídeo, pois possui os motivos de ligação ao ATP (Walker A e Walker B) codificada pelo cístron seguinte à *pstC* (Figura 4). PstB interage com PstA e/ou PstC na sua face citoplasmática, e por analogia a outros sistemas ABC transportadores, provavelmente funciona como um dímero (WANNER, 1993).



**Figura 3.** Organização do operon *pst* em *E. coli*.

Fonte: AGUENA, 2007.

O último cístron do operon, *phoU*, codifica uma proteína periférica de membrana, e seu papel no transporte de fosfato ainda é controverso, embora estudos sugiram que esta proteína regule negativamente o regulon fosfato (Pho) (BUCKLES et al., 2006).



**Figura 4.** Modelo esquematizado do sistema Pst em *E. coli*.

Fonte: Adaptado de Dassa et al., 2000.

Os genes *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB* e *phoU* possuem sua expressão altamente regulada. O promotor de *pstS* é pouco expresso em seus níveis basais, quando o fosfato inorgânico está presente em excesso no ambiente, porém, mostra uma ativação de 100 vezes na expressão quando há carência deste nutriente (METCALF et al., 1991). O operon *pst* é parte do regulon Pho, que consiste em aproximadamente 33 genes, denominados de PSI, cujos os produtos agem primariamente na assimilação de fosfato do ambiente (WANNER, 1993).

O regulon Pho é representado por um sistema de dois componentes sendo uma proteína sensora (PhoB) e uma proteína reguladora transcricional (PhoR) que na carência de fosfato ativa a transcrição dos

genes pertencentes ao regulon, através de sua ligação à sequências específicas localizadas nas regiões promotoras dos genes denominadas *Pho boxes* (NOVAK et al., 1999; WANNER, 1995). Estudos sugerem que o sistema Pst está ligado a mecanismos moleculares que levam a desativação do regulon Pho, interferindo na expressão dos genes ligados a ele (LAMARCHE et al., 2008; WANNER, 1996; RAO et al., 1990)

#### 1.4 Pleiotropismo do sistema Pst

Além do papel primordial na incorporação de Pi em condições de escassez do nutriente, o sistema Pst de transporte está relacionado a mecanismos de virulência em diversos patógenos (LAMARCHE et al., 2008). De fato, segundo Jacobsen et al. (2008), mutantes *pstA* e *pstS* mostraram constutividade na expressão de genes do regulon Pho, demonstrando o papel repressor do óperon *pst* sobre esse regulon.

Efeitos pleiotrópicos do óperon *pst* foram demonstrados em várias linhagens de *E. coli*. Na linhagem aviária patogênica, a inativação do sistema Pst reduziu significativamente o número de lesões extra-intestinais nas aves, além da perda de resistência ao soro de coelho e ao choque ácido. Em enteropatogênica de porcos, mutantes *pst* tiveram adesão aos enterócitos e patogenicidade significativamente menor quando comparada à linhagem selvagem. (LAMARCHE et al., 2005; DAIGLE et al., 1995; BATISSON et al., 2003). Já em linhagem extraintestinal, mutantes *pst* tiveram uma perda na produção de polissacarídeos de superfície e tornaram-se totalmente não patogênicas. Em *E. coli* uropatogênica, mutações no gene *phoU* causaram diminuição de 100 vezes na capacidade de colonizar o trato urinários de camundongos (LAMARCHE et al., 2008; BAHRANI-MOUGEOT et al., 2002; BUCKLES et al., 2006). Ao contrário de outras linhagens, uma inserção entre os genes *pstA* e *pstB*, em *E. coli* enteroinvasiva aumentou cerca de cinco vezes o nível de invasão à células epiteliais humanas *in vitro*, tornando a bactéria hiper-invasiva” (SINAI et al., 1993).

Em *Shigella flexneri*, outra bactéria entérica, mutações no óperon *pst* acarretaram em uma diminuição da virulência quando comparadas com

linhagens selvagens (RUNYEN-JANECKY et al., 2005). Srinivasa Rao et al. (2003, 2004), relataram que em um modelo de infecção em peixes, mutações nos genes *pstC*, *pstB* e *pstS* atenuaram significativamente a virulência da bactéria *Edwardsiella tarda*, causadora de infecção intestinal em humanos e septicemia em peixes.

No patógeno extra-intestinal *Proteus mirabilis*, mutações nos genes *pstS* e *pstA*, levaram à competição deficiente pela colonização na urina, bexiga e rins de camundongos quando comparados com a linhagem selvagem (BURALL et al., 2004; JACOBSEN et al., 2008). Além disso, mutantes *pst* se mostraram atenuados em modelos de infecção urinária *in vivo*, pela deficiência na produção de biofilme, deficiência essa também relatada em mutantes *pst* de *Pseudomonas aureofaciens*. Em *P. mirabilis*, o sistema Pst regula negativamente a formação de biofilme, sendo portanto, importante para sua patogênese (O'MAY et al., 2009; MONDS et al., 2001).

Dentro do gênero *Streptococcus*, foi observado que a mutagênese no gene *pstB* resultou na redução da capacidade de captar fosfato, na frequência de transformação e na patogenicidade em modelo de septicemia em murinos na bactéria (POLISSI et al., 1998; NOVAK et al., 1999).

Soualhine et al. (2005) relataram a relação do sistema Pst com a resistência à penicilina em *S. pneumoniae*, onde a inativação do gene *pstS* levou a um aumento de duas vezes na susceptibilidade à penicilina nas linhagens estudadas. Além disso, mutação no gene *pstB* mostrou diminuição tanto na competência quanto na capacidade de produzir biofilme, prejudicando a adesão do pneumococo ao epitélio respiratório.

## 2 OBJETIVOS

Este projeto tem como objetivo geral estudar o papel do sistema de captação de fosfato inorgânico (Pst), um transportador ativo da família ABC, na fisiologia e patogênese da linhagem UA159 de *S. mutans*. O trabalho envolverá os seguintes objetivos específicos:

- I. Caracterização *in silico* dos componentes do sistema de transporte de fosfato inorgânico em *S. mutans* UA159;
- II. Determinação da prevalência do componente ligador do óperon *pst* entre amostras de *S. mutans*;
- III. Obtenção de mutante de *S. mutans* deletado no gene *pstS* para avaliação de seus papéis na fisiologia e patogenicidade em *S. mutans*;
- IV. Clonagem, expressão e purificação do componente ligador do sistema de transporte de fosfato inorgânico (PstS) para produção de anticorpos e avaliação de suas características.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Identificação e análise computacional do óperon *pst*

As sequências de interesse ao presente estudo foram obtidas pelos bancos de dados do NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) e KEGG ([www.genome.ad.jp/kegg](http://www.genome.ad.jp/kegg)). Utilizando o programa BLAST/P foi feita a identificação dos ortólogos do sistema Pst com os maiores graus de similaridades, medidos pelos seus respectivos *e-values* (ALTSCHUL et al., 1997). Características inerentes aos diferentes ortólogos que compõem o sistema Pst entre as bactérias pesquisadas foram obtidas pelas análises no programa *ProtParam* (<http://www.expasy.ch/tools/protparam.html>). Através do método de *Neighbor-joining* (SAITOU et al., 1987) realizado pelo programa Phylip foram obtidas árvores não-enraizadas, com valores de *bootstrap* igual a 100 réplicas, o que possibilita uma análise visual da similaridade entre ortólogos. Para análise do *codon-usage* das bactérias utilizadas na expressão heteróloga da proteína PstS foi utilizado a ferramenta disponível no site <http://www.jcat.de/>. Segue a lista de programas utilizados em diferentes etapas do trabalho *in silico*:

##### 3.1.1 BLAST

Utilizamos o programa BLAST-P (<http://blast.genome.d.jp/>) para a comparação de seqüências de aminoácidos das diferentes proteínas que compõem o sistema Pst e seus ortólogos encontrados em diferentes bactérias gram-positivas, focando nas pertencentes ao gênero *Streptococcus*. A seqüência incógnita (*query*) e a seqüência do GeneBank (*subject*) são representadas por suas porcentagens de aminoácidos idênticos ou similares obtidas.

##### 3.1.2 ProtParam (*Protein Identification and Analysis Tool*)

O programa ProtParam fornece as características bioquímicas protéicas, a partir das seqüências de aminoácidos das proteínas

pesquisadas, como o peso molecular, o número de aminoácidos, o pI teórico, entre outros.

### 3.1.3 Phylip (*PHYLogeny Inference Package*)

Árvores não enraizadas foram geradas com o programa Phylip por meio dos métodos de *Neighbor-Joining*, com os valores de Bootstrap de 100. (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>).

### 3.1.4 SignalP 3.0

Programa que prediz a região de clivagem do peptídeo sinal de proteínas presentes em bactérias gram-positivas/negativas, pelos métodos de *Neural Works* e *Hidden Markov models* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>).

## 3.2 Meios de cultura e soluções

### Meio BHI (Sigma)

Meio comercial de cultura, contém; 12,5% (m/v) infusão de cérebro de borrego, 5% (m/v) infusão de coração de boi, 10% (m/v) peptona, 5% (m/v) cloreto de sódio, 2% (m/v) D-Glicose, 2,5% (m/v) Dehidrofosfato de sódio. Para meio sólido foi adicionado 2,5% (m/v) Agár.

### Meio LB (MILLER,1992)

1% (m/v) extrato de triptona, 0,5% (m/v) extrato de levedura, 1% (m/v) NaCl; pH 7,4; Para meio sólido foi utilizado 2,5% (m/v) de ágar

### Meio FMC (TERLECKYJ et al.,1975)

44,2% (m/v)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 30,5% (m/v)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 60% (m/v)  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 30% (m/v) L-ácido glutâmico, 10% (m/v) L-treonina, 20% (m/v) L-arginina, 20% (m/v) L-histidina, 20% (m/v) L-triptofano, 10% (m/v) L-valina, 11% (m/v) L-lisina, 10% (m/v) L-ácido aspártico, 10% (m/v) L-fenilalanina, 10% (m/v) L-serina, 20% (m/v) L-prolina, 20% (m/v)

L-hidroxiprolina, 20% (m/v) glicina, 10% (m/v) L-isoleucina, 10% (m/v) L-metionina, 20% (m/v) L-cisteína, 20% (m/v) L-tirosina, 10% (m/v) L-leucina, 20% (m/v) DL-alanina, 0,5% (m/v) L-glutamina, 3,5% (m/v) adenina, 2,7% (m/v) guanina, 3% (m/v) uracil, 20% (m/v) MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1% (m/v) NaCl, 1% (m/v) FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 1% (m/v) MnSO<sub>4</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,02% (m/v) riboflavina, 0,005% (m/v) biotina, 0,005% (m/v) ácido fólico, 0,04% (m/v) piridoxamina, 0,04% (m/v) ácido pantotênico, 0,004% (m/v) ácido para-aminobenzóico, 0,02% (m/v) tiamina-HCl, 0,1% (m/v) nicotinamina, 1,8% (m/v) glicose; pH 7,0; 40mM MOPS quando necessário.

#### Meio LS

20% (m/v) glicose, 0,1% (m/v) L-triptofano, 2% (m/v) casaminoácidos, 10% (m/v) extrato de levedura.

#### Meio BM (LOO, *et al.*, 2000)

10% (m/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2% (m/v) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,3% (m/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2% (m/v) NaCl, 0,02% (m/v) MnCl<sub>2</sub>.4H<sub>2</sub>O, 0,001% (m/v) FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O, 2% (m/v) casominoácidos, 0,025% (m/v) MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 0,007% (m/v) CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O, 1,2% (m/v) piridoxina-HCl, 0,23% (m/v) ácido nicotínico, 0,12% (m/v) ácido pantotênico, 0,02% (m/v) riboflavina, 0,005% (m/v) tiamina-HCl, 0,0006% (m/v) D-biotina, 0,025% (m/v) L-glutamato, 0,01% (m/v) L-arginina-HCl, 0,01% (m/v) L-cisteína-HCl, 0,001% (m/v) L-triptofano, 0,18% (m/v) glicose ou 0,17% (m/v) sacarose; pH7,4.

#### Tampão Citrato-Glicose

2,29% (m/v) citrato de sódio, 2% (m/v) glicose; pH 7,0; Quando necessário foi adicionado 500mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

#### Tampão Glicina-HCl (0,1M)

0,75 % (m/v) Glicina; pH 2,85

#### Tampão Glicina-NaOH (0,1M)

0,75 % (m/v) Glicina; pH 7,0

#### Tampão PUM

16,94% (m/v) K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7,26% (m/v) KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,8% (m/v) uréia, 0,2% Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; pH 7,1.

#### Tampão TAE (Corridas DNA)

242% (m/v) Tris, 57,1% (m/v) ácido acético, 100mL EDTA (0,5M pH8,0).

Tampão de eletroforese de proteína

3,03% (m/v) Tris, 14,45% (m/v) glicina, 3 mL solução SDS (*sodium dodecyl sulfate*) 20%.

Tampão A (Purificação da proteína)

12,1% (m/v) tris, 29,22% (m/v) NaCl.

Tampão B (Purificação da proteína)

12,1% (m/v) tris, 29,22% (m/v) NaCl, 68,08% (m/v) Imidazol; pH 7,2.

Tampão de transferência

3% (m/v) Tris-Base, 11,26% (m/v) Glicina, 100 mL metanol

Tampão PBS-Tween

136,8 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH7,4; Detergente Tween 80% foi adicionado

Quando necessário, antibióticos foram adicionados nas seguintes concentrações: canamicina (Km), 50µg/mL e 1mg/mL; tetraciclina (Tet) 15µg/mL; ampicilina, 100µg/mL; cloranfenicol (Cm) 10µg/mL e eritromicina (Em) 10µg/mL.

### 3.3 Cepas, plasmídeos e oligonucleotídeos

As linhagens bacterianas utilizadas estão descritas na Tabela 1, os plasmídeos na Tabela 2 e os oligonucleotídeos na Tabela 3.

**Tabela 1** – Linhagens de bactérias utilizadas

(Continua)

<b>Linhagem</b>	<b>Característica</b>	<b>Fonte</b>
A1/A5-A9/A11/A12 A15/A24/A25	Isolado clínico de <i>S. mutans</i>	Nepomuceno, 2007
<i>Bacillus subtilis</i> WB800	Não produtora de protease	Murashima, 2002
BL21 pLyss	<i>E. coli</i> K12 <i>F ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) λ(DE3) pLysS(cm<sup>R</sup>)</i>	Moffatt, 1897
BL21 Ril	<i>E. coli</i> K12 <i>BF ompT hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> galλ (DE3) endA Hte</i>	Stratagene
BL21 RP	<i>E. coli</i> K12 <i>BF ompT hsdS (r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) dcm<sup>+</sup> Tet<sup>r</sup> galλ (DE3) endA metA::Tn5</i>	Stratagene
BL21 star	<i>E. coli</i> K12 deficiente em RNase E	Invitrogen
BsHT	<i>B. subtilis</i> WB800 contendo vetor pHT08pstS (pHT08+pstS)	Neste trabalho
DH10B	<i>E. coli</i> K12 $\Delta(mrr-hsd MS-mcrBC)$ <i>mcrA recA1</i>	Durfee, 2008
DL1	<i>S. mutans</i> $\Delta$ pstS:NPKm <sup>r</sup>	Este Trabalho
EcoXLPQ	<i>E. coli</i> XL1-Blue transformada com pQpstS (pQE-30+pstS)	Este Trabalho
Eco RPPet	<i>E. coli</i> BL21-RP transformada com pETpstS (pET-28a+pstS)	Este Trabalho

**Tabela 1** – Linhagens de bactérias

(Conclusão)

<b>Linhagem</b>	<b>Característica</b>	<b>Fonte</b>
EcoPPet	<i>E. coli</i> BL21-Plyss com pETpstS (pET-28a+pstS)	Este Trabalho
EcoRIPet	<i>E. coli</i> BL21-RIL transformada com pETpstS (pET-28a+pstS)	Este Trabalho
EcoSPet	<i>E. coli</i> BL21-Star transformada com pETpstS (pET-28a+pstS)	Este Trabalho
LT11	<i>S. mutans</i> NCTC10449 cepa laboratorial	Nepomuceno, 2007
UA159	<i>S. mutans</i> Cepa sequenciada na universidade de Oklahoma	Adíjc, 2002
XL1-Blue	<i>S. mutans lac</i> <sup>-</sup> <i>F'</i> [ <i>proAB</i> <sup>+</sup> <i>lacI</i> <sup>q</sup> <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 <i>Tn10</i> ( <i>tet</i> <sup>r</sup> )	Bullock, 1987

**Tabela 2** – Vetores e plasmídeos utilizados

<b>Plasmídeo</b>	<b>Característica</b>	<b>Fonte</b>
pALH124	Vetor de <i>E. coli</i> contendo Cassete não-polar Km	Ahn, 2006
pET28a	Vetor de expressão em <i>E. coli</i> , <i>Histag</i> N-terminal, Km <sup>r</sup>	Novagen
pETpstS	Vetor pET28a contendo o gene <i>pstS</i> de <i>S. mutans</i>	Este Trabalho
pGEM T-easy	Vetor de clonagem linear de <i>E. coli</i> , cauda poliT, Amp <sup>r</sup>	Promega
pGpstS	Vetor pGEM T-easy contendo o gene <i>pstS</i> de <i>S. mutans</i>	Este Trabalho
pHT08	Vetor de expressão em <i>B. subtilis</i> , <i>histag</i> N-terminal Cm	Nguyen <i>et. al.</i> , 2007
pHT08pstS	Vetor pHT08 contendo o gene <i>pstS</i> de <i>S. mutans</i>	Este Trabalho
pQE-30	Vetor de expressão, <i>Histag</i> N-terminal, Amp <sup>r</sup>	Qiagen
pQpstS	Vetor pQE-30 contendo o gene <i>pstS</i> de <i>S. mutans</i>	Este trabalho
pMSP3535	Vetor de expressão em <i>S. mutans</i> Erm <sup>r</sup>	Bryan <i>et al.</i> , 2000

**Tabela 3** – Oligonucleotídeos utilizados

<b>Oligonucleotídeo</b>	<b>Sequência</b>
5'arm1pstS	5' gggTgCTCgAAATgTTgTTg 3'
3'arm1pstS	5'gggCTAgCggATCCAATAAAg'TTA 3'
5'arm2 pstS	5'gTTCTTTTAggATCCTgTgTggAg 3'
3'arm2 pstS	5' AgAgCgAAgCCAATg 3'
FwpstSBamHI	5'ggCAgTCggATCCCAgTgTTgg 3'
RvpstSSacI	5'CTTCTCTgAgCTCTTTACTTAgCA 3'
RvSeqpstS	5' TggAAACAgCTTggCgggC 3'
FwseqpstS	5' ggTAAgAAATAgCgCCcg 3'
GtfBFw	5'ACTACACTTTCgggTggCTTgg 3'
GTfBRv	5' CAgTATAAgCgCCAATTCATC 3'

### **3.4 Análise de prevalência do gene *pstS* em linhagens de *S. mutans***

#### **3.4.1 Isolamento do DNA genômico de *S. mutans***

O isolamento do DNA genômico foi feito seguindo metodologia descrita por BURNE et al. (1987). Foram incubados 20ml de cultura de *S. mutans*, crescida por 16 horas a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. A cultura foi centrifugada a 4.500g por 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado, o precipitado suspenso em 5ml de TBS (0,121% Tris) e centrifugado a 11.000g por 5 minutos a 4 °C. Foram adicionados 545µl de TE (50:10) (3,72% Tris, 6,07% EDTA) e lisozima (10mg/ml), a preparação foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Após esse período adicionou-se 50µl de SDS 20% e incubou-se a 65 °C por 15 minutos. Após leve resfriamento da suspensão foi aplicado 2µl de proteinase K (20mg/ml) e incubado a 37 °C por 30 minutos. Adicionou-se 100µl de NaCl (5M) e 80µl de

CTAB+NaCl (10% - 0,7M) manteu-se a amostra a 65 °C por 20 minutos. A fase aquosa foi extraída da porção superior após adição de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e centrifugação a 15.500g por 5 minutos. Nova extração da fase aquosa superior foi realizada após adição de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e centrifugação nas mesmas condições. Adicionou-se isopropanol absoluto gelado a fase aquosa seguido de centrifugação a 13.000g por 30 minutos (para precipitação do DNA). O DNA precipitado foi limpo adicionando etanol 70% e centrifugando a 11.000g por 10 minutos. O precipitado final foi ressuspensão em TE (10:1) (37,2g Tris, 121g EDTA por litro), tratado com 2µl RNase (10mg/mL) por 15min a 37 °C e estocada a -20 °C até o momento de uso.

### 3.4.2 Amplificação de *pstS* de *S. mutans* por PCR

Após o isolamento do DNA genômico de *S. mutans*, foram utilizados iniciadores específicos para a detecção do gene *pstS*. Estes iniciadores foram construídos a partir da sequência genômica da cepa de *S. mutans* UA159 disponível no GenBank (número de acesso AE014133) sendo FwpstSBamHI à montante e RvpstSSacl à jusante deste. O ciclo empregado para esta amplificação foi: 1. 95 °C por 5 minutos; 2. 95 °C por 30 segundos; 3. 45 °C por 30 segundos; 4. 72 °C por 1 minuto e 20 segundos; 5. Repete 5 vezes a partir do passo 2; 6. 95 °C por 30 segundos; 7. 55 °C por 30 segundos; 8. 72 °C por 1 minuto e 20 segundos; 9. Repete 25 vezes a partir do passo 6; 10. 72 °C por 7 minutos.

## 3.5 Construção do mutante deletado no gene *pstS*

### 3.5.1 Obtenção do mutante DL1

A metodologia empregada na construção do mutante DL1 seguiu normas estabelecidas na literatura, baseadas na inserção de fragmento linear construído *in vitro* substituindo o gene *pstS* (LEMOS et al., 2004).

As seqüências dos iniciadores foram originadas a partir da seqüência do gene e adjacências obtida no site KEGG (<http://www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.html>). Os iniciadores 5'arm1pstS e 3'arm1pstS foram utilizados para amplificar um fragmento de 1.030pb à montante do gene *pstS*. Os iniciadores 5'arm2pstS e 3'arm2pstS foram utilizados para amplificar um fragmento de 1.039pb à jusante do gene *pstS*. Os produtos de PCR foram digeridos com a enzima de restrição *Bam*HI e ligados ao cassete não polar de canamicina, oriundo do plasmídeo pAHL124 após digestão com a mesma endonuclease. As misturas de ligação foram introduzidas em *S. mutans* UA159 por transformação natural.

### 3.5.2 Transformação de *S. mutans*

A construção *in vitro* realizada para a deleção do gene *pstS*, foi inserida na bactéria por transformação, aproveitando das condições de competência natural deste gênero bacteriano (PERRY et al., 1983). Uma colônia isolada de *S. mutans* UA159 foi inoculada em 5mL BHI por 16 horas e 5% CO<sub>2</sub>. Uma diluição de 1:20 foi realizada em meio BHI fresco pré-aquecido. Após 2 horas de crescimento o conteúdo do produto de ligação foi adicionado e incubado por 3 horas nas mesmas condições. Os transformantes foram semeados em placas de BHI com canamicina (1mg/mL) e incubados por 48 horas a 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Transformantes positivos foram confirmados pela ausência de amplificação do gene *pstS* (iniciadores FwpstSBamHI e RvpstSSacl), por sequenciamento e por imunodeteção com anticorpos anti-PstS monoespecíficos.

## 3.6 Caracterização do mutante DL1

### 3.6.1 Experimento de internalização de fosfato radioativo (<sup>32</sup>P)

A cultura foi crescida em 10mL de meio FMC contendo 4mM de fosfato por 16h, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Após crescimento foram centrifugadas 5.000rpm por 10 minutos e ressuspendidas com FMC sem fosfato, por

duas vezes e ao final ressuspensas até uma  $DO_{600nm}$  0,1. Em seguida as culturas foram incubadas por 6 horas, a 37 °C, 5%  $CO_2$  para induzir carência de fosfato. Após incubação, foi aliquotado 1mL de cada linhagem seguida de incubação por 5min a 37 °C sob agitação e então adicionado 0,5 $\mu$ M de  $K_2HPO_4$  e 10 $\mu$ Ci de fosfato radioativo ( $^{32}P$ ). Em intervalos de tempos pré estabelecidos, alíquotas de 100 $\mu$ L foram adicionadas à membranas de nitrocelulose (Millipore™ Billerica, Massachusetts, USA) em um aparelho de Manifold (Millipore™ Billerica, Massachusetts, USA) e prontamente embebidas com tampão citrato-glicose contendo 50mM de  $K_2HPO_4$  para interromper a captação. As membranas foram retiradas do aparelho e 3mL de líquido de cintilação foi adicionado. A radiação foi contabilizada em um leitor de radiação  $\beta$ .

### 3.6.2 Curvas de crescimento em diferentes concentrações de fosfato

As cepas foram crescidas em 5mL de meio FMC utilizando tampão MOPS 40mM contendo 10mM de fosfato de potássio bibásico  $H_2PO_4$  por 16h, 37 °C, 5%  $CO_2$ . Duas lavagens das culturas foram realizadas com 8 mL de tampão citrato-glicose. Por fim a  $DO_{600nm}$  foi ajustada a 0,3 para os inóculos em 5mL de meio FMC (1:25) contendo  $K_2HPO_4$  nas concentrações de 1mM, 4mM, 10mM e 30mM de fosfato. A bactéria foi incubada em condições idênticas e a medida de absorbância a 600nm feita cada 2 horas. Cada experimento foi feito em triplicatas.

### 3.6.3 Teste de frequência de transformação de *S. mutans*

As bactérias foram incubadas em meio BHI acrescido de 5% de soro de cavalo inativado a 37 °C e 5% $CO_2$  até uma  $D.O_{600nm}$  de 0,2. Após o período de incubação, CSP (100mmol  $ml^{-1}$ ) foi adicionado a cultura e esta foi incubada por 20min. Adicionou-se então o plasmídeo pMSP3535 (500ng. $ml^{-1}$ ). Amostras que não receberam o plasmídeo serviram como controle. As células foram incubadas a 37 °C por 3 horas e plaqueadas em placas de BHI com o antibiótico em questão por um período de 48

horas. A frequência de transformação foi determinada através da contagem de transformantes entre as células viáveis no recipiente (AHN et al., 2005).

#### 3.6.4 Teste de aderência/produção de biofilme

Uma colônia isolada de *S.mutans* foi crescida em 5mL de meio BHI a 37°C, 5%CO<sub>2</sub> por 16 horas. Após este período, uma diluição de 1:100 foi realizada no meio BHI fresco seguido por incubação nas condições descritas anteriormente até atingir uma D.O.<sub>600nm</sub> 0,5. Uma nova diluição de 1:100 foi feita em meio BM fresco, alíquotas de 200µl foram dispostas em poços de placas de microtitulação (96-well optical bottom plates™, Nunc, Rochester, NY USA), seguido por incubação, a 37 °C, 5%CO<sub>2</sub> por 24 horas. Posteriormente, o meio de cultura conjuntamente com as células não aderidas foi removido, por inversão da placa. A placa foi submersa em solução salina e seu conteúdo retirado por inversão. Foi adicionado 100µl de cristal violeta em cada poço e incubado por 15min em temperatura ambiente. O processo de lavagem foi então repetido com solução salina por duas vezes e, ao final, as células coradas foram ressuspensas com 200µl de ácido acético (33%) por poço. A absorbância foi aferida em leitor de de placas a 600nm (BERLUTTI et al., 2004).

#### 3.6.5 Teste de hidrofobicidade

As culturas bacterianas foram incubadas em meio BHI a 37°C , 5%CO<sub>2</sub> e tiveram sua D.O.<sub>600nm</sub> aferida até que as células atingissem duas fases distintas do crescimento celular: logarítmica e estacionária. As culturas então foram lavadas três vezes com o tampão PUM, e uma D.O.<sub>500nm</sub> 0,85 foi ajustada. Alíquotas de 3mL das suspensões bacterianas foram transferidas para tubos de vidro e tiveram suas D.O.<sub>550nm</sub> mensuradas. 400µl de n-hexadecano (Sigma Aldrich Inc™, São Paulo, São Paulo, Brasil), foram adicionados, as suspensões foram incubadas a 30 °C por 10 minutos e posteriormente homogenizadas em agitador de

tubos por dois períodos de 30 segundos, com intervalo de 5 segundos de repouso entre eles. Após a separação das fases (30 minutos) a  $D.O_{550nm}$  da fase aquosa foi determinada. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os valores de hidrofobicidade expressos em porcentagens da redução na  $D.O_{500nm}$  da suspensão comparada ao valor inicial, o que representa a porcentagem de células aderidas ao hexadecano (GIBBONS et al., 1983).

### 3.6.6 Teste de resistência a ácido

Inóculos das cepas UA159 e DL1 foram crescidos em BHI por 18 horas. Uma alíquota de 200 $\mu$ L foi transferida para 5 mL de BHI fresco e a bactéria foi incubada a 37 °C 5%CO<sub>2</sub> até uma  $D.O_{600nm}$  0,5-0,6. Após incubação, uma alíquota de 100 $\mu$ L foi retirada para servir de controle, diluições seriadas foram feitas e plaqueadas em BHI. O restante da cultura foi centrifugada a 5.500g por 10 minutos a 20 °C e ressuspensa em 1mL de tampão glicina pH 7,0. A mistura foi centrifugada a 5.500g por 10 minutos a 20 °C, ressuspensa em 800 $\mu$ L de tampão glicina pH 2,85, e incubada a 37 °C 5%CO<sub>2</sub> por diferentes períodos de tempo (30, 60 e 90 minutos). A cada tempo alíquotas de 100 $\mu$ L eram retiradas para diluições seriadas e plaqueamento em BHI. As placas foram incubadas por 48h e as unidades formadoras de colônias foram contabilizadas (LEMOS et al., 2004).

## 3.7 Clonagem e expressão da proteína PstS

### 3.7.1 Extração de DNA plasmidial (MIDI-PREP)

As células foram crescidas em 50mL de meio LB com o antibiótico necessário por 16 horas. A cultura foi então centrifugada 8.500g por 10min a 4 °C. O precipitado foi ressuspendido em 5mL da solução P1 (2,5% Tris-HCl pH8.0, 2% EDTA pH 8.0), agitado em um agitador de tubos, e a ele foi adicionado 5 mL da solução P2 (2% de NaOH 10N, 5% de SDS 20%), a

amostra foi então homogeneizada por inversão. Por fim, 5mL da solução P3 (294% KOAc, 11,5% ácido acético glacial) foi adicionado e novamente homogeneizado por inversão. A solução foi então centrifugada 12.000g por 30min a 4 °C, o sobrenadante, transferido para outro tubo, e 1/10 V de NaOAc 3M e 1V de isopropanol absoluto foi adicionado. Uma incubação de 5min em temperatura ambiente seguida de centrifugação a 13.000g por 30min a 4 °C foram realizados. O precipitado foi ressuspensão em 300µL de água livre de DNase e tratado com 7µL de RNase (10mg/mL) por 15min a 37 °C. Adicionou-se 1V de Fenol-Clorofórmio (1:1), e centrifugou-se a mistura a 4.500g por 10min. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde 1V de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) foi adicionado e centrifugado a 4.500g por 10min. Assim como anteriormente a fração superior foi transferida para outro tubo onde adicionaram-se 1/10 V de NaOAc 3M pH4,8 e 1V de isopropanol. A amostra foi centrifugada a 13.000g por 15min a 4 °C. Duzentos microlitros de etanol 70% foi adicionado e a amostra centrifugada a 11.000g por 10min. Após secagem, o precipitado foi ressuspensão com 125µL de água livre de DNase e mantido a -20 °C.

### 3.7.2 Digestão de DNA com enzimas de restrição e tratamento com enzimas modificadoras

As amostras de DNA foram digeridas totalmente durante três horas e meia a 30 °C ou 37 °C com enzimas de restrição (Fermentas<sup>®</sup>, Glen Burnie, Maryland, USA) conforme recomendado pelo fabricante. No caso de fragmentos de DNA com extremidades de ponta cega, a enzima CIAP foi utilizada para retirada de fosfato da extremidade, permitindo a correta clonagem do gene.

### 3.7.3 Ligação de moléculas de DNA

A ligação de moléculas de DNA com vetores plasmidiais foi realizada utilizando 1U de ligase (Fermentas<sup>®</sup>, Glen Burnie, Maryland,

USA), duas a três vezes excesso de inserto em relação ao vetor e tampão da enzima fornecido pelo fabricante. A reação foi realizada por 18 horas a 15 °C.

#### 3.7.4 Transformação química de bactérias

O preparo para a transformação química foi feito com um inóculo de 100µL de *E. coli* DH10B em 5 mL de LB e incubação a 37 °C por 24 horas. Após incubação foi adicionado 500µL desta cultura a 50ml de LB e incubado a 37 °C até atingir a D.O<sub>600nm</sub> de 0.5 – 0.6. Os tubos então foram colocados em gelo por 15 minutos e depois centrifugados a 4.500g por 10 minutos a 4 °C. As células foram ressuspensas em 16ml de RF1 (12% m/v de RbCl; 0,99% m/v de NaCl 5M; 3% de solução KOAc 1M; 0,15% m/v CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O e 15% m/v glicerol; pH5,8) e incubadas em gelo por 60 minutos, seguido de centrifugação a 4.500g por 10 minutos a 4 °C. A cultura foi ressuspensa em 4 mL de RF2 (2% de solução Mops 0,5M; 0,12% m/v RbCl; 1,1% m/v CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; pH6,8) e colocados em gelo por 15 minutos. Alíquotas de 200µl foram estocadas a -80 °C.

Após o preparo, alíquotas de 200µl de células foram incubadas em gelo por 10 mins seguida da adição de 10µl da ligação. Esta mistura passou por 35min em gelo e 2 minutos a 42 °C. Imediatamente, a mistura voltou ao gelo por 10 min onde 800µl de LB foi adicionado seguido de incubação por 90 minutos a 37 °C sem agitação. A suspensão foi dividida em alíquotas que foram semeadas em placas de meio LB sólido contendo ampicilina (100µg/mL), X-gal e IPTG 5M, mantidas a 37 °C por 24 horas, para seleção de bactérias transformantes.

#### 3.7.5 Eletrotransformação de bactérias

A bactéria a ser eletroporada teve uma colônia isolada incubada em 10mL de LB a 37 °C por 16 horas. Foram adicionados 500µl desta cultura em 100mL de LB fresco, e a cultura foi incubada a 37 °C até atingir a D.O<sub>.600nm</sub> 0,5-0,6. Resfriou-se a cultura em gelo por 10 minutos, seguida de centrifugação a 5.500g por 10min a 4 °C. As células foram

ressuspensas em 20mL de água destilada estéril e centrifugadas a 5.500g por 40min a 4 °C. O precipitado foi ressuspenso em 8mL de água destilada e centrifugada a 5.500g por 10 minutos a 4 °C. Adicionaram-se 1mL de glicerol 10% ao precipitado, seguido de centrifugação a 5.500g por 10 minutos a 4 °C. Por fim a nova ressuspensão foi realizada com 100µl de glicerol 10% e a amostra aliqotada em tubos contendo 50µl, sendo estocadas a -80 °C até o uso.

Às alíquotas de células eletrocompetentes, foram adicionados 2µl do plasmídeo em questão. A mistura foi transferida para uma cubeta de eletroporação 2mm (BioRad®, West Palm Beach, Flórida, USA) resfriada em gelo. A eletroporação foi efetuada em um aparelho eletroporador (Eppendorf™, São Paulo, São Paulo, Brasil) à 25kV. Após a eletroporação foi adicionado à cubeta 1mL de meio LB, e a suspensão foi transferida para um tubo de ensaio, incubada por 90 minutos a 37 °C, sem agitação. A suspensão foi dividida em alíquotas e semeadas em placas de meio LB sólido contendo ampicilina (100µg/mL) ou canamicina (50µg/ml) e incubadas por 37 °C por 16 horas.

### 3.7.6 Clonagem do gene *pstS*

O gene *pstS* obtido como descrito no tópico 3.4.2 foi utilizado diretamente para clonagem no vetor pGEM-Teasy (Promega®, Madison, Winsconsin, USA). A reação de ligação foi realizada e utilizada para transformação de células da linhagem DH10B de *E. coli* K12, pelo método de transformação química. Esta construção foi denominada de pGpstS.

### 3.7.7 Subclonagens do gene *pstS* em vetores de expressão

Partindo do vetor pGpstS, foi realizado a subclonagem do gene *pstS* nos vetores pQE-30 (Qiagen™, Germantown, Maryland, USA) o qual possui o promotor T5 e é expresso na linhagem XL1-Blue de *E. coli*, originando o plasmídeo denominado de pQpstS, e no vetor pET-28a que possui o promotor T7 e é expresso em linhagens BL21 de *E. coli*, originando a

construção pETpstS, lembrando que nos dois casos há fusão da proteína heteróloga com cauda de histidina. A remoção do gene *pstS* foi feita após digestão do plasmídeo pGpstS com as endonucleases *Bam*HI e *Sac*I. Uma terceira subclonagem foi realizada no vetor pHT08, expresso em *B. subtilis* WB800, cuja transformação seguiu o protocolo descrito por Anagnostopoulos et al. (1961). A remoção do gene *pstS* para subclonagem nesse vetor foi feita após digestão do plasmídeo pQpstS com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Sma*I, esta construção foi denominada pHT08pstS.

### 3.7.8 Indução da expressão da proteína PstS

Para indução da expressão das linhagens EcoXLpQ (*E. coli* XL1-Blue transformada com pQpstS), EcoRPet (*E. coli* BL21-RP transformada com pETpstS), EcoPPet (*E. coli* BL21-Plyss transformada com pETpstS), EcoRIPet (*E. coli* BL21-RIL transformada com pETpstS), EcoSPet (*E. coli* BL21-Star transformada com pETpstS), e BsHT (*B. subtilis* transformada com pHT08pstS) empregamos o meio LB. Um pré-inóculo foi realizado em 5mL de meio LB com antibiótico necessário e incubado por 16h a 37 °C sob agitação de 200rpm. Então um inóculo foi realizado em 500mL de LB/antibiótico e incubado a 37 °C sob agitação de 200rpm até a densidade óptica (600nm) desejada, cerca de 0.5-0.6, quando foi retirada uma alíquota para um extrato pré-indução. Foi adicionado 50µL de IPTG 0,5M e a cultura voltou para a incubação em 37 °C sob agitação de 200rpm por 4 horas. Uma alíquota para extrato pós-indução também foi retirada antes da centrifugação final a 15.000g por 40min.

## 3.8 Extração e purificação da proteína PstS

A extração da proteína foi realizada em condições que visaram a obtenção da proteína heteróloga em sua condição nativa (não desnaturada). O protocolo seguiu os seguintes passos: (i) o precipitado proveniente da indução foi ressuspenso em 50mL do tampão (tampão A ou

B) e a esse foram adicionados 200 $\mu$ l de lisozima (10mg/m) seguido de agitação até a solubilização do precipitado. (ii) 1mL de PMSF 50mM foi adicionado seguido de incubação em gelo por 30 minutos. (iii) A solução foi homogeneizada com a utilização do aparelho French press (Artepeças Aplab<sup>®</sup>, São Paulo, São Paulo, Brasil) seguida de centrifugação a 12.000g por 30 minutos a 4 °C. (iv) O sobrenadante denominado de extrato solúvel foi transferido para um tubo e estocado a 4 °C, enquanto que o extrato insolúvel a -20 °C. O sobrenadante foi utilizado para as tentativas de purificação por cromatografia de afinidade por imobilização metálica (IMAC) com FPLC-Aktä (GE Health Care life Science<sup>®</sup>, São Paulo, São Paulo, Brasil), utilizando um gradiente de concentração de Imidazol a partir da diluição dos tampões B.

O protocolo para purificação da proteína PstS por eletroeluição seguiu a metodologia descrita por Keen et al. (1995), com algumas alterações. As amostras da proteína PstS eluídas a uma concentração de 150mM de imidazol foram submetidas a eletroforese em SDS-PAGE e, posteriormente a banda correspondente a proteína foi eluída do gel. Esse material foi transferido para um saco de diálise, previamente umedecido contendo 1mL de tampão de eletroforese de proteína com 50 $\mu$ L de PMSF 50mM. O conjunto foi colocado em uma cuba de eletroforese contendo o mesmo tampão e submetido a uma corrente de 22V por 16 horas. Posteriormente, o conteúdo do saco contendo a proteína purificada foi retirado e estocado a 4 °C.

### **3.9 Produção de anticorpos anti-PstS**

O anticorpo foi obtido através de imunizações via subcutâneas de cinco camundongos Balb/c. Foram administradas quatro doses contendo 50ng/animal de PstS com intervalos de sete dias. A primeira dose foi administrada acrescida de adjuvante completo de Freud e nas doses seguintes utilizamos a versão incompleta do mesmo adjuvante. Sete dias após a última imunização, uma sangria total foi realizada, para obtenção do soro. Incubamos o sangue por 30min a 37 °C, seguida de uma

incubação de mesmo tempo a 4 °C e centrifugação a 13.000g por 10min, as amostras dos cinco camundongos foram agrupadas em um *pool* de anticorpo. A especificidade do soro foi testada por imunodeteção.

### 3.9.1 Imunodeteção com soro anti-PstS

Um gel de SDS-PAGE foi corrido seguindo a metodologia descrita por Laemmli et al. (1970). Os géis foram preparados com acrilamida na concentração final de 12,5% e N-N'metileno-Bis-acrilamida (Bis) de 2,6%. Após a corrida o gel foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (Millipore<sup>®</sup>, Billerica, Massachusetts, USA) a 60V por 60min. A membrana foi bloqueada com 5% de leite diluído em PBS contendo 0,05% Tween-20 (PBS-T), por 16 horas. Lavagens com PBS-Tween foram seguidas de incubação da membrana com soro anti-PstS diluído 1:1000 em PBS-T por 90 min. Foram realizadas lavagens com PBS-T seguido de incubação com soro Anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Promega<sup>®</sup>, Madison, Wisconsin, USA) na diluição de 1:3000 em PBS-T por 90min. A detecção foi realizada com o sistema *Supersignal West Pico Chemiluminescent* (Pierce<sup>®</sup> Rockford, Illinois, USA), de acordo com o fabricante. Filmes de raio-X foram utilizados para a detecção das bandas correspondentes à proteína PstS.

### **3.10 Efeito dos anticorpos anti-PstS sobre o crescimento de *S. mutans***

Um inóculo de 1:25 de *S. mutans* UA159 foi realizado em meio BHI contendo diferentes concentrações de soro anti-PstS (1:250, 1:500, 1:1000), e anti-Bacillus (1:250) que foi utilizado como controle. A densidade óptica (600nm) foi medida a cada duas horas. Experimento feito em triplicata.

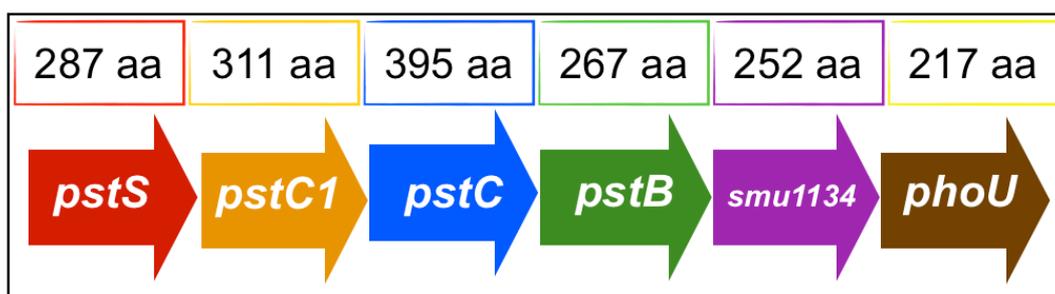
### 3.11 Sequenciamento de DNA

As amostras de DNA foram amplificadas por PCR, submetidas á eletroforese, purificadas conforme descrito acima e sequênciadas (ambas as fitas de DNA) com os iniciadores indicados na Tabela 3 utilizando-se o kit *BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit* em sequenciador automático modelo *ABI Prism 3100 Genetic Analyser* (Applied Biosystems/Hitachi).

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Análise computacional do óperon *pst* de *S. mutans*

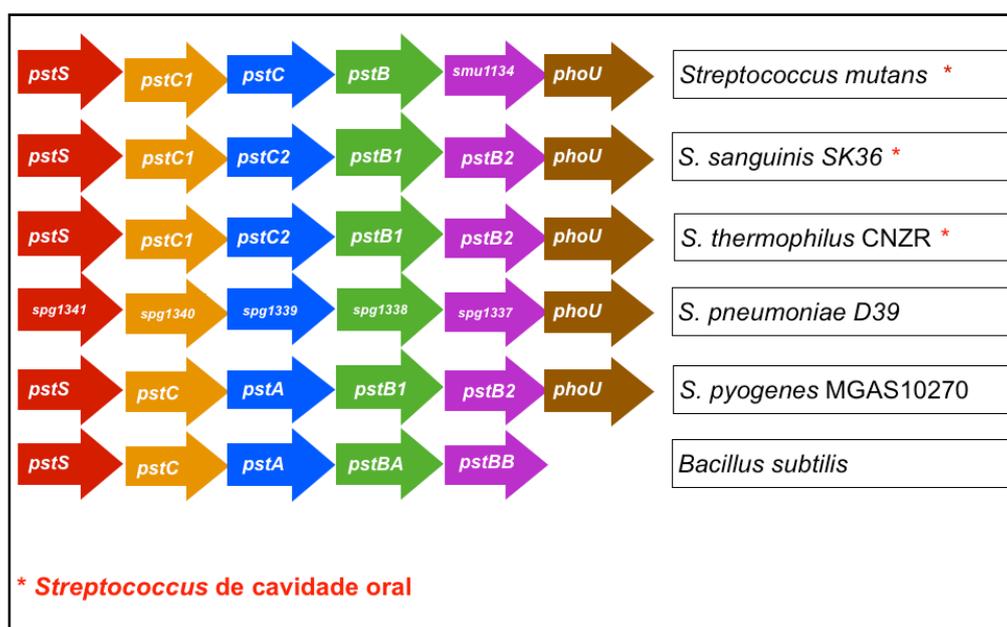
A análise do genoma da cepa de *S. mutans* UA159 revelou a presença de uma única cópia de um possível óperon *pst* constituído por seis cístrons (*pstS*, *pstC1*, *pstC*, *pstB*, *smu.1134* e *phoU*) (Figura 5). O primeiro cístron do óperon, *pstS*, codifica uma proteína ligadora de fosfato. A proteína PstS possui massa molecular de 30,8kDa (287aa) e a função de definir a afinidade e a especificidade do sistema de transporte. Os dois cístrons seguintes, *pstC1* e *pstC*, codificam proteínas de massas moleculares correspondentes a 31,7kDa (311aa) e 33,6kDa (395aa), respectivamente, e são proteínas transmembrânicas do sistema de transporte, formando o poro na membrana citoplasmática, pela qual o nutriente deve passar. Os genes *pstB* e *smu.1134* codificam proteínas de massas moleculares correspondentes a 30,6kDa (267aa) e 28kDa (252aa), respectivamente, e apresentam a função de ATPase, responsáveis pela geração de energia necessário ao processo de transporte. O último cístron do óperon, é representado pelo gene *phoU*, que codifica uma proteína com massa molecular de 24,7kDa (217aa) e não faz parte do transportador de fosfato.



**Figura 5.** Organização do óperon *pst* em *S. mutans* UA159. As setas indicam a direção de transcrição. O número de aminoácidos codificados por cada gene estão indicados na figura.

Comparamos a organização dos genes que constituem o óperon *pst* de quatro espécies do gênero *Streptococcus* (*S. sanguinis*, *S. thermophilus*, *S. pneumoniae* e *S. pyogenes*) – cujo óperon foi notado no genoma

sequenciado disponível no GenBank - com o encontrado em *S. mutans* UA159. Como indicado na Figura 6, todos os óperons *pst* encontrados nas diferentes espécies do gênero *Streptococcus* compartilham a mesma organização genética incluindo a presença do gene *phoU*. Em *Bacillus subtilis* (bactéria utilizada como comparação, por ter seu óperon *pst* mais estudado entre as bactérias Gram-Positivas), o óperon *pst* está organizado de forma semelhante ao encontrado nas espécies do gênero *Streptococcus*, no entanto, nesta bactéria o gene *phoU* está ausente.



**Figura 6.** Análise da organização do óperon *pst* em diferentes espécies de *Streptococcus*. O óperon *pst* de *B. subtilis* também está indicado na figura para comparação.

Comparamos as sequências de aminoácidos de todas as proteínas codificadas pelos óperons *pst* encontrados das quatro espécies de *Streptococcus* (as mesmas mostradas na Figura 6) em relação àquelas codificadas pelo *S. mutans* UA159 por meio do programa Blast/P. Na Tabela 4, apresentamos os valores de identidade compartilhados entre os diferentes ortólogos em relação às proteínas codificadas por *S. mutans*. De um modo geral, as proteínas codificadas por *S. sanguinis* e *S. thermophilus* apresentam maiores valores de identidade com os ortólogos de *S. mutans*. Com relação à proteína ligadora de fosfato inorgânico, PstS de *S. mutans* UA159 (foco de nosso trabalho), o maior valor de identidade

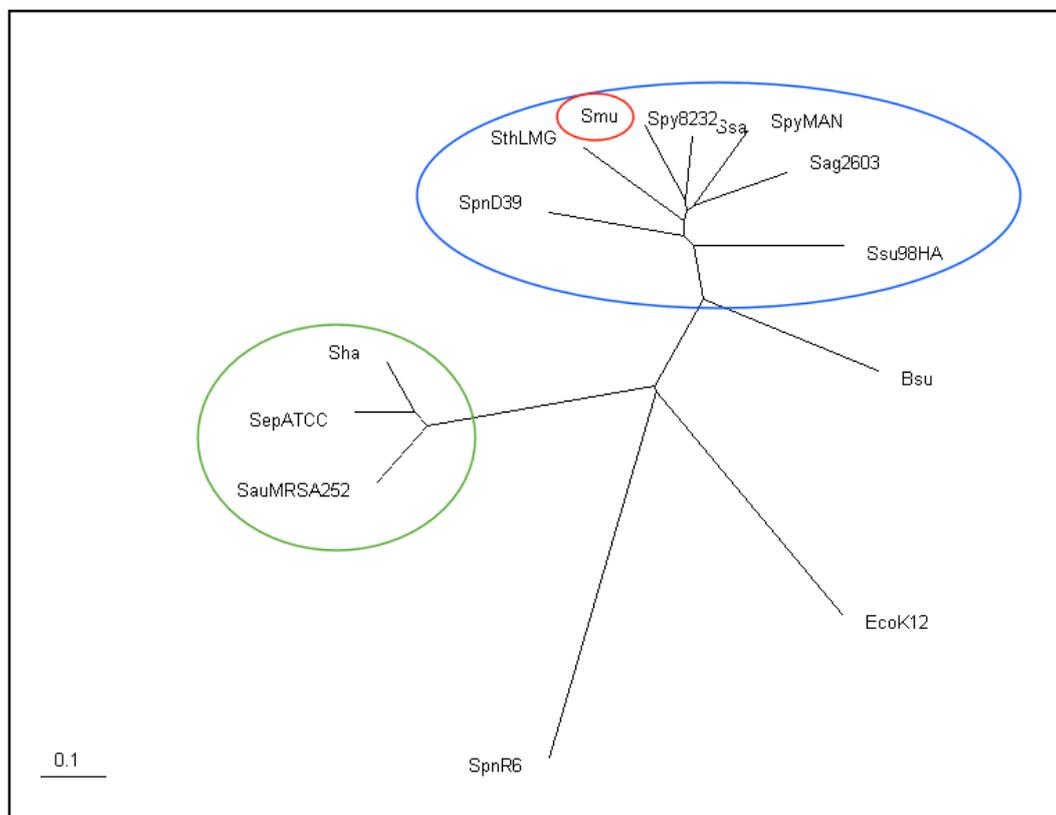
encontrado (84%) foi a do ortólogo codificado por *S. sanguinis* SK36 e o menor valor (33%) a do ortólogo codificado por *S. pyogenes* (Tabela 4). Na Tabela 4 apresentamos também os valores preditos de massa molecular para cada proteína codificada pelos genes que constituem os óperons *pst* das diferentes espécies de *Streptococcus*.

**Tabela 4** – Massas moleculares preditas das proteínas do sistema Pst e análise de similaridade dentre os ortólogos de *Streptococcus*

Organismos	Número de aminoácidos (kDa)/ valores de identidade					
	PstS	PstC1	PstC	PstB	Smu1134	PhoU
<i>S. mutans</i> UA159	287aa 30,8kDa 100%	311aa 33,6kDa 100%	395aa 31,7kDa 100%	267aa 30,2kDa 100%	252aa 28,0kDa 100%	217aa 24,7kDa 100%
<i>S. sanguinis</i> SK36	293aa 31,0kDa 84%	305aa 32,8kDa 90%	294aa 31,5kDa 49%	267aa 30,4kDa 80%	257aa 28,6kDa 52%	217aa 25,0kDa 68%
<i>S. thermophilus</i> CNRZ	299aa 32,4kDa 83%	304aa 32,9kDa 33%	300aa 32,3kDa 88%	267aa 30,2kDa 74%	252aa 27,9kDa 80%	218aa 24,8kDa 72%
<i>S. pneumoniae</i> D39	291aa 30,7kDa 36%	287aa 30,7kDa 32%	271aa 29,1kDa 58%	250aa 28,1kDa 69%	267aa 30,3kDa 85%	216aa 24,1kDa 41%
<i>S. pyogenes</i> MGAS	288aa 30,9kDa 33%	311aa 33,6kDa 32%	295aa 31,6kDa 52%	267aa 30,4kDa 78%	252aa 28,2kDa 52%	217aa 24,9kDa 85%

Focando na proteína de interesse desse trabalho, PstS, e a partir de valores de identidade codificados por 14 espécies de bactérias (gêneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bacillus* e *Escherichia*) construímos árvores não-enraizadas pelo método *neighbor-joining* (Figura 7). Pode-se verificar que as sequências das proteínas PstS codificadas pelas espécies de *Streptococcus* estão reunidas no mesmo ramo da árvore. Ortólogos codificados por espécies do gênero *Staphylococcus* mostram uma origem filogenética distinta e estão organizados em ramo separado, assim como os ortólogos encontrados em *E. coli* K12 e *B.*

*subtilis*. A linhagem da bactéria *Streptococcus pneumoniae* R6, mostrou uma origem filogenética distinta das demais espécies de *Streptococcus*, e por isso aparece separada do ramo do gênero. Análises semelhantes foram feitas para as sequências de aminoácidos das proteínas codificadas pelos genes dos óperons *pst* das espécies bacterianas analisadas.

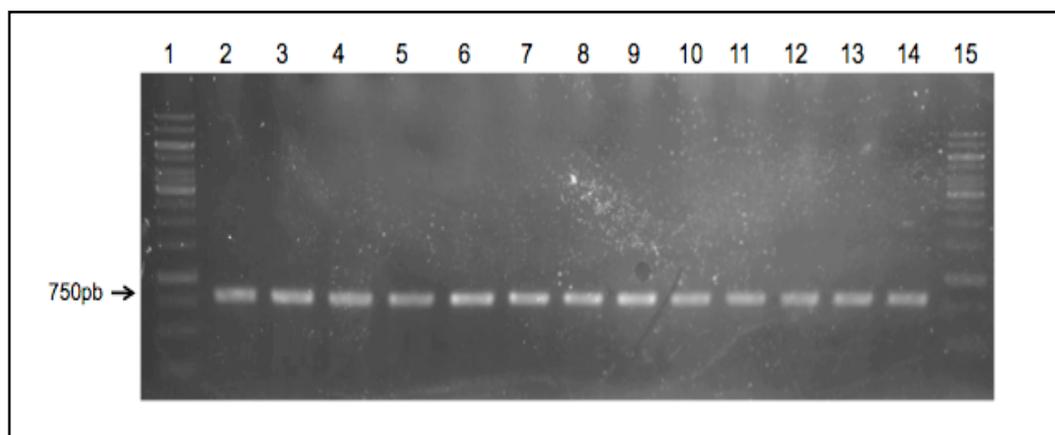


**Figura 7.** Árvore não-enraizada com valores de identidade compartilhados pelas proteínas PstS codificadas por 14 espécies de bactérias. Dois grupos podem ser observados: as espécies do gênero *Staphylococcus* (círculo verde), as espécies do gênero *Streptococcus* (círculo azul). Em destaque a localização de ortólogo de PstS de *S. mutans* (círculo vermelho). Abreviações utilizadas: Smu (*S. mutans* UA159), Sag2603 (*S. agalactiae* 2603), SpnD39 (*S. pneumoniae* D39), SpnR6 (*S. pneumoniae*, Ssu98HA (*S. suis* 98HA), SthLMG (*S. thermophilus* LMG18311), Spy8232 (*S. pyogenes* MGAS3282), SpyMAN (*S. pyogenes* str. Manfredo), Ssa (*S. sanguinis* SK36); SauNCTC (*S. aureus* NCTC), Sha (*S. haemolyticus*), SepATCC (*S. epidermidis* ATCC12228); Bsu (*Bacillus subtilis*); EcoK12 (*Escherichia coli* K12).

#### 4.2 Prevalência do gene *pstS* em linhagens de *S. mutans*

Verificamos a presença do gene *pstS* em diferentes linhagens de *S. mutans*. Para tal finalidade utilizamos duas cepas laboratoriais de *S. mutans* (UA159 e LT11) e onze isolados clínicos obtidos a partir de

pacientes cárie-ativos. Empregamos a técnica de PCR e os iniciadores FwpstSBamHI e RvpstSSacl, definidos a partir do genoma de *S. mutans* UA159. Como mostrado na Figura 8, todas as amostras testadas portam o gene *pstS* e, conseqüentemente, compartilham sequências gênicas semelhantes àquela encontrado em *S. mutans* UA159



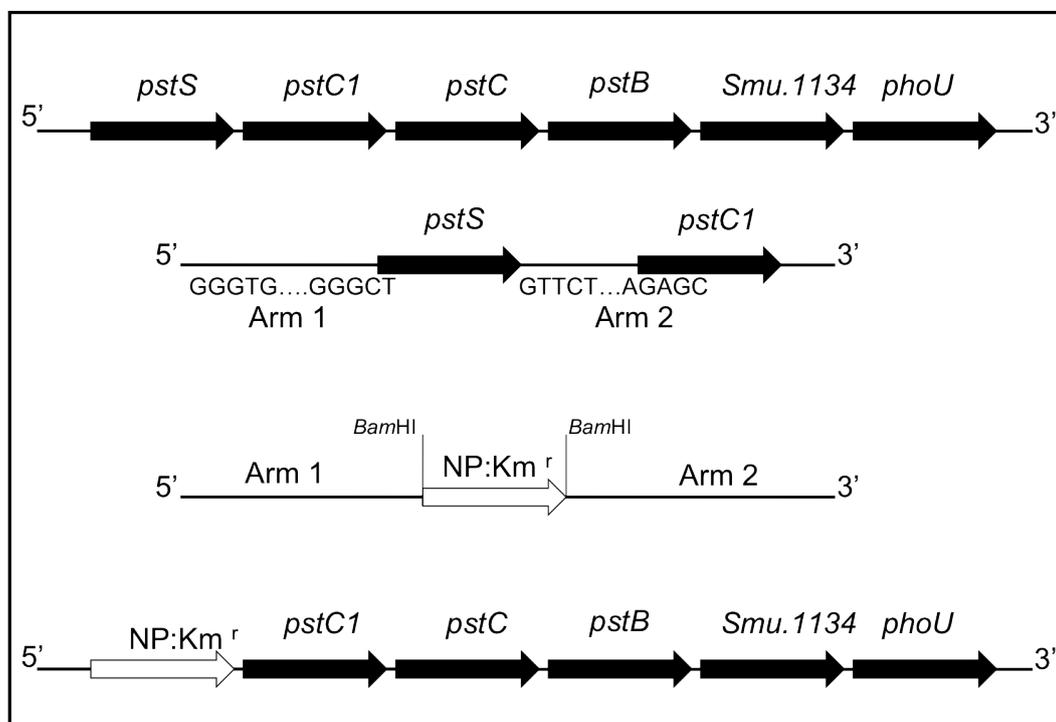
**Figura 8.** Detecção do gene *pstS* em diferentes linhagens de *S. mutans*. Amostras: 1) Marcador de peso molecular (1kb ladder O'Gene Ruler™- Fermentas®, Glen Burnie, Maryland, USA); 2) Cepa laboratorial *S. mutans* UA159; 3) Cepa laboratorial *S. mutans* LT11; 4) Cepa clínica carie-ativa A1; 5) Cepa clínica carie-ativa A5; 6) Cepa clínica carie-ativa A6; 7) Cepa clínica carie-ativa A7; 8) Cepa clínica carie-ativa A8; 9) Cepa clínica carie-ativa A9; 10) Cepa clínica carie-ativa A11; 11) Cepa clínica carie-ativa A12; 12) Cepa clínica carie-ativa A15; 13) Cepa clínica carie-ativa A24; 14) Cepa clínica carie-ativa A25; 15) Marcador de peso molecular (1kb ladder O'Gene Ruler™- Fermentas®- Glen Burnie, Maryland, USA).

### 4.3 Papel do sistema Pst na fisiologia e patogênese de *S. mutans*

#### 4.3.1 Construção da linhagem DL1 ( $\Delta pstS$ ) de *S. mutans*

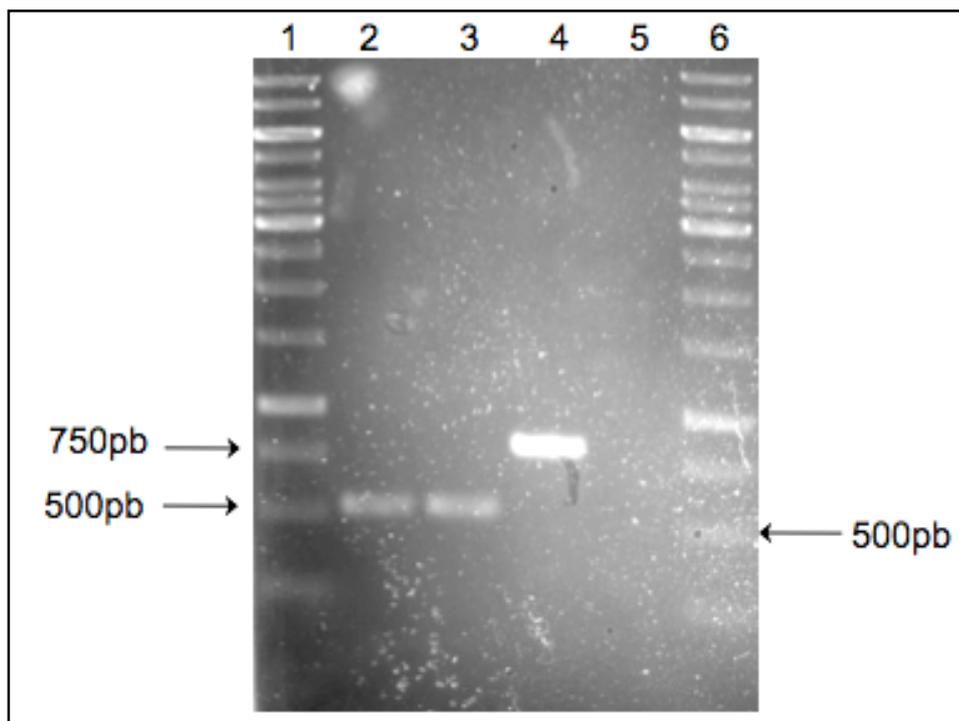
Com o objetivo de avaliar o papel do óperon *pst* na fisiologia do *S. mutans* UA159, aplicamos uma estratégia de troca alélica por dupla recombinação para gerar uma deleção no gene *pstS*. Para tal finalidade geramos um fragmento de DNA que transporta sequências flanqueadoras do gene *pstS* e um cassete não polar de resistência à canamicina, obtido do plasmídeo pALH124 como descrito em materiais e métodos (Figura 9). A inserção do fragmento no genoma da linhagem UA159 permitiu a

deleção não polar do gene *pstS*. Foram analisados alguns clones obtidos após o processo de mutagênese sítio-dirigida e um mutante, denominado DL1, foi selecionado.



**Figura 9.** Representação esquemática da mutagênese do gene *pstS* de *S. mutans*. A figura mostra o operon *pst* de *S. mutans* nativo, a localização das regiões adjacentes que compõem o gene que irá substituir o gene alvo, a construção deste com a ligação do cassete não polar, e por fim o operon mutado.

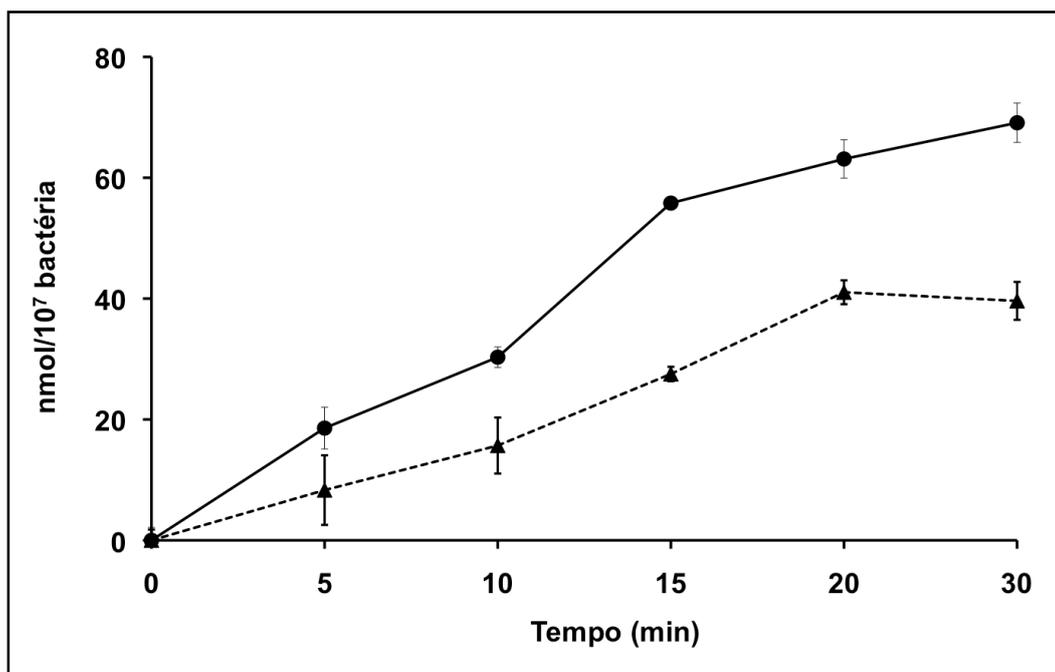
Na Figura 10 apresentamos os produtos de amplificação a partir do DNA genômico extraído das linhagens UA159 e DL1 com iniciadores para os genes *pstS* e *gtfB* (um marcador específico para *S. mutans*). Como pode ser notado, o mutante DL1 não gerou uma banda correspondente ao gene *pstS*, confirmando a deleção do gene correspondente.



**Figura 10.** Amplificação dos genes *gtfβ* e *pstS* nas cepas selvagem e mutada de *S. mutans*. Amostras: 1) Marcador de peso molecular; 2) Amplificação do gene *gtfβ* na linhagem de *S. mutans* UA159; 3) Amplificação do gene *gtfβ* na linhagem de *S. mutans* DL1 ; 4) Amplificação do gene *pstS* na linhagem de *S. mutans* UA159; 5) Ausência de amplificação do gene *pstS* na linhagem de *S. mutans* DL1; 6) Marcador de peso molecular.

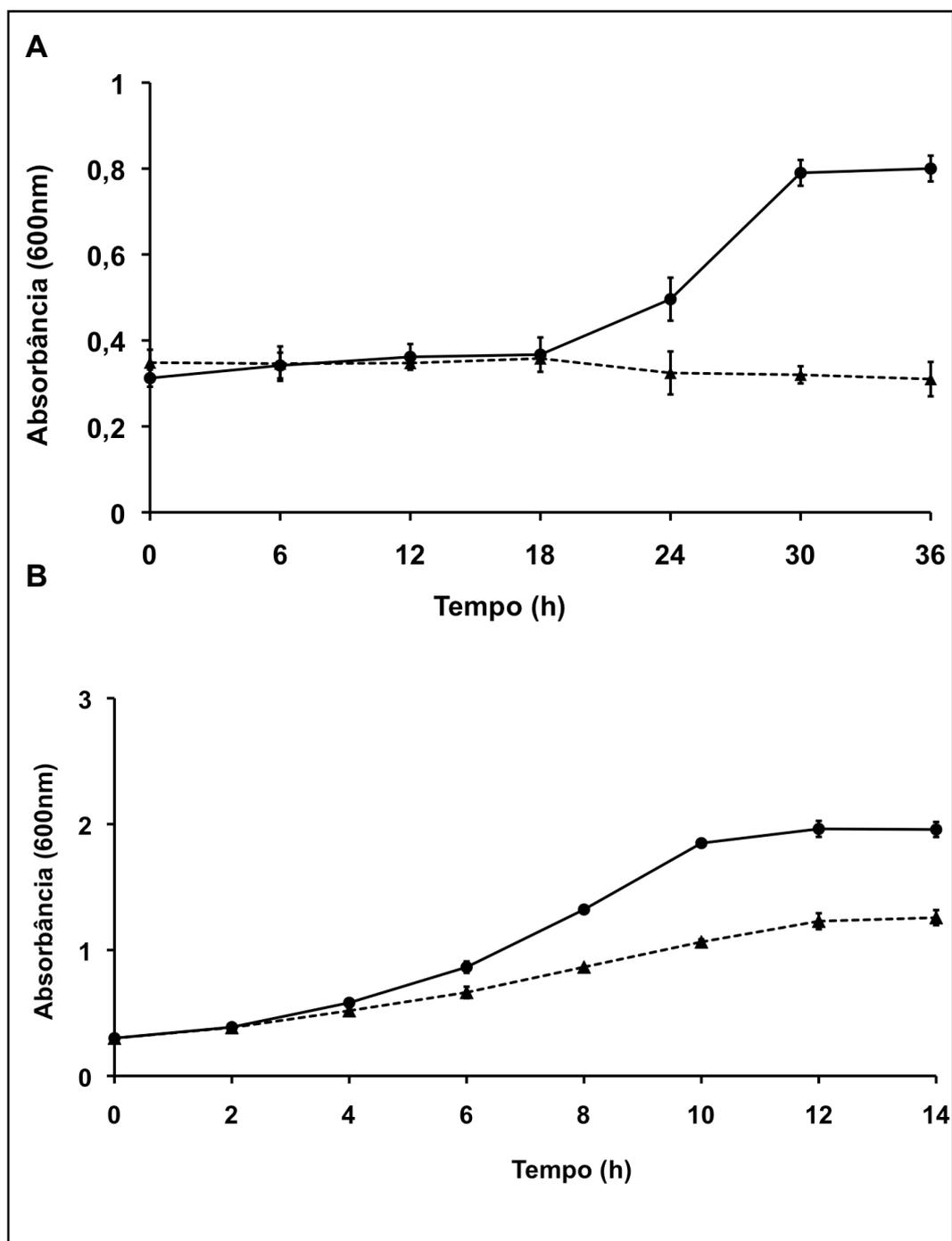
#### 4.3.2 Efeito da mutação no gene *pstS* no crescimento e captação de fosfato em *S. mutans*

Para comprovar que a deleção do gene *pstS* afeta a captação de fosfato, realizamos ensaios com fosfato radioativo marcado com  $^{32}\text{P}$  nas linhagens UA159 e no mutante DL1. Os resultados encontrados demonstram que a captação de fosfato decaiu no mutante DL1 em relação à linhagem parental (Figura 11). Tal resultado confirma a funcionalidade do gene *pstS* na linhagem UA159 e sugere que outros mecanismos de transporte de fosfato são codificados pela linhagem.



**Figura 11.** Internalização de ortofosfato ( $^{32}\text{P}$ ) em linhagens de *S. mutans*. (●) UA159; (▲) DL1. Valores expressos em nanomoles por  $10^7$  de bactéria. Cada ponto da curva é a média de três triplicatas independentes.

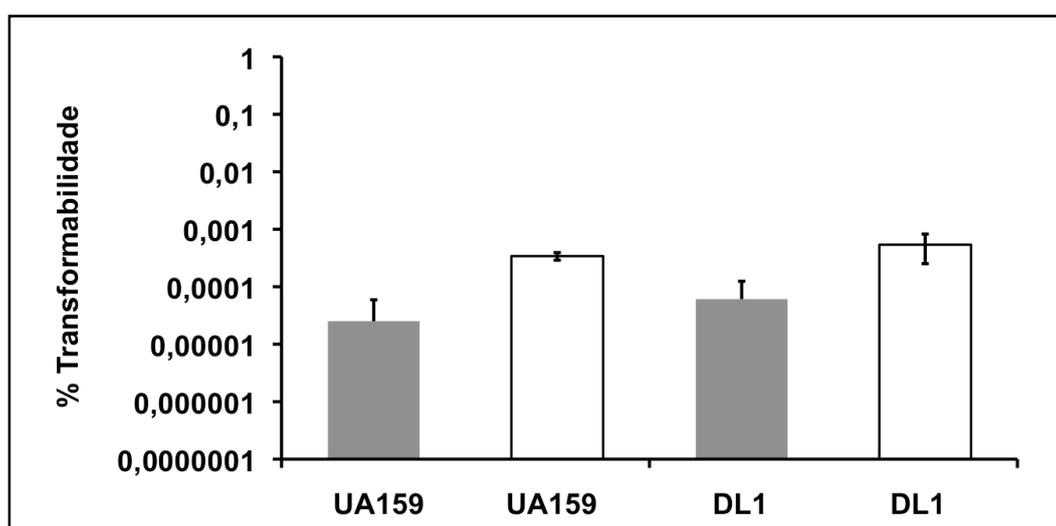
As linhagens UA159 e DL1 foram então comparadas quanto à capacidade de crescimento em meios de cultura com diferentes concentrações de fosfato. Foram testadas quatro concentrações de fosfato, 1mM, 4mM, 10mM e 30mM e em todas as concentrações testadas o mutante DL1 cresceu menos que a linhagem parental. Na concentração de 1mM de fosfato não foi detectado crescimento significativo do mutante DL1 (Figura 12).



**Figura 12.** Curvas de crescimento das linhagens UA159 e DL1 de *S. mutans* em meio FMC com diferentes concentrações de fosfato. A) Curva utilizando 1mM de fosfato; B) Curva utilizando 30mM de fosfato. (●) Linhagem UA159; (▲) Linhagem DL1. Gráficos representam três experimento independentes cada um com três repetições.

#### 4.3.3 Efeito da deleção do gene *pstS* na frequência de transformação de *S. mutans*

A competência natural é uma característica que abrange poucos gêneros dentro das eubactérias, entre eles destacam-se espécies de *Streptococcus*, como o *S. mutans*. Avaliamos o impacto da deleção do gene *pstS* na capacidade de transformação da linhagem DL1 em relação à linhagem parental quando usamos o vetor pMSP3535. Os resultados encontrados mostram que o mutante DL1 não difere da cepa parental UA159 no que diz respeito à frequência de transformação com o vetor pMSP3535 na presença ou ausência do peptídeo CSP que aumenta a capacidade transformante da bactéria (Figura 13).

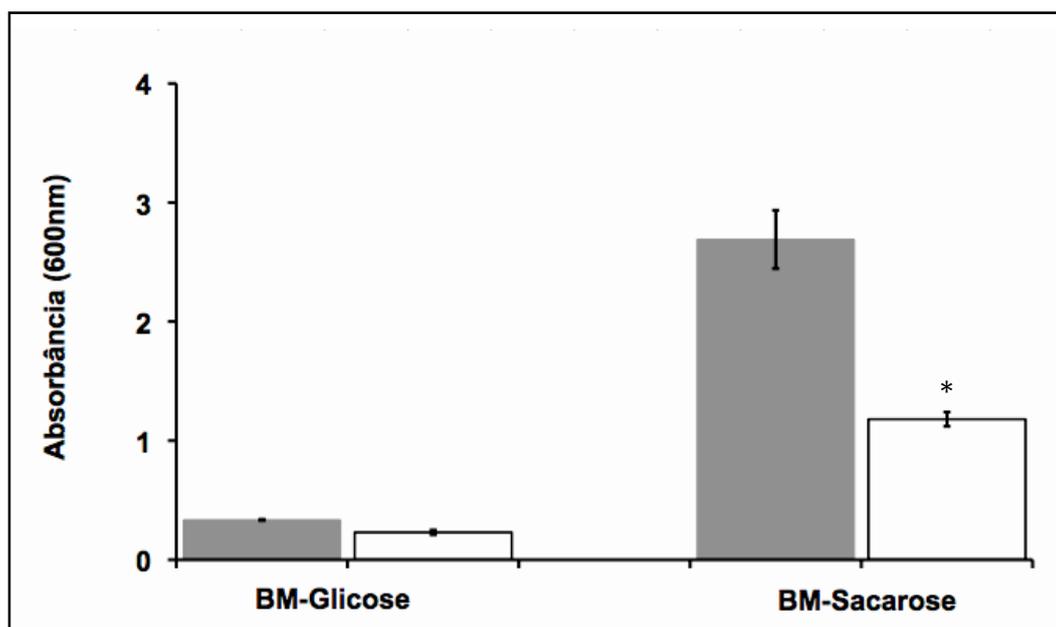


**Figura 13.** Frequência de transformação das linhagens UA159 e DL1 de *S. mutans*. As linhagens foram cultivadas na presença (barras brancas) ou na ausência (barras cinzas) do peptídeo CSP. Os valores são expressos como número de transformantes em relação ao número total de células. Cada valor representa a média e desvio padrão de três experimentos independentes.

#### 4.3.4 Efeito da deleção do gene *pstS* na expressão de fatores relacionados a virulência de *S. mutans*

A capacidade de adesão a superfícies abióticas por meio da produção de biofilme representa o principal fator de virulência do *S. mutans*. Com o intuito de avaliar o impacto da deleção do gene *pstS* na

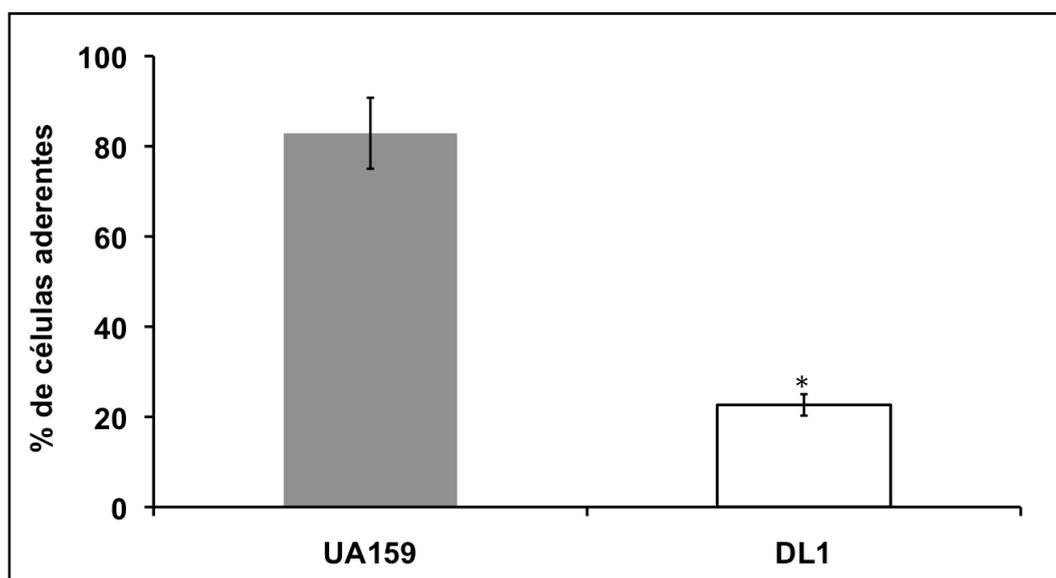
capacidade de *S. mutans* em aderir à superfícies abióticas, comparamos a adesão das linhagens DL1 e UA159 em placas de microtitulação em meios enriquecidos com glicose ou sacarose. Como mostrado na Figura 14, o mutante DL1 mostrou uma redução significativa na capacidade de aderência a superfícies abióticas com relação à linhagem selvagem, quando cultivado na presença de sacarose. Na presença de glicose não observamos diferença significativa na capacidade de adesão entre as linhagens DL1 e UA159.



**Figura 14.** Adesão das linhagens UA159 e DL1 *S. mutans* a superfícies abióticas. Os ensaios foram feitos em placas de microtitulação com bactérias cultivadas em meio BM acrescido com glicose ou sacarose. As barras cinzas representam dados obtidos com a linhagem UA159 e as barras brancas representam os valores encontrados com o mutante DL1. Os valores representam médias e desvios padrão de três experimentos independentes. \* significância estatística ( $p > 0,05$ ).

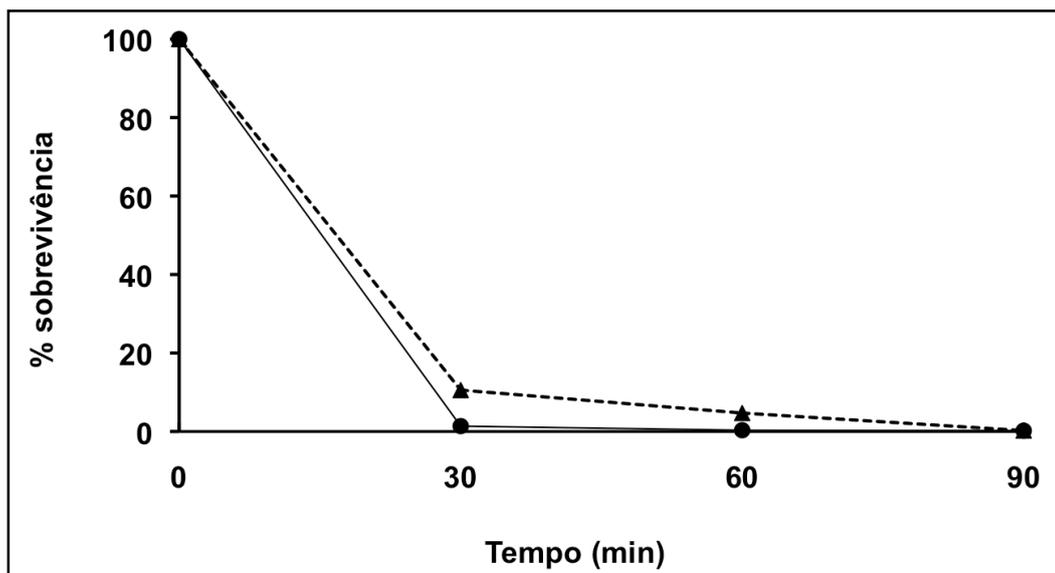
Visto que a mutação no gene *pstS* leva a alteração na capacidade de aderência de *S. mutans*, verificamos a hidrofobicidade de superfície, outro fator que interfere na capacidade do patógeno em aderir aos tecidos do hospedeiro, os valores foram expressos como porcentagem de células bacterianas aderidas ao n-hexadecano, mostrados na Figura 15. O mutante DL1 mostrou-se menos hidrofóbico (% média de células aderidas ao hexadecano =  $21 \pm 1,2$ ) do que a linhagem selvagem (% média de

células aderidas ao hexadecano =  $80 \pm 3,6$ ). A diferença entre as duas linhagem foi estatisticamente significativa.



**Figura 15.** Perfil de hidrofobicidade das linhagens UA159 e DL1 de *S. mutans*. Células foram analisadas na fase logarítmica de crescimento durante cultivo em meio FMC a 37°C em condição capnofílica. Barra representa média de três experimentos independentes, expressos como porcentagem de células aderidas ao n-hexadecano. \* significância estatística ( $p > 0,05$ ).

A sobrevivência em ambiente ácido representa uma característica importante relacionada à virulência de diversas espécies de bactérias patogênicas. O *S. mutans* expressa genes que permitem a sua sobrevivência em condição de baixo pH. Para avaliarmos se a deleção do gene *pstS* afetou sua capacidade em sobreviver em condição de baixo pH, incubamos a linhagem UA159 e o mutante DL1 em meio com pH de 2,85. O resultado encontrado mostrou que a deleção do gene *pstS* levou a um pequeno aumento na resistência ao pH ácido, porém este não foi estatisticamente significativo (Figura 16).

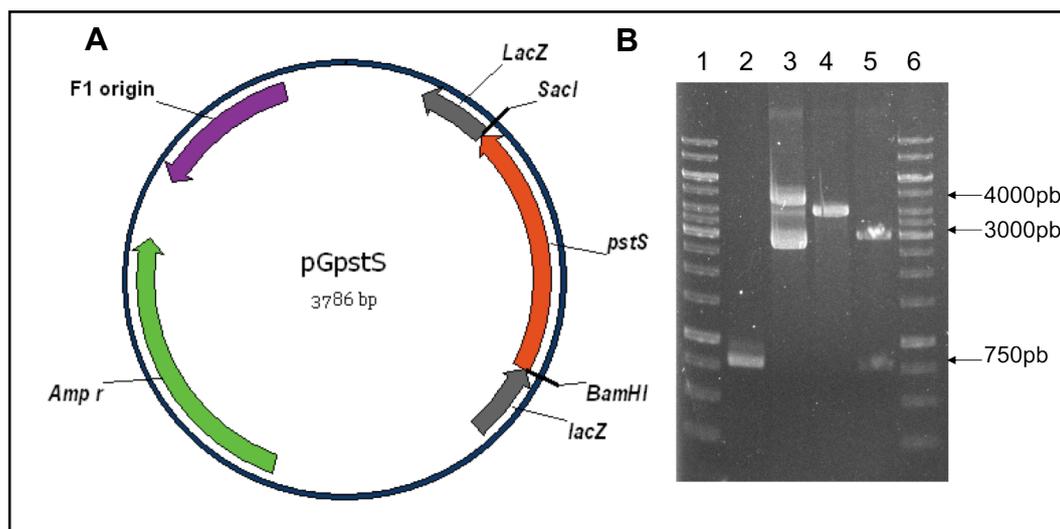


**Figura 16.** Sensibilidade à acidez das linhagens UA159 e DL1 de *S. mutans*. As células das cepas UA159 (●) e DL1 (▲) de *S. mutans* em fase logarítmica de crescimento foram exposta ao pH de 2,6 durante 90 minutos e o número de células viáveis determinado após plaqueamento em meio BHI.

#### 4.4 Obtenção de anticorpos policlonais anti-PstS

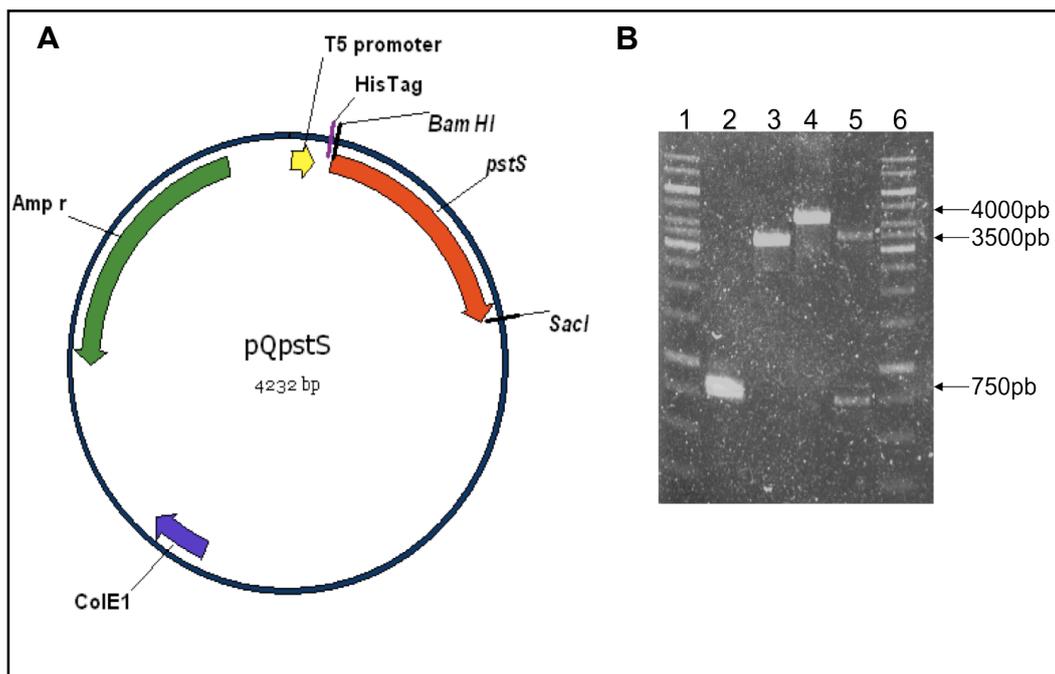
##### 4.4.1 Construção de vetores para expressão da proteína recombinante PstS de *S. mutans*

Para geração de anticorpos e visando futuros estudos sobre a estrutura molecular da proteína PstS, clonamos e expressamos o gene *pstS* de *S. mutans* em linhagens de *E. coli* e *B. subtilis*. O gene foi amplificado e clonado no vetor pGEM T-easy. Após introdução na linhagem de *E. coli* K12 DH10β selecionamos um clone recombinante e o plasmídeo obtido foi denominado pGpstS (Figura 17). A inserção do gene *pstS* no vetor foi confirmada por análise de restrição.

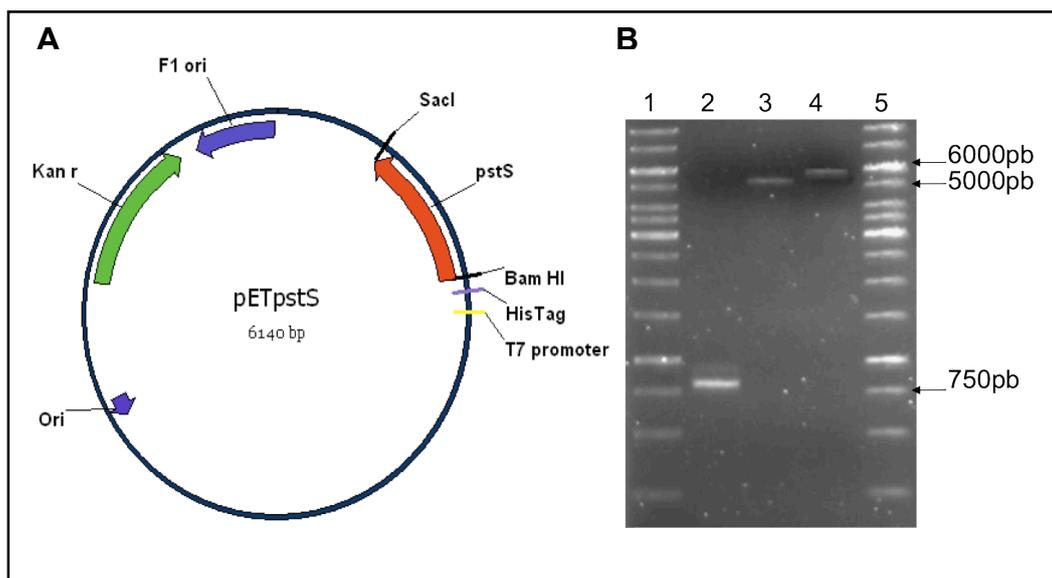


**Figura 17.** Clonagem do gene *pstS* no vetor pGEM-Teasy. (A) Representação esquemática do plasmídeo pGpstS. A origem de replicação, os genes bem como os sítios de restrição mais relevantes estão indicados na figura. (B) Análise eletroforética em gel de agarose dos fragmentos gerados após restrição do plasmídeo pGpstS. 1) 1kb ladder; 2) gene *pstS* amplificado; 3) plasmídeo pGpstS íntegro; 4) pGpstS linearizado com *Sacl* (fragmento de 4.000pb); 5) pGpstS digerido com as enzimas *BamHI* e *Sacl*, nota-se a presença de 2 fragmentos, um de 3kb (pGEM T-easy) e um de 750pb (gene *pstS*); 6) 1kb ladder.

A partir do vetor pGpstS, subclonamos o gene *pstS* nos vetores de *E. coli* pQE-30 e pET28a, e as construções foram denominadas pQpstS, pETpstS, respectivamente (Figuras 18 e 19). Os plasmídeos recombinantes foram analisadas por digestão com as enzimas *BamHI* e *Sacl* e sequenciamento automático. Para as duas construções confirmamos a clonagem precisa do gene *pstS* de *S. mutans*.

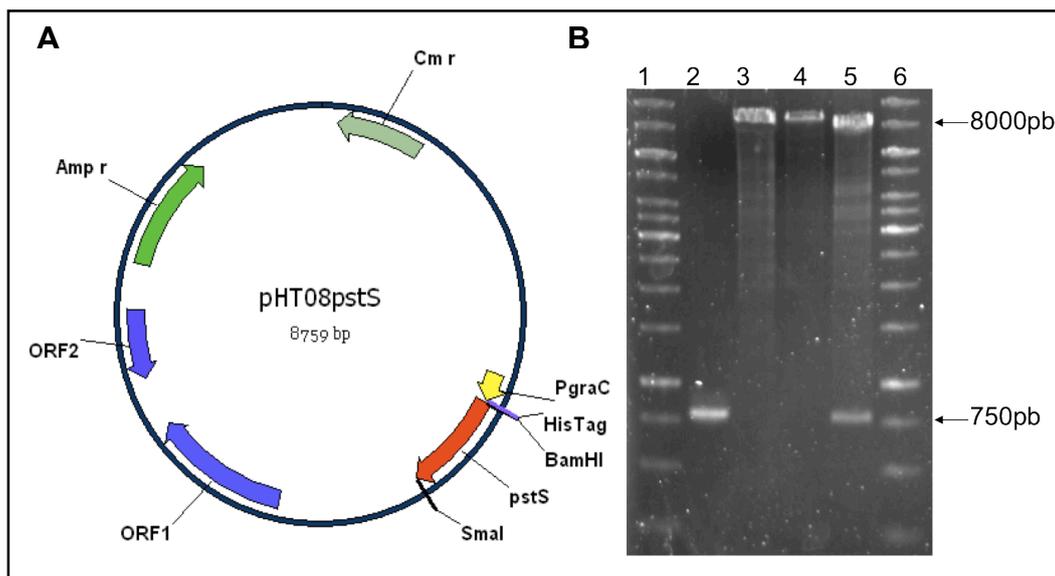


**Figura 18.** Construção do plasmídeo pQpstS a partir da subclonagem do gene *pstS* no vetor pQE-30. (A) Representação esquemática do plasmídeo pQpstS. A origem de replicação, os genes relevantes bem como os sítios de restrição do gene estão indicados na figura. (B) Análise eletroforética em gel de agarose dos fragmentos gerados após restrição do plasmídeo pQpstS. 1) 1kb ladder; 2) gene *pstS* purificado a partir do vetor pGpstS; 3) pQE-30 linearizado com *SacI* (fragmento de 3,5kb); 4) pQpstS linearizado com *SacI* (~4,2kb); 5) pQpstS digerido com as enzimas *Bam*HI e *SacI*, nota-se a presença de 2 fragmentos, um maior de 3,5kb (pQE-30) e um menor de 750pb (gene *pstS*); 6) 1kb ladder.



**Figura 19.** Construção do plasmídeo pETpstS, obtido com a inserção do gene *pstS* no vetor pET-28a. (A) Representação esquemática do plasmídeo pETpstS. A origem de replicação, os genes relevantes bem como os sítios de restrição do gene estão representados. (B) Análise eletroforética, por gel de agarose do perfil de restrição do plasmídeo pETpstS. 1) 1Kb ladder; 2) gene *pstS* purificado do vetor pGpstS; 3) pET-28a linearizado com *Sacl* (5Kb); 4) pETpstS linearizado com *Sacl* (fragmento de ~5,7Kb); 5) 1Kb ladder.

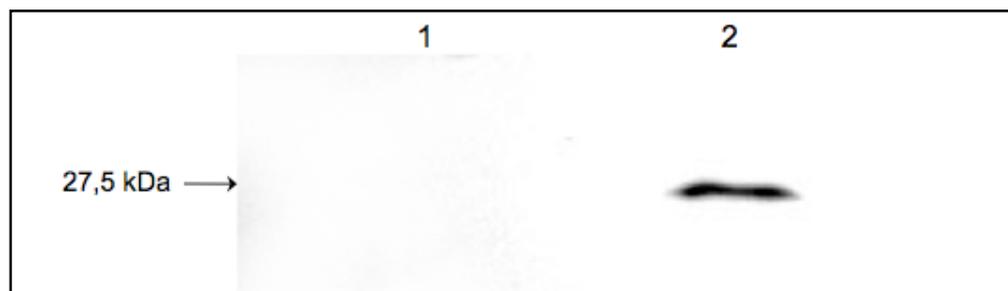
O gene *pstS* de *S. mutans* também foi clonado em um vetor de expressão em *Bacillus subtilis*. Utilizamos o vetor pHT08 e posterior introdução na linhagem *B. subtilis* WB800. Essa clonagem originou o vetor denominado pHT08pstS e a linhagem denominada BsHT (Figura 20). A confirmação da subclonagem foi feita com DNA plasmidial dos clones recombinantes e digestão com as enzimas *Bam*HI e *Sma*I.



**Figura 20.** Construção do plasmídeo pHT08pstS, obtido com a inserção do gene *pstS* de *S. mutans* no vetor pHT08. (A) Representação esquemática do plasmídeo pHT08pstS. A origem de replicação, os genes relevantes bem como os sítios de restrição do gene estão representados. (B) Análise eletroforética, por gel de agarose do perfil de restrição do plasmídeo pHT08pstS. 1) 1Kb ladder (O'Gene Ruler™ -Fermentas-); 2) gene *pstS* purificado a partir do vetor pQpstS; 3) pHT08pstS linearizado com *Bam*HI (fragmento de ~8,7Kb); 4) pHT08 linearizado com *Bam*HI (8Kb); 5) pHT08pstS digerido com as enzimas *Bam*HI e *Sma*I, nota-se a presença de 2 fragmentos, um maior de 8Kb (pHT08) e um menor de 750pb (gene *pstS*); 6) 1Kb ladder.

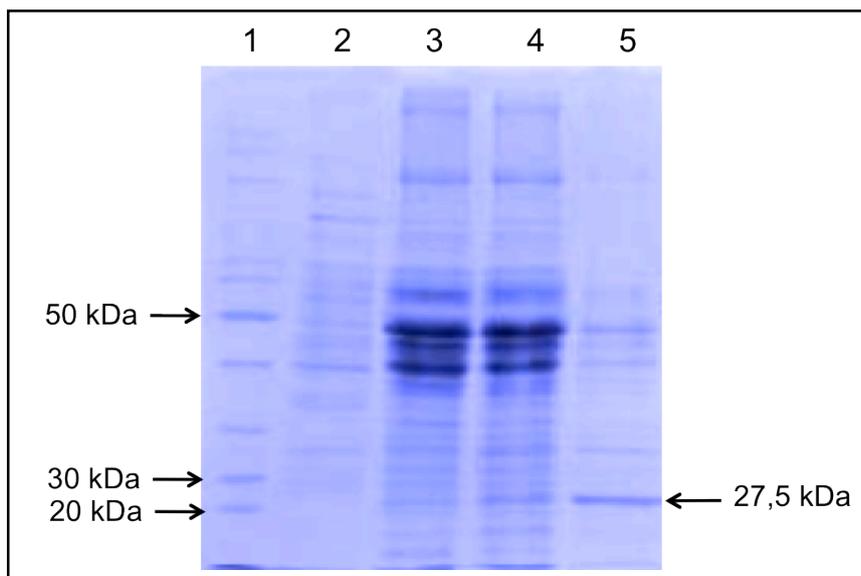
#### 4.4.2 Expressão da proteína PstS em *E. coli* e *B. subtilis*

Tentativas iniciais de expressão da proteína PstS em *E. coli* transformada com o plasmídeo pQpstS (EcoXLPQ) não resultaram no esperado. De forma semelhante não tivemos sucesso na expressão da proteína recombinante em linhagens de *E. coli* transformadas com o vetor pETPstS. Por outro lado, tentativas de expressão da proteína PstS de *S. mutans* na linhagem de *B. subtilis* W800 foram bem sucedidas. Embora não visível em géis de poliacrilamida corados com azul de comassie, a proteína PstS foi detectada em extratos da linhagem BsHT após revelação com anticorpos específicos para a cauda de histidina presente na proteína PstS recombinante (Figura 21).

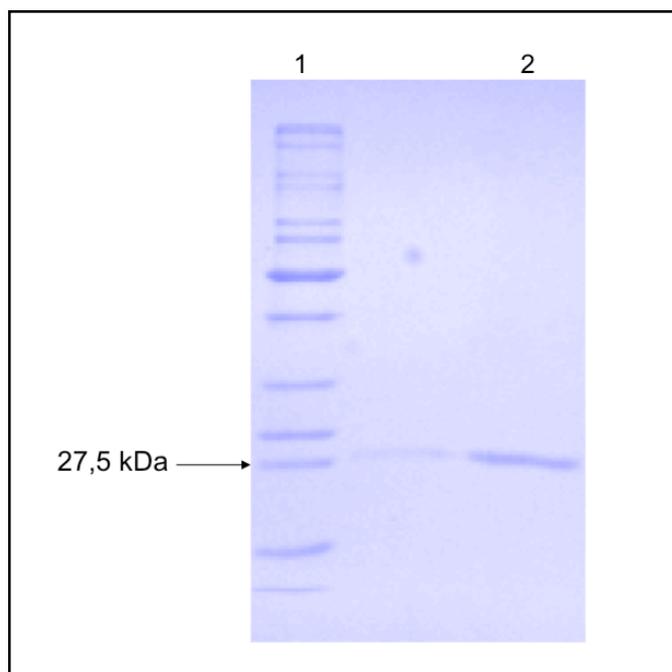


**Figura 21.** Imunodeteção da proteína recombinante PstS de *S. mutans* expressa por linhagem de *B. subtilis*. 1) Extrato total de *B. subtilis* WB800 recombinante antes da indução com IPTG; 2) Extrato total *B. subtilis* recombinante após indução com IPTG. A proteína recombinante foi detectada com anticorpo anti-Histag específico. A seta indica a posição e massa molecular da proteína PstS recombinante.

A proteína PstS expressa na linhagem BsHT foi purificada por cromatografia de afinidade ao níquel em função da presença da cauda de histidina fusionada à proteína heteróloga. A proteína foi obtida na forma solúvel após eluição com 150mM de imidazol mas várias proteínas contaminantes estavam presentes na amostra (Figura 22). Para a obtenção de uma proteína pura o suficiente para gerar anticorpos específicos, a proteína recombinante foi eletroeluída do gel de poliacrilamida como descrito em materiais e métodos (Figura 23). A preparação obtida por eletrodialise mostrou-se livre de contaminantes embora pouco concentrada (334,44  $\mu\text{g/mL}$ ). No entanto, foi possível utilizá-la para a imunização de camundongos e obtenção de anticorpos policlonais anti-PstS monoespecíficos.



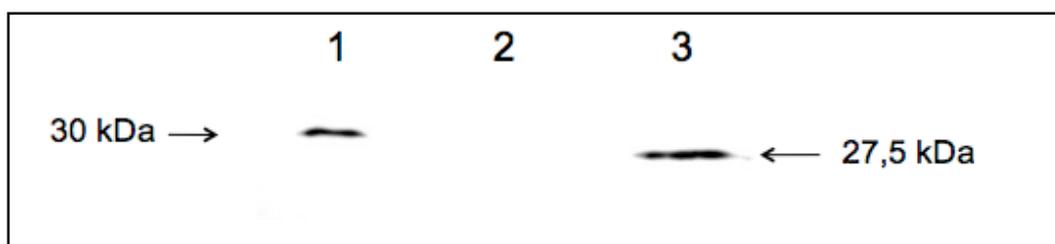
**Figura 22.** Purificação da proteína recombinante PstS de *S. mutans*. Amostras analisadas em SDS-PAGE em gel de poliacrilamida. 1) Marcador molecular de proteínas (PageRuler™ - Fermentas®, Glen Burnie, Maryland, USA); 2) Fração obtida com 90 mM de imidazol; 3) Fração obtida com 110mM de imidazol; 4) Fração obtida com 130mM de imidazol; 5) Fração da proteína PstS obtida com 150mM de imidazol.



**Figura 23.** Purificação da proteína recombinante PstS por eletroeluição. Amostras analisadas em SDS-PAGE em gel de poliacrilamida: 1) Marcador molecular de proteínas (PageRuler); 2) Frações da proteína purificada após eletroeluição.

#### 4.4.3 Geração dos anticorpos policlonais anti-PstS em camundongos

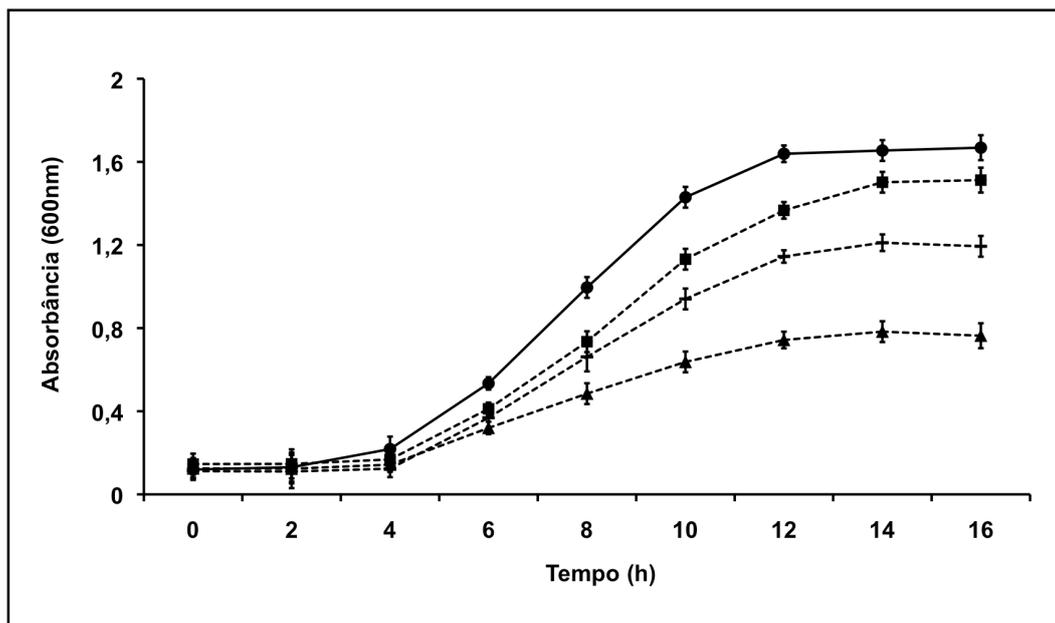
Camundongos Balb/c foram imunizados com quatro doses (50mcg/dose) da proteína purificada PstS por via subcutânea com adjuvante completo de Freud na primeira dose e adjuvante incompleto de Freud nas doses seguintes. O soro obtido dos animais após a imunização atingiu título de 21.000 quando testado frente à proteína pstS recombinante. O soro obtido foi testado quanto à especificidade em *Western blots*. Como mostrado na Figura 24, os anticorpos gerados detectaram de forma específica a proteína PstS em extrato de proteínas totais de *S. mutans* UA159. Como esperado, não detectamos a proteína PstS em extrato de proteínas totais da linhagem mutante DL1.



**Figura 24.** Imunodeteccção com anticorpos anti-PstS específicos. A proteína PstS de *S. mutans* é detectada com anticorpos produzidos em camundongos imunizados com a proteína PstS recombinante. Amostras: 1) Extrato total de *S. mutans* UA159, 2) Extrato total de *S. mutans* DL1, 3) Proteína PstS recombinante.

#### 4.4.4 Efeito de anticorpos anti-PstS no crescimento de *S. mutans*

Para avaliarmos possíveis efeitos bactericida do anticorpo policlonal anti-PstS, incubamos células da linhagem UA159 com o diferentes diluições deste soro. Como controle, o mesmo ensaio foi realizado com soro de animais imunizados com extrato celular de *B. subtilis*. Os resultados encontrados indicam que a incubação da linhagem UA159 com anticorpos anti-PstS resultou na perda de viabilidade das células de forma dose-dependente (Figura 25).



**Figura 25.** Efeito do soro anti-PstS sobre o crescimento da linhagem de *S. mutans* UA159. (●) UA159 incubada com soro anti-*B. subtilis* (1:250) como controle; (■) UA159 incubada com soro anti-PstS na diluição de 1:1000; (-) UA159 incubada com soro Anti-PstS na diluição de 1:500; (◆) UA159 incubada com soro anti-PstS na diluição de 1:250. Cada curva representa três experimentos independentes.

## 5 DISCUSSÃO

O sistema Pst de transporte de fosfato inorgânico é responsável pela captação de Pi quando há carência deste no meio extracelular (PRATT et al., 2010). Os genes que codificam esse transportador tem sua regulação de transcrição dependente do sistema de dois componentes PhoB/PhoR, conhecido por regular cerca de 33 genes em *E. coli* relacionados com a incorporação de fosfato extracelular, sendo denominado regulon Pho (WANNER, 1993; ORIHUELA et al., 2001; WANNER, 1993).

Neste trabalho apresentamos pela primeira vez, dados que demonstram a interação do sistema Pst de transporte com a virulência do patógeno oral *S. mutans*, agente etiológico da cárie dental que se encontra também associado a algumas doenças sistêmicas como a endocardite bacteriana. (NOMURA et al., 2006; NEMOTO et al., 2008; BANAS, 2004).

Partindo da análise *in silico*, verificamos a presença de um óperon *pst* completo no genoma de *S. mutans* UA159, composto por seis cístrons: *pstS* que codifica uma proteína ligadora de fosfato, *pstC1* e *pstC*, proteínas transmembrânicas formadoras do poro responsável pela entrada do nutriente, *pstB* e *smu.1134* proteínas ligadoras de nucleotídeo, e *phoU* que não possui um papel no transporte de fosfato, mas parece participar da regulação e controle da expressão do regulon Pho (ADÍJC et al., 2002; STEED et al., 1993).

O óperon encontrado no genoma de *S. mutans* UA159 possui homologia com *E. coli* e espécies de *Streptococcus* não habitantes da cavidade oral, como foi demonstrado pela análise de identidade das proteínas codificadas pelos óperons *pst*. O sistema Pst também apresentou uma maior variação nos valores de identidade quando da análise de seu componente ligador (uma característica comum dos ABC transportadores), PstS, o qual apresentou maiores valores de conservação em relação ao ortólogo encontrado em *S. sanguinis*, um habitante saprófita do mesmo nicho de colonização, a cavidade oral. A homologia observada não se apresenta apenas na sequência de

aminoácidos, mas também na conservação organizacional deste óperon. Análise prévia do genoma de *S. pneumoniae* R6 realizada pelo grupo liderado pelo Dra. Tuomanen corrobora os achados do recente trabalho, com a ressalva que essa linhagem em particular apresenta apenas uma cópia do gene codificador do domínio ligador de nucleotídeos (NOVAK et al., 1999).

A conservação de sequência e organização do óperon *pst* entre as bactérias analisadas é um indício da importância desse componente para a sobrevivência nesse gênero bacteriano. Com o intuito de aprofundar os estudos dessa hipótese buscamos avaliar a presença do domínio ligador do sistema Pst entre cepas clínicas e laboratoriais de *S. mutans* disponíveis na bacterioteca do laboratório. Essa análise nos apresentou mais um indício da importância desse sistema nessa espécie bacteriana, pois 100% das amostras analisadas amplificaram o gene *pstS* por PCR, diferentemente do encontrado para outros transportadores da família ABC (NEPOMUCENO et al., 2007). Esse dado é curioso quando levamos em conta que a cavidade oral é um ambiente com altas concentrações de fosfato, presente não apenas na saliva, mas também pela liberação causada pela ionização da hidroxiapatita promovida pelo ácido produzido pelo metabolismo de *S. mutans*, o que leva a um microambiente com inibição constante da transcrição do sistema Pst teoricamente (GARCÍA-GODOY et al., 2008; LUOMA, 1968). Uma das hipóteses que explicam essa característica aparentemente dúbia está na importância que um sistema de alta afinidade poderia apresentar nas infecções extra-orais causadas por essa bactéria, como a endocardite, na qual a concentração de Pi não é alta (HORAUD et al., 1984). Um trabalho que respalda essa possibilidade foi realizado em *S. pneumoniae* no qual a deleção de *pstS* reduziu a capacidade de crescimento e sobrevivência dessa bactéria em peritônio de modelo murino (ORIHUELA et al., 2001). Outra hipótese é a de que nessa bactéria esse sistema pode não responder ao fosfato extracelular, como descrito em *S. pneumoniae* Rx6 no qual não houve alteração nos níveis de expressão do óperon *pst* com relação a diferentes concentrações de fosfato (NOVAK et al., 1999).

Um mutante de *S. mutans* com deleção do gene *pstS* por substituição com um cassete não polar de canamicina foi obtido por mutagênese sítio dirigida para permitir a confirmação da informação predita *in silico*, de que esse óperon codifica um transportador de Pi. A escolha por um cassete não polar foi realizada para assegurarmos que as respostas experimentais observadas se correlacionam apenas com a ausência de *pstS*, sem envolvimento de genes à jusante do promotor (AHN et al., 2005). A ausência da proteína ligadora de fosfato, PstS, no mutante DL1 levou a uma diminuição significativa da capacidade de captação de ortofosfato, comprovando o papel deste óperon no transporte de Pi. Porém a diminuição mostrada pelo mutante foi de cerca de 50%, sugerindo portanto a existência de um sistema alternativo de captação em baixas concentrações de Pi. Dados similares já foram observados em outras espécies como *E. coli* e seu sistema Pit de captação (WILLSKI et al., 1980; JACKSON et al., 2008). Em *Mycobacterium smegmatis*, um segundo sistema de captação com alta afinidade a Pi foi caracterizado. O sistema Phn pertencente a família de transportadores ABC atua em baixas concentrações de fosfato (GEBHARD et al., 2006). Além disso, sistemas não específicos para incorporação de fosfato podem auxiliar na captação deste nutriente quando sistemas específicos estão ausentes, como os representado pelos sistemas baseados em troca aniônica do tipo simporte, como o GlpT (transportador de sn-glicerol-3-P) e o UhpT (transportador de glucose-6-P) ambos conhecidos em *E. coli* e também considerados sistemas secundários, como o Pit, com a diferença de que esses sistemas captam compostos fosfatados e não fosfato inorgânico (VAN VEEN, 1997).

Ao compararmos o perfil de crescimento da cepa DL1 em relação a linhagem UA159 de *S. mutans* em meio definido com diferentes concentrações de fosfato, notamos que houve uma redução significativa na taxa de replicação celular, mesmo em concentração de Pi consideradas altas como 30mM, o que sugere uma possível alteração em aspectos fisiológicos da bactéria. Deficiências semelhantes foram relatadas em estudos anteriores em diferentes bactérias. A linhagem mutante *pstB* de *S. pneumoniae* R6 dobrou seu tempo de geração quando

comparado à linhagem selvagem, mesmo em concentração de fosfato considerada ótima (NOVAK et al., 1999). Perfil de redução similar foi observada em *Proteus mirabilis* quando incubado em baixas concentrações de fosfato, apesar dessa alteração não ser suficiente para atenuar a bactéria *in vivo* (JACOBSEN et al., 2008). O mutante *pstS* de *Mycobacterium smegmatis* também mostrou deficiência de crescimento quando cultivado em meio contendo 10 mM de fosfato inorgânico (GEBHARD et al., 2006). Mutantes *pstC* e *pstA* de *Pseudomonas aureofaciens* também tiveram taxas de crescimento mais reduzido quando comparadas com a linhagem selvagem (MONDS et al., 2001).

Além do papel na captação de nutriente, o sistema Pst possui um efeito pleiotrópico na célula. Tal característica deve estar associada a importância que o fosfato possui no metabolismo, pois faz parte de uma ampla variedade de metabólitos, compostos moleculares de modificações pós-traducionais e de moléculas que atuam em vias de sinalização intracelular. O fosfato também possui papel fundamental na expressão de genes do regulon Pho já que atua como seu repressor (SOUALHINE et al., 2005; NOVAK et al., 1999). Partindo desse princípio avaliamos a interferência do sistema Pst em características importantes para a virulência e sobrevivência de *S. mutans*.

O primeiro aspecto analisado foi a frequência de transformação de *S. mutans*, uma característica inerente desse gênero bacteriano e particularmente importante para a espécie que se encontra em um nicho com alta concentração celular e, portanto, com uma variabilidade genética importante (STEWART et al., 2008; YOSHIDA et al., 2002; RICKARD et al., 2003). Diferentemente do relato da literatura para *S. pneumoniae* R6, no qual a mutação em *pstB* levou à diminuição da frequência de transformação, não houve diferença significativa da frequência de transformação da cepa DL1 em relação a UA159 de *S. mutans*, independente da presença do peptídeo de estímulo à competência (NOVAK et al., 1999).

Com relação à capacidade de aderência à superfície abiótica, um dos fatores de virulência mais relevantes para *S. mutans*, a cepa mutante DL1 apresentou uma redução significativa quando da utilização de

sacarose como fonte de carbono em relação ao *S. mutans* UA159. A sacarose é o principal açúcar envolvido na aderência desta bactéria, por ser o elemento primordial utilizado pelas enzimas GTFs para produção dos PECs e maturação do biofilme. Esse dado demonstra pela primeira vez a relação entre um transportador ABC e a capacidade de aderência de *S. mutans* (NEPOMUCENO et al., 2007). No entanto a resposta é corroborada pelos dados observados em outros gêneros bacterianos, como *P. aureofaciens* na qual a deleção dos genes *pstC* e *pstA* levou à incapacidade na produção de biofilme em PVC, devido à incapacidade em reprimir o regulon Pho, um regulador negativo da produção de biofilme nessa espécie (MONDS et al., 2001). Outro importante exemplo foi descrito em *Proteus mirabilis* no qual também ocorre uma regulação negativa da produção de biofilme pelo sistema Pst, sendo os mutantes no óperon atenuados em modelos de infecção urinária *in vivo*, o que demonstra o papel deste sistema na patogênese desse microrganismo (O'MAY et al., 2009).

Grupos de pesquisa têm sugerido que as propriedades hidrofóbicas das bactérias podem ser um importante fator em sua aderência aos tecidos do hospedeiro (GIBBONS et al., 1983). Em nossa avaliação, o mutante DL1 mostrou menor taxa de partição ao n-hexadecano em relação à linhagem selvagem, o que sugere uma redução da presença de moléculas ou proteínas de superfície capazes de promover interações hidrofóbicas, o que pode prejudicar sua aderência à saliva. Estudos anteriores sugerem que essas interações hidrofóbicas possuem um importante papel na adesão de uma variedade de bactérias orais à película salivar (GIBBONS et al., 1983).

Por fim analisamos a capacidade de resistência ao pH ácido, fator importante para a sobrevivência de *S. mutans* no microambiente da placa dental, e essencial para a formação da cárie dental (LEMOS et al., 2004). Um leve aumento na sobrevivência ao pH ácido foi observado na linhagem mutante em relação à selvagem, o que poderia interferir positivamente na virulência dessa bactéria, porém além deste efeito não se mostrar estatisticamente significativo, as perdas na capacidade de

adesão suplantariam a vantagem na aciduricidade promovida pela mutação no sistema Pst.

Em outra vertente do trabalho, promovemos a clonagem, expressão e purificação do domínio ligador de substrato, visando à obtenção de anticorpos policlonais mono-específicos. O sistema mais bem sucedido nesse trabalho foi a expressão de PstS em linhagens de *Bacillus subtilis* WB800, seguida de purificação por HPLC e eletroeluição da proteína em géis de policrilamida. A falha nas tentativas de expressão em modelos laboratoriais consagrados baseados em vetores de *E. coli* pode ser explicada pela diferença no *codon usage* de *S. mutans* em relação à bactéria gram-negativa.

Os anticorpos policlonais anti-PstS obtidos pela purificação de PstS tiveram sua especificidade confirmada por imunodeteção, comprovando ser específico para a proteína de *S. mutans*. Sua utilização foi focada em testes que demonstraram uma alteração no crescimento de *S. mutans* UA159, quando de sua presença, de maneira dose dependente, sugerindo uma ação protetora deste soro contra *S. mutans* UA159, contrariando resultados obtidos em *S. pneumoniae* onde o soro anti-PstS não foi protetor nas linhagens testadas em modelos *in vivo* (ORIHUELA et al., 2001). Apesar de promissores, os resultados ainda são parciais e exigem testes em modelos *in vivo* para confirmarmos o possível papel protetor de anticorpos anti-PstS

## 6 CONCLUSÕES

- *S. mutans* UA159 possui uma única cópia do óperon *pst* contendo seis cístrons que codificam um sistema de captação de fosfato. Esse óperon é homólogo ao encontrado em *E. coli*, assim como em outras espécies do gênero *Streptococcus*, além de possuir uma organização conservada no gênero;
- O gene *pstS* está presente em todas as linhagens clínicas e laboratoriais de *S. mutans* testadas;
- A captação de fosfato foi reduzida parcialmente na cepa DL1 indicando a atuação de um sistema alternativo independente de Pst;
- A deleção do gene *pstS* leva a um crescimento deficiente mesmo em concentração de fosfato considerada alta como 30 mM;
- O mutante DL1 não apresentou alteração na frequência de transformação, independente da presença de CSP;
- A linhagem mutante teve a capacidade de adesão e perfil hidrofóbico de superfície diminuído, o que prejudicaria a colonização e a formação de biofilme;
- A linhagem DL1 mostrou capacidade de resistência ao pH ácido aumentada em relação à selvagem, porém de maneira não significativa;
- A proteína PstS foi expressa e purificada com sucesso e anticorpos policlonais foram obtidos em camundongos BALB/C;
- Os anticorpos anti-PstS produzidos mostraram uma ação de redução de crescimento sobre *S. mutans* UA159
- Os resultados sugerem que o sistema Pst de transporte apresentasse relevante para a sobrevivência e virulência de *S. mutans*, mesmo na presença de sistemas alternativos de transporte de Pi.

**REFERÊNCIAS \***

AGUENA, M.; YAGIL, E.; SPIRA, B. Transcriptional analysis of the *pst* óperon of *Escherichia coli*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 268, n. 4, p. 518-524, 2002.

AJDÍC D.; MCSHAN, W. M.; MCLAUGHLIN, R. E.; SAVIC, G.; CHANG, J.; CARSON, M. B.; PRIMEAUX, C.; TIAN, R.; KENTON, S.; J. I. A. H.; LIN, S.; QIAN, Y.; LI, S.; ZHU, H.; NAJAR, F.; LAI, H.; WHITE, J.; ROE, B. A.; FERRETI, J. J. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 99, n. 22, p.14494-14439, 2002.

AHN, S. J.; LEMOS, J. A.; BURNE, R. A. Role of HtrA in growth and competence of *Streptococcus mutans* UA159. **Journal os Bacteriology**, v.187, n. 9, p. 3028-3038, 2005.

ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D.J. Gapped BLAST and PSI-BLASP: a new generation of protein database search programs. **Nucleics Acids Research**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.

AMBUDKAR, S. V.; LARSON, T. J.; MALONEY, P. C. Reconstitution of sugar phosphate transport systems of *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 261, n. 20, p. 9083–9086, 1986.

ANAGNOSTOPOULOS, C.; SPIZIZEN, J. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 81, n. 5, p. 741-746, 1961.

BAHRANI-MOUGEOT, F. K.; BUCKLES, E.; LOCKATELL, C. V.; HEBEL, J. R.; JOHNSON, D. E.; TANG, C. M.; DONNENBERG, M. S. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1079-1093, 2002.

BANAS, J. A. Virulence properties of *Streptococcus mutans*. **Frontiers in Bioscience**, v. 9, p. 1267-1277, 2004.

---

\* De acordo com:

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

BATISSON, I.; GUIMOND, M. P.; GIRARD, F.; AN, H.; ZHU, C.; OSWALD, E.; FAIRBROTHER, J. M.; JACQUES, M.; HAREL, J. Characterization of the novel factor *paa* involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8. P. 4516-4525, 2003.

BERLUTTI, F.; AJELLO, M.; BOSSO, P.; MOREA, C.; PETRUCCA, A.; ANTONINI, G.; VALENTI, P. Both lactoferrin and iron aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. **BioMetals**, v. 17, n. 3, p. 271-278, 2004.

BOWEN, W. H.; SCHILLING, K. M.; GIERTSEN, E.; PERSON, S.; LEE, S. F.; BLEIWEIS, A. S.; BEEMAN, D. Role of a cell surface-associated protein in adherence and dental caries. **Infection and Immunity**. V. 59, n. 12, p. 4606-4609, 1991.

BRANDL, C. J.; DEBER, C. M. Hypothesis about the function of membrane-buried proline residues in transport proteins. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 83, n. 4, p. 917-921, 1986.

BRYAN, E. M.; BAE, T.; KLEEREBEZEN, M. DUNNY, G. M. Improved vectors for nisin-controlled expression in gram-positive bacteria. **Plasmid**, v. 44, n. 2, p. 183-190, 2000.

BUCKLES, E. L.; WANG, X.; LOCKATELL, C. V.; JOHNSON, D. E.; DONNENBERG, M. S. PhoU enhances the ability of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 to colonize the murine urinary tract. **Microbiology**, v. 152, n. 1, p. 153-160, 2006.

BURALL, L. S.; HARRO, J. M.; LI, X.; LOCKATELL, C. V.; HIMPSL, S. D.; HEBEL, J. R.; JOHNSOS, D. E.; MOBLEY, H. L. T. *Proteus mirabilis* genes that contribute to pathogenesis of urinary tract infection: identification of 25 signature-tagged mutants attenuated at least 100-fold. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 5, p. 2922-2938, 2004.

BURNE, R. A.; SCHILLING, K.; BOWEN, W. H.; YASBIN, R. E. Expression, purification, and characterization of an exo- $\beta$ -D-fructosidase of *Streptococcus mutans*. **Journal of Bacteriology**, v. 169, n. 10, p. 4507-4517, 1987

BURNE, R.A. Oral streptococci...products of their environment. **Journal of Dental Research**, v. 77, n. 3, p. 445-452, 1998.

BULLOCK, P. A. XL1-blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. **Bio Techniques**, v.5, p. 376-379, 1987.

CROWLEY, P. J.; BRADY, L. J.; MICHALEK, S. M.; BLEIWEIS, A. S. Virulence of a *spaP* mutant of *Streptococcus mutans* in a gnotobiotic rat model. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 3, p. 1201-1206, 1999.

DAIGLE, F.; FAIRBROTHER, J. M.; HAREL, J. Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 12, p. 4924-4927, 1995.

DASSA, E. ABC transport. In: LEDDENBERG, J. **Encyclopedia of microbiology**. v.1, p. 1-12, 2000.

DURFEE, T.; NELSON, R.; BALDWIN, S.; PLUNKETT, G. 3RD.; BURLAND, V.; MAU, B.; PETROSINO, J. F.; QIN, X.; MUZNY, D. M.; AYELE, M.; GIBBS, R. A.; GSÖRGO, B.; PÓSFAL, G.; WEINSTOCK, G. M.; BLATTNER, F. R. 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, 2008.

EIGLMEIER, K.; BOOS, W.; COLE, S. T. Nucleotide sequence and transcriptional startpoint of the *glpT* gene of *Escherichia coli*: extensive sequence homology of the G-3-P transport protein with components of the H-6-P transport system. **Molecular Microbiology**, v. 1, p. 251-258, 1987.

ELASHVILI, I; DEFRANK, J. J.; CULOTTA, V. C. *phnE* and *glpT* genes enhance utilization of organophosphates in *Escherichia coli* K-12. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 7, p. 2601-2608, 1998.

ELVIN, C. M.; DIXON, N. E.; ROSENBERG, H. Molecular cloning of the phosphate (inorganic) transport (*pit*) gene of *Escherichia coli* K-12. Identification of the *pit* gene product and physical mapping of the *pit-gor* region of the chromosome. **Molecular and General Genetics**, v. 204, p. 477-484, 1986.

GARCÍA-GODOY, F.; HICKS, M. J.; Maintaining the integrity of the enamel surface: The role of dental biofilm, saliva and preventive agents in enamel demineralization and remineralization. **The Journal of the American Dental Association**, v. 139, p. 25-34, 2010.

GEBHARD, S.; TRAN, S. L.; COOK, G. M. The Phn system of *Mycobacterium smegmatis*: A second high-affinity ABC-transporter for phosphate. **Microbiology**, v. 152, n. 11, p. 3453-3464, 2006.

GIBBONS, R. J.; ETHERDEN, I. Comparative hydrophobicities of oral bacterial and their adherence to salivary pellicles. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 3, p. 1190-1196, 1983.

HAMADA, S.; SLADE H. D. Biology, immunology and carcinogenicity of *Streptococcus mutans*. **Microbiology Review**, v. 44, n. 2, p. 331-384, 1980.

HAMADA, S., KOGA, T., OOSHIMA, T. Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **Journal of Dental Research**, v. 63, n.3, p. 407-411, 1984.

HARDIE, J. M. Oral Microbiology: Current Concepts in the microbiology of dental carie and periodontal disease. **Brazillian Dental Journal**, v. 172, n. 7, p. 271-278, 1992

HAROLD, F. M. **The vital force**: a study of bioenergetics. New York: Free- man WH & Company, 1986

HIGGINS, C. F. ABC transporters: from microorganisms to man. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 8, p. 67-113, 1992.

HIGGINS, C. F. ABC transporters: phisiology, structure and mechanism – an overview. **Research in Microbiology**, v. 152, n. 3-4, p. 205-210, 2001.

HORAUD, T.; DELBOS, F. Viridans streptococci in infective endocarditis: species distribution and susceptibility to antibiotics. **European Heart Journal**, v. 5, p. 39-44, 1984.

JACKSON, R. J.; BINET, M. R. B.; LEE, L.; MA, R.; GRAHAN, A. I.; MCLEOD, C. W.; POOLE, R. K. Expression of the PitA phosphate/metal transporter of *Escherichia coli* is responsive to zinc and inorganic phosphate levels. **FEMS Microbiology Letters**, v. 289, n. 2, p. 219-224, 2008.

JACOBSEN, S. M.; LANE, M. C.; HARRO, J. M.; SHIRLIFF, M. E.; MOBLEY, H. L. The high-affinity phosphate transporter Pst is a virulence factor for *Proteus mirabilis* during complicated urinary tract infection. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 52, n. 2, p.180-193, 2008.

KEEN, J. N.; FINDLAY, J. B. C. Protein sequencing techniques Molecular Biology and Biotechnology. **A comprehensive desk reference**. ed. Robert A Meyers **VCH Publish**. p. 771-773, 1995.

KONINGS, W. N.; POOLMAN, B.; VAN VEEN, H. W. Solute transport and energy transduction in bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 65, n. 4, p. 369–380, 1994.

LAEMMLI, U. K.; BEGUIN, F.; GUJER-KELLENBERGER, G. A factor preventing the major head protein of bacteriophage T4 from random aggregation. **Journal of Molecular Biology**, v. 47, n. 1, p. 69-85, 1970.

LAMARCHE, M. G.; DOZOIS, C. M.; DAIGLE, F.; CAZA, M.; CURTISS, R. III.; DUBREUIL, J. D.; HAREL, J. Inactivation of the Pst system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 4138-4145, 2005.

LAMARCHE, M. G.; WARNNER, B. L.; CRÉPIN, S.; HAREL, J. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, p. 461-473, 2008.

LARSON, T. J. *glpT*-Dependent transport of *sn*-glycerol-3- phosphate in *Escherichia coli* K-12. In: TORRIANI-GORINI, A.; ROTH-MAN, F. G.; SILVER, S.; WRIGHT, A.; YAGIL, E. **Phosphate Metabolism and Cellular Regulation in Microorganisms**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1987. p. 164–169.

LEMOS, J. A.; BROWN, T. A. Jr.; BURNE, R. A. Effect of RelA on key virulence properties of planktonic and biofilm populations of *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 3, p.1431-1440, 2004.

LINTON, K. J.; HIGGINS, C. F. The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. **Molecular Microbiology**, v. 28, p. 5-13, 1998.

LOO, C. Y.; CORLISS, D. A.; GACESHKUMAR, N. *Streptococcus gordonii* biofilm formation: identification of genes that code for biofilm phenotypes. **Journal Bacteriology**, v. 182, n. 5, p. 1374-1382, 2000.

LUOMA, H. Uptake of phosphate by caries-active and caries-inactive Streptococci. **Archives of Oral Biology**, v. 13, n. 11, p. 1331-1342, 1968.

MALONEY, P. C.; AMBUDKAR, S. V.; ANANTHARAM, V.; SONNA, L. A.; VARAD-HACHARY, A. Anion-exchange mechanisms in bacteria. **Microbiology Review**, v. 54, p. 1-17, 1990.

METCALF, W. W.; WANNER, B. L. Involvement of the *Escherichia coli* *phn* (*psiD*) gene cluster in assimilation of phosphorus in the form of phosphonates, phosphite, P esters, and P. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 3, p. 587-600, 1991.

MICHALEK, S. M.; HIRASAWA, M.; KIYONO, H.; OCHIAI, K.; MCGHEE, J. R. Oral Ecology and virulence of *Lactobacillus casei* and *Streptococcus mutans* in gnotobiotic rats. **Infection and Immunity**, v. 33, n. 3, p. 690-696, 1981.

MILLER, J. H. **A short course in bacterial genetics**: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Nova York: Cold Spring Harbor, 1992.

MOFFATT, B. A. ; STUDIER, F. W. T7 lysozyme inhibits transcription by T7 RNA polymerase. **Cell Press** , v. 49, n. 2, p. 221-227. (1987).

MONDS, R. D.; SILBY, M. W.; MAHANTY, K. H. Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2. **Molecular Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 415-426, 2001.

MOUREZ, M.; HOUFNUNG, J.; DASSA, E. Subunit interactions in ABC transporters: a conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. **EMBO Journal**, v. 4, n. 11, p. 2287-2293, 1997.

MOUTRAN, A.; QUAGGIO, R. B.; BALAN, A.; FERREIRA, L.C.S.; FERREIRA, R.C.C. The oligopeptide (Opp) of the plant pathogen *Xanthomonas axonopodis* pv.citri. **Current Microbiology**, v. 48, n. 5, p. 354-359, 2003.

MURASHIMA, K.; CHEN, C. L.; KOSUGI, A.; TAMARU, Y.; DOI, R. H.; WONG, S. L. Heterologous production of *Clostridium cellulovorans* engB, using protease-deficient *Bacillus subtilis*, and preparation of active recombinant cellulosomes. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 1, p. 76-81, 2002.

NEMOTO, H.; NAKANO, K.; NOMURA, R.; OOSHIMA, T. Molecular characterization of *Streptococcus mutans* strains isolated from the heart valve of an infective endocarditis patient. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 891-895, 2008.

NEPOMUCENO, R. S. L.; TAVARES, M. B.; LEMOS, J. A.; GRISWOLD, A. R.; RIBEIRO, J. L.; BALAN, A.; GUIMARÃES, K. S.; CAI, S.; BURNE R. A.; FERREIRA, L. C. S.; FERREIRA, R. C. C. The oligopeptide (*opp*) gene cluster of *Streptococcus mutans*: identification, prevalence and characterization. **Oral Microbiology Immunology**, v. 22, n. 4, p. 277-284, 2007

NOMURA, R.; NAKANO, K.; NEMOTO, H.; FUJITA, K.; INAGAKI, S.; TAKAHASHI, T.; TANIGUCHI, K.; TAKEDA, M.; YOSHIOKA, H.; AMANO, A.; OOSHIMA, T. Isolation and characterization of *Streptococcus mutans* in heart valve and dental plaque specimens from a patient with infective endocarditis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, p. 1135-1140, 2006.

NOVAK, R.; CAUWELS, A.; CHARPENTIER, E.; TUOMANEN, E. Identification of a *Streptococcus pneumoniae* gene locus encoding proteins of an ABC phosphate transporter and a two-component regulatory system. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 4, p. 1126-1133, 1999.

NGUYEN, H. D.; PHAN, T. T. P.; SCHUMANN, W. Expression Vectors for the Rapid Purification of Recombinant Proteins in *Bacillus subtilis*. **Current Microbiology**, v. 55, n. 2, p. 89-93, 2007.

O'MAY, G. A.; JACOBSEN, S. M.; LONGWELL, M.; STOODLEY, P.; MOBLEY, H. L.; SHIRTLIFF, M. E. The high-affinity phosphate transporter Pst in *Proteus mirabilis* HI4320 and its importance in biofilm formation. **Microbiology**, v. 155, n. 5, p. 1523-1535, 2009.

ORIHUELA, J. C.; MILLS, J.; ROBB, C.W.; WILSON, C. J.; WATSON, D. A.; NIESEL, D. W. *Streptococcus pneumoniae* PstS production is phosphate responsive and enhanced during growth in the murine peritoneal cavity. **Infection and immunity**, v. 69, n. 12, p. 7565-7571, 2001.

PERRY, D.; WONDRACK, L. M.; KURAMITSU, H. K. Genetic transformation of putative cariogenic properties in *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 2, p. 722-727, 1983.

POLISSI, A.; PONTIGGIA, A.; FERGER, G.; ALTIERI, M.; MOTLL, H.; FERRARI, L.; SIMON, D. Large-scale identification of virulence genes from *Streptococcus pneumoniae*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 12, p. 5620-5629, 1998.

PRATT, J. T.; ISMAIL, A. M.; CAMILI, A. PhoB regulates both environmental and virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 6, p. 1595- 1605, 2010.

RAO, N. N.; TORRIANI, A. Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 1083-1090, 1990.

RICKARD, A. H.; GILBERT, P.; HIGH, N. J.; KOLENBRANDER, P. E.; HANDLEY, P. S. Bacterial coaggregation: an integral process in the development of multi-species biofilms. **TRENDS in Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 94-100, 2003.

ROSENBERG, H. Phosphate transport in prokaryotes. In: ROSEN, B. P.; SILVER, S. **Ion Transport in Prokaryotes**. New York : Academic Press, 1987. p. 205–248.

RUNYEN-JANECKY, L. J.; BOYLE, A. M.; KIZZEE, A.; LIEFER, L.; PAYNE, S. M. Role of the Pst system in plaque formation by intracellular pathogen *Shigella flexneri*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 3, p. 1404-1410, 2005.

RUSSELL, R.R.B. Pathogenesis of oral streptococci. In: FISCHETTI, V. A. **Gram-positive Pathogens**. 2. ed. Washington, D.C: AMS, 2006. p. 332-337.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SINAI, A. P.; BAVOIL, P. M. Hyper-invasive mutants define a novel Pho-regulated invasion pathway in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 1125-1137, 1993.

SONNA, L. A.; AMBUDKAR, S. V.; MALONEY, P. C. The mechanism of glucose 6-phosphate transport by *Escherichia coli*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 14, p. 6625–6630, 1988.

SOUALHINE, H.; BROCHU, V.; MÉNARD, F.; PAPADOPOULOU, B.; WEISS, K.; BERGERON, M.G.; LÉGARÉ, D.; DRUMMELSMITH, J.; OUELLETTE, M. A proteomic analysis of penicillin resistance in *Streptococcus pneumoniae* reveals a novel role for PstS, a subunit of the phosphate ABC transporter. **Molecular microbiology**, v. 58, n. 5, p. 1430-1440, 2005.

SRINIVASA RAO, P. S.; LIM, T. M.; LEUNG, K. Y. Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1343-1351, 2003.

SRINIVASA RAO, P. S.; YAMADA, Y.; TAN, Y. P.; LEUNG, K. Y. Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 573-586, 2004.

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. 1, p. 6797-6809, 1993.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, p. 199 – 210, 2008

SURIN, B. P.; COX, G. B.; ROSENBERG, H. Molecular studies on the phosphate-specific transport system of *Escherichia coli*. In: TORRIANI-GIRINI, A.; ROTHMAN, F. G.; SILVER, S.; WRIGHT, A.; YAG-IL, E. **Phosphate Metabolism and Cellular Regulation in Microorganisms**. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1987. p. 145–149.

TERLECKYJ, B.; WILLETT, N. P.; SHOCKMAN, G. D. Growth of several cariogenic strains of oral streptococci in a chemically defined medium. **Infection Immunity**, v. 11, n. 4, p. 649-655, 1975.

VAN HOUTE, J. V. Role of micro-organisms in caries etiology. **Journal of Dental Research**, v. 73, n. 3, p. 672-681, 1994.

VAN VEEN, H.W.; ABEE, T.; KORTSTEE, G. J.; KONINGS, W. N.; ZEHNDER, A. J. Translocation of metal phosphate via the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 33, n. 7, p. 1766-1770, 1993.

VAN VEEN, H. W. Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 72, n. 4, p. 299-315, 1997.

WANNER, B. L. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 51, n. 1, p. 47-54, 1993.

WANNER, B. L. Signal transduction and cross regulation in the *Escherichia coli* phosphate regulon by PhoR, CreC, and acetyl phosphate. In: HOCH, J. A.; SILHAVY, T. J. **Two-component Signal Transduction**. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1995. p. 203-221.

WANNER, B. L. Phosphorous assimilation and control of the phosphate regulon. In: NEIDHARDT, F. C.; CURTISS, R. III.; INGRAHAN, J. L.; LIN, E. C. C.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B. **Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology**. Washington. DC: American Society for Microbiology Press, 1996. p. 1357-1381.

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

WILLSKI, G. R.; MALAMY M. H. Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v.144, n. 1, p. 356-365, 1980.

YOSHIDA, A.; KURAMITSU, H. K. Multiple *Streptococcus mutans* genes are involved in biofilm formation. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 2, p. 6283-6291, 2002.

YOUNG, J.; HOLLAND, I. B. ABC transporters: Bacterial exporters-revisited five years on. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1461, n. 1, p. 177-200, 1999.