Fernanda Nogales da Costa Vasconcelos

Caracterização dos genes *phoA*₁, *phoA*₂,
phoB, *phoU* e *pstS*, membros do regulon PHO de
Chromobacterium violaceum

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Microbiologia do Instituto de
Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo, para obtenção do título de
Doutora em Ciências

Fernanda Nogales da Costa Vasconcelos

Caracterização dos genes *phoA*₁, *phoA*₂,
phoB, *phoU* e *pstS*, membros do regulon PHO de
Chromobacterium violaceum

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Beny Spira

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

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

Vasconcelos, Fernanda Nogales da Costa.

Caracterização dos genes *phoA1*, *phoA2*, *phoB*, *phoU* e *pstS*, membros do regulon PHO de *Chromobacterium violaceum* / Fernanda Nogales da Costa Vasconcelos. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Beny Spira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Genética e fisiologia de microorganismos.

Versão do título para o inglês: Characterization of *phoA1*, *phoA2*, *phoB*, *phoU* and *pstS* genes, members of the PHO regulon from *Chromobacterium violaceum*.

1. Regulon PHO 2. *Chromobacterium violaceum*

I. Spira, Prof. Dr. Beny II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/IPT/Instituto Butantan III. Título.

ICB/SBIB049/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fernanda Nogales da Costa Vasconcelos.

Título da Tese: Caracterização dos genes *phoA1*, *phoA2*, *phoB*, *phoU* e *pstS*,
membros do regulon PHO de *Chromobacterium violaceum*.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 332/09, referente ao projeto intitulado: “*Caracterização de genes pertencentes ao regulun PHO e resistência geral ao estresse em Chromobacterium violaceum*” sob a responsabilidade de **Fernanda Nogales da Costa Vasconcelos**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPSh - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 25 de agosto de 2009.

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

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

Dedico este trabalho a meus pais, por terem acreditado em mim e me ajudado nos momentos mais sombrios, em que eu mesma já havia abandonado todas as esperanças de terminar este doutorado, por puxarem minha orelha quando precisava e pelo otimismo sem igual. À minha irmã, pelas discussões científicas à mesa do jantar e aos meninos, por serem a alegria da casa =D

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Beny Spira pela oportunidade, ao professor Gabriel Padilla pela paciência, força e carinho, à professora Cristiane Guzzo pela orientação na parte da expressão das proteínas.

Agradeço aos colegas dos laboratórios que passei: à Padawan, Tubbie e Rulho pela companhia inestimável e por fazer meus dias mais divertidos. Ao Camilo, Diogo, Carla, Zita, Renata, Alejandra, Roger, Simone, Ruth e Felipe pela paciência e a incrível capacidade de aguentar meu mau-humor constante. Aos colegas do departamento de bioquímica por me ensinarem os protocolos das expressões das proteínas e me ajudarem no meu último ano de trabalho. À Amanda, Gabriela, Thandara, Cecília, Thais, Felipe, Bianca, Georges, Roberta, Ketrin, Livia, Lucas e Viviane por deixarem o corredor mais divertido ;)

Agradeço ao mestre Serra e à equipe do Instituto de Kung Fu Shaolin pelo treinamento nesta arte marcial, que tanto me ajudou nos piores momentos desta pós graduação. A paz mental pelo caminho da exaustão física.

Agradeço aos meus amigos off USP e aos meus amigos de Brasília, por conseguirem me fazer esquecer um pouco o drama do doutorado.

Agradeço à Raquel por ter me acompanhado por boa parte desta trajetória.

Agradeço à Rebeka por ter paciência, carinho e dedicação, especialmente na reta final deste trabalho.

E por último, mas não menos importante, agradeço ao contribuinte do estado de São Paulo, por ter me financiado, via FAPESP.

Toto, I've got a feeling that
we're not in Kansas anymore
(Wizard of Oz)

RESUMO

VASCONCELOS, F. N. C. **Caracterização dos genes *phoA*₁, *phoA*₂, *phoB*, *phoU* e *pstS*, membros do regulon PHO de *Chromobacterium violaceum***, 2014. 91 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Chromobacterium violaceum é uma bactéria de vida livre, móvel, que habita ambientes pobres em nutrientes, tais como fontes de água e solos de regiões tropicais e subtropicais, sendo a resposta à carência de fosfato (Pi) por este organismo o objeto de estudo deste trabalho.

Genes regulados por PHO, que respondem à carência de fosfato, foram anotados em seu genoma, tais como *pstS*, *phoB*, *phoU* e *phoA*. A fusão de *lacZ* aos promotores de *phoB* e *phoU* mostraram ativação dos mesmos quando esta bactéria está carente de Pi. Curiosamente, a resposta à carência de Pi ocorreu antes e independentemente de parada do crescimento devido ao esgotamento deste nutriente.

Mutantes de cada gene no presente trabalho foram construídos por inserção de um plasmídeo suicida. Os mutantes *pstS* e *phoU* não apresentaram qualquer alteração no padrão de repressão do regulon PHO, sugerindo que estes genes não inibem PHO, apesar de o mutante *pstS* ser seriamente deficiente na captação de Pi quando *C. violaceum* está carente desse nutriente.

Esta bactéria também possui dois genes *in tandem* anotados para fosfatases alcalinas, *phoA1* e *phoA2*, cujos produtos partilham uma identidade de 53% com o outro. Análise das sequências de PhoA1 e PhoA2 revelou que os resíduos importantes para a atividade da enzima são conservadas em ambas as proteínas, sugerindo que ambas possam ser funcionais, além de que formam grupos filogeneticamente distintos, quando comparados com outros organismos que também apresentam esta duplicação gênica.

Foram construídos mutantes para estes genes e revelou-se que estes possuem aproximadamente 15% da atividade enzimática em comparação à cepa selvagem quando em condição de carência de Pi. Foram realizados ensaios funcionais com PhoA1 e PhoA2 expressas em organismo heterólogo para

determinar a organização destas proteínas, porém os ensaios não se mostraram conclusivos.

Estes resultados sugerem que a *C. violaceum* pode possuir dois genes funcionais para a fosfatase alcalina. Concluiu-se também que *C. violaceum* possui mecanismos regulatórios de PHO diferentes daqueles já descritos.

Palavras-chave: *Chromobacterium violaceum*. Regulon PHO.

ABSTRACT

VASCONCELOS, F. N. C. **Characterization of *phoA*₁, *phoA*₂, *phoB*, *phoU* e *pstS* genes, members of the PHO regulon from *Chromobacterium violaceum*.** 2014. 91 p. Ph. D. thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Chromobacterium violaceum is a free-living, mobile bacterium that inhabits water sources and soils of tropical and subtropical regions, which are usually low in nutrients such as inorganic phosphate (Pi). The starvation response for Pi in *C. violaceum* was the subject of this work.

Pi starvation response genes, PHO regulon members, were annotated in *C. violaceum* chromosome, such as *pstS*, *phoA*, *phoU* and *phoB*. *phoB* and *phoU* promoters fusions to *lacZ* reporter gene show activity when bacterium becomes starved for Pi. Interestingly, this response happened independently of growth halt due Pi depletion.

In this work, mutants were constructed using a suicide plasmid. *pstS* and *phoU* mutants did not show any change concerning PHO repression pattern, suggesting that these genes are not involved in PHO regulation, although *pstS* mutant is Pi transport deficient when *C. violaceum* is starved.

Two genes were annotated *in tandem* for Alkaline Phosphatase in *C. violaceum* genome, whose products share 53% of identity, *phoA1* and *phoA2*. PhoA1 and PhoA2 sequence analysis show that those amino acids residues important for activity are conserved in both sequences. This suggests that both protein may be functional, moreover, these sequence cluster into different phylogenetic groups, in the same pattern of other duplicated Alkaline Phosphatase genes found in bacteria.

Both genes were disrupted and the resulting mutants show, each, only about 15% of the wild type enzymatic activity, when it becomes starved for Pi. PhoA1 and PhoA2 were expressed in heterologous host in order to essay for protein interactions, but unfortunately these essays were inconclusive.

These results suggest *C. violaceum* may have two functional genes for Alkaline Phosphatase. *C. violaceum* may also have other, unknown, PHO regulatory mechanisms.

Keywords: *Chromobacterium violaceum*. PHO regulon.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.1 – Estrutura da violaceína.....	17
Figura 1.2 – Regulação de PHO por PhoBR e Pst-PhoU.....	24
Figura 1.3 – Traçado do C α do dímero fosfatase alcalina.....	26
Figura 1.4 – Mecanismo de reação da fosfatase alcalina	27
Figura 3.1 – Esquema de mutagenização utilizado para interromper genes em <i>C. violaceum</i>	40
Figura 4.1 – Crescimento de <i>C. violaceum</i> selvagem em meio MCT suplementado com concentrações diversas de Pi.....	50
Figura 4.2 – Indução da F.A. em meio A	52
Figura 4.3 – Crescimento de <i>E. coli</i> MG1655 e <i>C. violaceum</i> em placas de meio MCT tendo β -glicerol-fosfato como única fonte de carbono	53
Figura 4.4 – Atividade de F.A. em diferentes pHs	54
Figura 4.5 – Esquema do contexto gênico de <i>C. violaceum</i> em torno dos genes <i>phoA</i> ₁ e <i>phoA</i> ₂ , e os iniciadores utilizados para RT-PCR.....	55
Figura 4.6 – RT-PCR dos genes <i>cv1515</i> , <i>phoA</i> ₁ , <i>phoA</i> ₂ e <i>cv1512</i> para verificar a transcrição conjunta destes genes	56
Figura 4.7 – Alinhamento de PhoA ₁ , PhoA ₂ (<i>C. violaceum</i>) e ECAP utilizando o programa ClustalW	57
Figura 4.8 – Árvore filogenética de proteínas anotadas como PhoA ₁ e PhoA ₂ de <i>C. violaceum</i> e de outras seis bactérias	58
Figura 4.9 – PCR para detecção da inserção pKNOCK em <i>phoA</i> ₁ e <i>phoA</i> ₂	59
Figura 4.10 – Atividade da fosfatase alcalina da cepa FN1 e FN5 em comparação à cepa selvagem (CvWT)	60
Figura 4.11 – RT-PCR de <i>phoA</i> ₂ em FN5	61
Figura 4.12 – PhoA ₁ expressa em <i>E. coli</i> Star	62
Figura 4.13 – Purificação de PhoA ₂	63
Figura 4.14 – Far Western de PhoA ₂ contra PhoA ₁	64
Figura 4.15 – Pull down.....	65
Figura 4.16 – Gel filtração analítica.....	66

Figura 4.17 – Relação entre o log da massa molecular de proteínas conhecidas e a razão entre os volumes de eluição (Ve) e o volume de exclusão da coluna GF 200 (V0).	67
Figura 4.18 – Ativação do gene <i>phoB</i>	68
Figura 4.19 – PCR para detecção da inserção de pKNOCK no gene <i>pstS</i> de <i>C. violaceum</i>	69
Figura 4.20 – Captação de ³² Pi ao longo do tempo.....	70
Figura 4.21 – Atividade de F.A. de um candidato a mutante <i>pstS</i>	71
Figura 4.22 – Detecção da inserção de pKNOCK em <i>phoU</i>	72
Figura 4.23 – Atividade de fosfatase alcalina na cepa mutante FN3.....	73
Figura 4.24 – Ativação do gene <i>phoU</i>	74
Figura 4.25 – RT-PCR de <i>pstB-pitA</i>	75
Figura 4.26 – Sobrevivência de <i>C. violaceum</i> selvagem alta osmolaridade.....	76
Figura 4.27 – Sobrevivência de <i>C. violaceum</i> ao frio	77
Figura 4.28 – Sobrevivência de <i>C. violaceum</i> a estresse oxidativo.....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 – Comparação entre as seqüências de proteínas de <i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472 e <i>Escherichia coli</i> K12-MG1655 relevantes para este trabalho	27
Tabela 3.1 – Cepas e plasmídeos utilizados neste trabalho	35
Tabela 3.2 – Iniciadores utilizados neste trabalho.....	36
Tabela 4.1 – Crescimento de <i>C. violaceum</i> e <i>E. coli</i> em meio MCT suplementado com diferentes concentrações de fosfato após 48 horas	50
Tabela 4.2 – PHO-boxes nos promotores de genes de PHO preditos em <i>C. violaceum</i>	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TCS – Sistema de dois componentes

Pi – Fosfato inorgânico

F.A. – Fosfatase Alcalina

ECAP – Fosfatase Alcalina de *E. coli*

PLAC – Fosfatase Alcalina placentária

AHL – Autoindutores

HK – Domínio histidina quinase

RR – Domínio regulador de resposta

ABC – ATP binding cassette

TAT – Twin arginine translocase

U.E. – Atividade específica da Fosfatase Alcalina

U.M. – Atividade específica da β -galactosidase

PCR – Reação em cadeia da polimerase

XP – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato

U.F.C. – Unidade formadora de colônia

PoliP – Polifosfato

HTH – Hélice-volta-hélice

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
<u>1.1 <i>Chromobacterium violaceum</i></u>	19
<u>1.2 A homeostase de Pi e sua regulação em <i>E. coli</i></u>	22
<u>1.3 O transporte de Pi</u>	24
<u>1.4 Patogenicidade</u>	28
<u>1.5 A fosfatase alcalina</u>	28
<u>1.5.1 <i>PhoA</i></u>	29
<u>1.5.2 <i>PhoX</i> e <i>PhoD</i></u>	30
<u>1.5.3 Outras fosfatases alcalinas</u>	32
2 OBJETIVOS	33
3 METODOLOGIA	34
<u>3.1 Linhagens de bactérias, plasmídeos e iniciadores</u>	34
<u>3.2 Meios de cultura</u>	36
<u>3.3 Detecção <i>in silico</i> de PHO-boxes</u>	37
<u>3.4 Ensaio enzimáticos</u>	37
<u>3.4.1 Ensaio de <i>F.A.</i></u>	37
<u>3.4.2 Ensaio de β-galactosidase</u>	38
<u>3.4.3 Ensaio de transporte de Pi</u>	38
<u>3.5 Manipulações de DNA</u>	39
<u>3.5.1 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)</u>	39
<u>3.5.2 Extração de DNA plasmidial</u>	39
<u>3.5.3 Eletrotransformação de bactérias</u>	40
<u>3.6 Clonagens</u>	41
<u>3.6.1 Criação das fusões transcricionais utilizando o gene repórter <i>lacZ</i></u>	41
<u>3.6.2 Montagem dos vetores para expressão das proteínas <i>PhoA</i>₁ e <i>PhoA</i>₂</u>	41
<u>3.6.3 Construção dos vetores para mutagenização</u>	41
<u>3.7 Conjugação</u>	42
<u>3.8 Mutagenização por recombinação alélica</u>	42

<u>3.8.1 A. Inserção de pKNOCK</u>	42
<u>3.8.2 Seleção de mutantes pst em meio contendo β-glicerol-fosfato</u>	43
<u>3.9 Extração de RNA</u>	44
<u>3.10 RT-PCR</u>	44
<u>3.10.1 Tratamento com DNase</u>	44
<u>3.10.2 Transcrição Reversa</u>	44
<u>3.11 Expressão das proteínas PhoA₁ e PhoA₂</u>	45
<u>3.11.1 Super expressão de PhoA₁ e PhoA₂</u>	45
<u>3.11.2 Purificação de PhoA₁</u>	46
<u>3.11.3 Purificação de PhoA₂</u>	47
<u>3.11.4 Quantificação de proteínas</u>	47
<u>3.11.5 Far-western</u>	48
<u>3.11.6 Pull Down</u>	49
<u>3.11.7 Gel Filtração analítica</u>	49
<u>3.12 Micro-determinação de fosfato</u>	50
<u>3.13 Ensaio de sobrevivência em situações de estresse</u>	50
<u>3.13.1 Estresse osmótico</u>	51
<u>3.13.2 Estresse oxidativo</u>	51
<u>3.13.3 Estresse frio</u>	51
4 RESULTADOS	52
<u>4.1 Determinação das condições de cultivo de <i>C. violaceum</i></u>	52
<u>4.2 Fosfatase Alcalina (F.A.)</u>	53
<u>4.2.1 Cinética da expressão da F.A. em meio A.</u>	53
<u>4.2.2 Obtenção de mutantes constitutivos para a expressão da F.A.</u>	55
<u>4.2.3 Atividade da F.A. em diferentes pHs e localização da enzima.</u>	57
<u>4.2.4 phoA₁ e phoA₂ formam um operon</u>	58
<u>4.2.5 Predição de peptídeo sinal e de aminoácidos canônicos para a coordenação dos íons metálicos conservados nas sequências de PhoA₁ e PhoA₂</u>	59
<u>4.2.6 Filogenia de PhoA₁ e PhoA₂</u>	61
<u>4.2.7 Construção dos mutantes phoA₂ e phoA₁</u>	62
<u>4.2.8 Análise do efeito polar da mutação phoA₁::pKNOCK-Km</u>	64

<u>4.2.9 Interação entre PhoA₁ e PhoA₂</u>	65
4.2.9.1 Expressão de PhoA ₁ e PhoA ₂	65
4.2.9.2 Far western	67
4.2.9.3 Pull Down	68
4.2.9.4 Gel filtração analítica	70
<u>4.3 A ativação do regulon PHO de <i>C. violaceum</i></u>	72
<u>4.3.1 Busca por PHO-boxes no genoma de <i>C. violaceum</i></u>	72
<u>4.3.2 Ativação do gene <i>phoB</i></u>	72
<u>4.4 Operon <i>pst</i></u>	74
4.4.1 Construção do mutante <i>pstS</i> ::Km	74
4.4.2 Construção do mutante <i>phoU</i> ::Km	76
4.4.3 Transcrição de <i>pstB-pitA</i>	79
4.5 Resistência de <i>C. violaceum</i> a estresses ambientais	80
4.5.1 Alta osmolaridade	80
4.5.2 Frio (4 °C)	81
4.5.3 Estresse oxidativo.	82
5 DISCUSSÃO	84
5.1 Indução do regulon PHO	84
5.2 Das fosfatases alcalinas	85
5.3 <i>phoU</i> não participa da repressão do <i>regulon</i> PHO de <i>C. violaceum</i>	88
5.4 <i>Pst</i> é o principal transportador de Pi em situação de carência de Pi, porém não é repressor de PHO	89
5.5 <i>pitA</i> de <i>C. violaceum</i> responde à carência de Pi	90
5.6 <i>C. violaceum</i> é pouco resistente a estresses ambientais.	90
6 CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS	93
ANEXOS	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Chromobacterium violaceum*

Chromobacterium violaceum é um bacilo gram-negativo de vida livre, anaeróbio facultativo, medindo 0.6–0.9 x 1.5–3.0 µm, membro do grupo proteobacteria-β e da família *Neisseriaceae* encontrada em solo e águas, tanto em climas tropicais quanto subtropicais. Foi a primeira bactéria a ter seu genoma sequenciado pelo “Brazilian National Genome Project Consortium”, em 2003. Este trabalho abriu as portas para a sua análise genética e aumentou o potencial para produção de metabólitos secundários de interesse industrial (DURÁN; MENCK, 2001; HASELKORN et al., 2003; HUNGRIA et al., 2005) .

Esta espécie é descrita como saprófita e patógena oportunista. O primeiro caso de infecção por *C. violaceum* foi reportado na Malásia, em 1927, sendo a exposição da pele lesionada ao solo ou água contaminada pela bactéria a principal forma de infecção. Apesar de raros, os casos de infecção por *C. violaceum* apresentam taxa de mortalidade elevada. Uma vez que a infecção se estabelece, pode evoluir rapidamente para óbito, causando infecção generalizada com abscessos no fígado, baço e pulmões (CHANG et al., 2007; SNEATH et al., 1953).

Miki e colaboradores demonstraram que os genes anotados como pertencentes às ilhas de patogenicidade 1 e 1a codificam para um sistema de secreção do tipo III, sendo este o principal mecanismo de patogenicidade na infecção de hepatócitos. Foram anotados vários genes de resistência a antibióticos em seu genoma, conferindo principalmente resistência à classe dos β-lactâmicos, e tornando o tratamento da infecção mais difícil (CAMPBELL et al., 2013; FANTINATTI-GARBOGGINI et al., 2004; MIKI et al., 2010).

A característica fenotípica mais evidente deste organismo é a produção de um pigmento hidrofóbico de coloração roxa, a violaceína (figura 1.1). Este pigmento possui atividade tóxica contra *Mycobacterium tuberculosis*, e *Leishmania sp.*. Alguns estudos avaliaram o potencial deste metabólito contra células tumorais e vírus. *C. violaceum* também produz outros metabólitos que estão em estudo para aplicações biotecnológicas e farmacêuticas (ANDRIGHETTI-FRÖHNER et al., 2003; DURÁN; MENCK, 2001; KODACH et al., 2006; LEON et al., 2001; SOUZA et al., 1999).

Figura 1.1. Estrutura da violaceína.

O operon *vio*, composto por cinco genes, *vioABCDE*, é responsável pela síntese de violaceína, sendo que esta via só é ativa em condições de aerobiose. Duas moléculas de L-triptofano são necessárias para o processo, enquanto que os três átomos de oxigênio são obtidos a partir de O₂ molecular. Foi demonstrado que a violaceína é incorporada em membranas lipídicas, exercendo papel de antioxidante, especialmente contra espécies reativas de nitrogênio, sendo esta provavelmente uma de suas funções em *C. violaceum* (KONZEN et al., 2006).

A produção deste composto é controlada por *quorum sensing*, com sequências que se assemelham a *lux*-box (sítios de ligação de fatores de transcrição que respondem ao efeito combinado de autoindutores (AHL)) e proteínas regulatórias no promotor do gene proximal, *vioA*. Em *C. violaceum* ATCC 31532, a geração de violaceína é dependente de autoindutores de cadeia curta, especialmente C6-HSL, enquanto que na cepa ATCC 12472 é a presença de C10-HSL que determina a ativação do operon *vio* (MCCLEAN et al., 1997).

A cepa mutante CV026, uma derivada *C. violaceum* ATCC 31532, possui uma inserção de mini-Tn5 no gene *cvil*, resultando em uma bactéria incapaz de produzir C6-HSL, porém responde a autoindutores exógenos, transformando esta cepa em um excelente sensor para homoserinalactonas presentes no meio (MOROHOSHI et al., 2008, 2010).

Além de ser útil em pesquisas sobre *quorum sensing*, este organismo tem sido pesquisado por sua capacidade de adaptação a diversos ambientes. Por exemplo, *C. violaceum* é capaz de sobreviver e crescer em uma ampla faixa de temperatura e pH. Há cepas isoladas de águas de rios da Bacia Amazônica capazes de crescer em temperaturas variando de 4°C até 44°C e em pH 4. De fato, este organismo prolifera em rios de águas escuras, tendo o Rio Negro como o mais conhecido representante

desse tipo de ecossistema. O interessante deste rio, além da cor, é a pouca quantidade de elementos dissolvidos em suas águas e pH ácido, em torno de 4,5. Estas condições criam situações de estresse nutricional permanente para *C. violaceum*, sendo resposta à carência de fosfato o tema deste trabalho (DUPR; ALLBGRE; NGREL, 1997; FURCH, 1984; HUNGRIA et al., 2005).

O sequenciamento do genoma de *C. violaceum* revelou a existência de diversos genes ortólogos àqueles descritos em *E. coli* como relacionados à resposta à carência de fosfato. A tabela 1.1 mostra a comparação de alguns destes genes com as seqüências ortólogas de *E. coli*, com suas respectivas localizações no cromossomo de *C. violaceum*.

Este trabalho estudará especificamente os genes *pstS*, *phoB*, *phoU*, *phoA1* e *phoA2*.

Tabela 1.1. Comparação entre as seqüências de proteínas de *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472 e *Escherichia coli* K12-MG1655 relevantes para este trabalho. Fonte: *Chromobacterium violaceum* ATCC12472 Genome Page

Proteína	Identidade	Similaridade	5'/3'
PhnA	52.8%	63.9%	462678 / 462343
PhnF	34.3%	51.0%	2001111 / 2001833
PhnG	34.7%	51.4%	2000960 / 2000526
PhnH	28.2%	38.8%	2000524 / 1999952
PhnI	58.6%	72.5%	1999950 / 1998865
PhnJ	72.1%	82.4%	1998872 / 1998030
PhnK	34.2%	48.1%	1998033 / 1997260
PhnL	32.2%	50.0%	1997255 / 1996548
PhnM	45.1%	62.8%	1996551 / 1995415
PhnN	52.6%	64.3%	2002518 / 2003075
PhoA1	28%	42.2%	1618312 / 1616777
PhoA2	28.8%	41.5%	1616777 / 1615404

PhoB	59.6%	76.3%	602620 / 603309
PhoR	39.2% [*]	49.4% [*]	603309 / 604616
PhoU	44.0%	63.8%	1325023 / 1325727
PitA	50.1%	68.5%	970285 / 968831
PstA	60.2%	78.2%	972232 / 971309
PstB	70.7%	82.0%	971305 / 970532
PstC	63.5%	77.9%	973196 / 972234
PstS	50.6%	64.0%	974317 / 973280
UgpA	62.0%	73.2%	3954863 / 3953982
UgpB	65.4%	79.3%	3956249 / 3954921
UgpC	57.7%	73.8%	3953129 / 3952017
UgpQ	45.1%	58.0%	3951988 / 3951302

* Informação ausente na “*Chromobacterium violaceum* ATCC12472 Genome Page”. Análise de alinhamento global feita com o software Needle do pacote EMBOSS

1.2 A homeostase de Pi e sua regulação em *E. coli*

Organismos de vida livre enfrentam problemas constantes com relação à captação de nutrientes, pois os ambientes naturais geralmente são pobres em recursos básicos, tais como fontes de carbono, nitrogênio e fosfato (SMIL, 2000).

Um dos macronutrientes essenciais para o crescimento é o fósforo, sendo que sua forma oxidada, fosfato, é a mais comumente encontrada na natureza. A forma molecular conhecida como ortofosfato (PO_4^{2-}) é a forma de fósforo preferida pela bactéria, uma vez que é diretamente incorporada a monômeros fosforilados, como ATP. Fosfato é indispensável para a síntese de nucleotídeos e, conseqüentemente, para a síntese de ácidos nucleicos e estocagem de energia química pela célula via ATP ou polifosfato (PoliP). Também compõem os fosfolipídios, que formam

membranas e ainda é intermediário de sinalização intra-celular (via fosforilação de proteínas).

Bactérias precisam ser capazes de “sentir” variações na concentração de Pi em seu ambiente e agir de acordo. Quando [Pi] está abaixo do limite mínimo para suportar seu crescimento, um conjunto de mais de trinta genes responsáveis por buscar fontes alternativas deste nutriente, o regulon PHO, é ativado (RAO; TORRIANI, 1990).

Os genes do regulon PHO de *E. coli* são controlados pelo sistema de dois componentes (TCS) PhoB/PhoR. A histidina quinase (HK) PhoR é a proteína sensora do sistema. Ela se apresenta na forma de homodímero e fica ancorada na membrana citoplasmática, voltada para o citoplasma. Recentemente, foram definidos três papéis desta proteína com relação à sua parceira, PhoB: PhoR pode manter PhoB inativado, quando a concentração de Pi no meio externo é maior que 4 μM ; pode se autofosforilar e passar este grupamento fosfato para PhoB, ativando-o quando a concentração de Pi no meio cai para menos que 4 μM e desativar PhoB-Pi, desfosforilando-a quando o excesso de Pi é restaurado.

É interessante notar que PhoR “sente” a disponibilidade de Pi de forma indireta, provavelmente através de interações com o transportador Pst ou com a proteína PhoU, pois não há um domínio sensor de Pi voltado para o periplasma. Mutantes que possuem deleções pequenas na porção N-terminal desta proteína (o provável domínio de interação com Pst) mostram ativação constante de PhoB, enquanto que grandes deleções inativam todas as funções de PhoR (CARMANY; HOLLINGSWORTH; MCCLEARY, 2003; HSIEH; WANNER, 2010; MAKINOT et al., 1989; SCHOLTEN; TOMMASSEN, 1993; YAMADA et al., 1990).

A outra proteína do sistema de dois componentes, PhoB, pertence à família OmpR/PhoB, a principal família de RRs (reguladores de resposta), e é o ativador transcricional do regulon PHO. Esta proteína é formada por dois domínios: o domínio receptor e o domínio de ligação ao DNA. PhoB é ativa quando o domínio HK de PhoR transfere o grupo fosfato para o domínio receptor, no resíduo de aspartato na posição 53 de PhoB (SOLÁ et al., 1999).

Há evidências de que outras proteínas HK são capazes de fosforilar PhoB. O “cross talk” mais estudado é entre CreC (antigamente chamado de PhoM) e PhoB. Baek e colaboradores verificaram, ainda, que CreC interage com PhoB antes

mesmo de PhoR, mesmo que por um período limitado de tempo, permitindo uma resposta à carência de Pi mais imediata. Outras HKs também são capazes de fosforilar e, conseqüentemente, ativar PhoB, tais como ArcB, KdpD e QseC, ainda que em níveis menores do que os conseguidos por PhoR, sugerindo, em alguma medida, um controle cruzado entre o metabolismo de Pi e outros metabolismos em *E. coli*. Outra molécula que pode ativar PhoB é acetilfosfato (AcP), com os mesmos efeitos fisiológicos de PhoB ativada por PhoR (BAEK; KANG; LEE, 2007; HIRATSU et al., 1995; YAMAMOTO et al., 2005).

Uma vez fosforilada, PhoB liga-se à sequências específicas nas regiões regulatórias dos genes do regulon PHO, conhecidas como PHO-boxes, que substituem a sequência -35. A sequência consenso do PHO-box foi definida por Yuan como sendo CTGTCATAAATCTGTCAT. Estudos de cristalografia feitos com a região de ligação ao DNA de PhoB mostram que este domínio é capaz de se ligar aos promotores de PHO *in tandem*, podendo haver duas moléculas de PhoB interagindo com cada PHO-box. PhoB liga-se ao DNA pela hélice $\alpha 3$ do domínio de ligação ao DNA. As hélices $\alpha 2$ e 3 formam uma estrutura hélice, volta, hélice (HTH) modificada, em que a volta é substituída por um loop. Este loop é essencial à atividade de PhoB, uma vez que quando esta proteína está ligada à PHO-box, é este loop que interage com o fator σ^{70} da RNA polimerase recrutando-a para a transcrição do gene alvo (MAKINO et al., 1993; VANBOGELEN et al., 1996; YUAN et al., 2006).

É interessante notar um padrão “tudo ou nada” na ativação de PHO por PhoB. Este fenômeno pôde ser estudado recentemente graças às melhorias nas técnicas de citometria de fluxo, em que células individuais podem ser analisadas com relação à sua expressão gênica. Em uma cultura de células, a ativação de PHO aparenta ser um processo gradual por haver células em diferentes estados fisiológicos, algumas tendo ativado o regulon PHO, e outras não (LAMARCHE et al., 2008b).

1.3 O transporte de Pi

Fosfato (Pi) não é um nutriente com passagem livre pelas camadas externas das células, sendo necessários sistemas de transporte desde a membrana externa até chegar a seu destino final. Em *E. coli*, foram descritos um sistema de transporte

pela membrana externa, a porina PhoE e dois sistemas de transporte de Pi através da membrana citoplasmática: Pit (Phosphate Inorganic Transport) e Pst (Phosphate Specific Transport).

PhoE é um membro da família de porinas de bactérias Gram negativas (GBP – general bacterial porin). Apesar de ter sua expressão induzida por carência de Pi, é um canal para passagem de pequenos ânions, sem grande especificidade para compostos fosforilados. Como os demais membros desta família, a forma ativa de PhoE é um trímero, sendo cada monômero constituído por um barril- β , formando o poro aquoso para a passagem dos ânions do ambiente extracelular para o periplasma (COWAN et al., 1992; KORTELAND; DE GRAAFF; LUGTENBERG, 1984).

O sistema Pit, codificado por *pitA*, possui baixa afinidade por Pi ($K_m = 38.2 \mu\text{M Pi}$) e é constituído por um canal transmembranal com velocidade de transporte alta ($55 \text{ nmol Pi min}^{-1}$) e originalmente acreditou-se que sua expressão era constitutiva. O método de transporte de Pi do sistema Pit envolve o complexo deste ânion com íons divalentes, principalmente Zn^{2+} , Mg^{2+} e Ca^{2+} , utilizando simporte de H^+ (BEARD et al., 2000; ROSENBERG; GERDES; CHEGWIDDEN, 1977; VAN VEEN et al., 1994).

De fato, o promotor de *pitA* responde à variações da concentração de zinco e fósforo. Por isso, acredita-se que Pit não seja primariamente um transportador de Pi, mas sim de íons metálicos e que o transporte deste ânion seria um “efeito colateral” (HSIEH; WANNER, 2010).

O outro, e principal, sistema de transporte de Pi, Pst, possui alta afinidade pelo seu substrato ($K_m = 0.43 \mu\text{M Pi}$) e velocidade menor que a de Pit ($15.9 \text{ nmol Pi min}^{-1}$) e sua expressão é elevada em situação de carência de Pi (WILLSKY; MALAMY, 1980).

O sistema Pst é um típico sistema ABC (ATP-binding cassette) de transporte formado por 4 proteínas: PstS ou PiBP (phosphate binding protein), que é uma proteína periplasmática, cuja função é ligar moléculas de ortofosfato e conduzi-las ao canal formado pelas proteínas integrais de membrana PstC e PstA ; e PstB, que é uma ATPase que fornece energia ao transporte (SURIN; ROSENBERG; COX, 1985).

O sistema Pst é transcrito como um único RNA policistrônico, cuja ordem dos genes é *pstSCAB*. Há um último gene neste operon, *phoU*, que não participa do transporte de Pi (AGUENA; SPIRA, 2003; STEED; WANNER, 1993).

Acredita-se que PhoU seja uma proteína repressora de PHO, que atua juntamente com PstB e PhoR para inibir a ativação de PhoB quando Pi está em excesso. Mutações em *phoU* ou nos genes do transportador levam à ativação constitutiva de PHO, independentemente da concentração de Pi no meio, sugerindo que a integridade do transportador, e não o transporte em si seja o sinal para a ativação de PhoB (LAMARCHE et al., 2008a).

É interessante notar que os produtos do operon *pstSCAB-phoU* possam regular a atividade do sistema de dois componentes PhoBR, sendo eles mesmos regulados por este mesmo sistema, indicando um *feedback* positivo destes genes em caso de carência de Pi. A figura 1.2 mostra um esquema da regulação da ativação dos genes do regulon PHO (WANNER, 1993).

Figura 1.2. Regulação de PHO por PhoBR e Pst-PhoU. Quando a concentração de P_i no periplasma é baixa, PhoB é fosforilada por PhoR, tornando-se ativa. Em altas concentrações deste nutriente, PstB e PhoU interagem com PhoR de modo a evitar a fosforilação de PhoB. A desativação do sistema ocorre quando PhoB é defosforilada por PhoR. Figura retirada de Lamarche et al, 2008a.

Bactérias podem acumular excesso de P_i na forma de polifosfato (PoliP), um polímero de até centenas de P_i . O processo envolve uma polifosfato quinase (*ppk*), responsável pela elongação da cadeia PoliP, e uma exopolifosfatase (*ppx*), que quebra a cadeia liberando P_i para uso na célula. Em *E. coli*, *ppk* e *ppx* formam um operon (AKIYAMA; CROOKE; KORNBERG, 1993; KORNBERG; RAO; AULT-RICHÉ, 1999).

Foi verificado que mutações no gene *phoU* levam a um acúmulo elevado de formação de PoliP, possivelmente porque o transportador Pst está expresso constitutivamente neste mutante, aumentando a disponibilidade de P_i intracelular; porém estes mutantes são instáveis. Apesar de haver aumento de síntese de PoliP

em uma situação em que o *regulon* PHO está desreprimido, estudos com uma fusão *PppK-lacZ* mostraram que este gene não responde à limitação de Pi, não sendo parte do *regulon* PHO (HIROTA et al., 2013; MOROHOSHI et al., 2002).

1.4 Patogenicidade

Apesar do número de genes do *regulon* PHO estar na casa de dezenas, estudos dos perfis proteômicos de *E. coli* carente ou não de Pi apontam uma diferença na expressão de centenas de genes. Alguns dos genes que respondem à baixa concentração de Pi, ainda que de forma indireta, são responsáveis por fatores de virulência (VANBOGELEN et al., 1996).

Em *Vibrio cholerae*, cepas que carregam mutações em *phoB* e em outros genes de PHO têm sua virulência severamente atenuada e em *Corynebacterium glutamicum* $\Delta phoB$, a expressão de genes de virulência também foi afetada (KOCAN et al., 2006; PRATT; ISMAIL; CAMILLI, 2010).

Por outro lado, genes regulados diretamente por PhoB já foram relacionados à virulência de várias bactérias. O sistema Pst, por exemplo, é necessário para a virulência de *Proteus mirabilis* e de *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enteropategênica atípica e *Citrobacter rodentium* (CHENG et al., 2009; FERREIRA; SPIRA, 2008; JACOBSEN et al., 2008).

1.5 A fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina é, por excelência, o gene repórter da carência de Pi em *E. coli* e outras bactérias estudadas, sendo expressa em carência deste nutriente. Sua ação, hidrolisar fosfomonoésteres, é de fundamental importância para a obtenção de fosfato a partir de fontes alternativas, orgânicas de fósforo.

Há, atualmente, três famílias de fosfomonoesterases expressas em carência de fosfato, com pico de atividade em pH alcalino descritas e caracterizadas na literatura: PhoA, PhoX e PhoD, esta última também apresentando atividade de fosfodiesterase.

1.5.1 PhoA

Amplamente distribuída na natureza, PhoA é encontrada em praticamente todos os seres vivos, desde bactérias até mamíferos. Em geral, todas as PhoAs possuem estruturas similares: uma enzima homodimérica, com 429 aminoácidos por monômero (KIM; WYCKOFF, 1991).

PhoA de *E. coli* (ECAP) é um dímero simétrico, com dimensões aproximadas de 100 Å x 50 Å x 50 Å com dois sítios ativos, um por monômero, aproximadamente 30 Å distantes um do outro; o que faz esta enzima ser membro de um raro grupo de enzimas diméricas cujos sítios ativos não estão na interface de interação entre as cadeias polipeptídicas (BOULANGER; KANTROWITZ, 2003). A figura 1.3 mostra o traçado de carbono alfa para a estrutura de ECAP, obtido com resolução de 2 Å.

Figura 1.3. Traçado do C α do dímero fosfatase alcalina. Metais são indicados como esferas.
Fonte: KIM et al, 1991

Apesar de ECAP guardar apenas 25% de identidade com PhoA de placenta de mamíferos (PLAP), a estrutura geral da molécula se mantém. Estes poucos resíduos de aminoácidos conservados são aqueles necessários à função da enzima: uma eficiente fosfomonoesterase pouco específica, com pico de atividade em pH torno de 8; também possuindo fraca atividade fosfodiesterase.

ECAP requer dois íons Zn^{2+} e um íon Mg^{2+} para sua atividade, sendo classificada como metaloenzima. Em experimentos de ressonância magnética nuclear, foram determinados os sítios de ligação a estes metais, chamados de M1,

M2 (para zinco) e M3 (para magnésio). M1 é necessário à catálise e M2 a aumenta, enquanto M3 não participa diretamente da reação enzimática (COLEMAN, 1992).

Em ECAP, o resíduo responsável pelo ataque nucleofílico ao grupamento fosfato a ser hidrolisado é uma serina na posição 102. Este resíduo forma um intermediário fosforilado, formando uma ligação não covalente ($E \cdot Pi$), seguida por uma covalente ($E-Pi$). Esta ligação é desfeita, sendo substituída por uma ligação não covalente ($E \cdot Pi$) com o grupo Pi. Na presença de água, fosfato inorgânico (Pi) é liberado e ECAP é considerada uma fosfomonoesterase, enquanto que na presença de um álcool ou um amino álcool como Tris em alta concentração (perto de 1M), ECAP funciona como uma fosfotransferase, gerando um novo éster fosfato. É necessário ressaltar que tais concentrações de álcoois não ocorrem em condições fisiológicas. A figura 1.4 ilustra a interação entre PhoA e seu substrato (COLEMAN, 1992).

Figura 1.4. Reação de PhoA (E) com seu substrato (R_1OP). Há um ataque nucleofílico do resíduo de serina 102 (Ser102) ao fósforo, com coordenação dos íons metálicos da F.A., resultando primeiramente em uma ligação não covalente entre Ser102 e Pi ($E \cdot Pi$). Em seguida, Ser102 e Pi formam uma ligação covalente, estado em que F.A. encontra-se fosforilada ($E-Pi$). A seguir, em condições fisiológicas, o grupamento fosfato sofre ataque de uma molécula de água, desfazendo a ligação covalente ($E \cdot Pi$) e, por fim, liberando Pi e reestabelecendo a enzima ($E + Pi$). No evento de alta concentração de um aceptor de Pi (R_2OH), F.A. pode transferir Pi para esta molécula ($E \cdot R_2OP$), se reestabelecendo ($E + R_2OP$). Figura retirada de Coleman, 1992.

ECAP é uma enzima periplasmática, secretada pelo sistema Sec, cuja expressão é ativada por carência de Pi no meio, sendo o membro mais bem estudado do regulon PHO. Em *E. coli* carente de Pi, ECAP hidrolisa compostos fosforilados presentes no periplasma liberando Pi, que é captado por PstS e transportado para o citoplasma pelo sistema Pst (RAO; TORRIANI, 1990; ZHANG et al., 2013).

1.5.2 PhoX e PhoD

PhoA não é a única fosfomonoesterase induzida por carência de Pi. Foram descritas duas outras famílias: a fosfomonoesterase PhoX, e PhoD, que exibe atividade de fosfodiesterase, e de fosfomonoesterase.

A primeira descrição de PhoX primeira descrição data de 1982, em que Roy e colaboradores isolaram uma fosfatase alcalina de *Vibrio cholerae* monomérica e dependente de cálcio. Majumdar e colaboradores sequenciaram o gene desta estranha enzima e verificaram que a sequência obtida era homóloga a sequências pertencentes à recém descrita família PhoX (MAJUMDAR; GHATAK; GHOSH, 2005; ROY; GHOSH; DAS, 1982).

PhoX também é uma enzima periplasmática, porém seu transporte para este espaço é dependente do sistema TAT (twin arginine translocase). Esta enzima não guarda homologia de estrutura e nem de sequência com ECAP. Outra diferença com relação à F.A. “clássica” é o pH ótimo em torno de 10.

phoX de *Sinorhizobium meliloti* e de outras proteobacterias possui em seu promotor sequências que sinalizam sítios de ligação a PhoB, tornando esta enzima parte do regulon PHO destes organismos (ZAHEER et al., 2009).

Apesar de ser menos estudada que PhoA, PhoX é bastante abundante na natureza. Estudos de metagenoma de ambientes marinhos apontam que esta enzima é mais predominante nestes ambientes do que PhoA, o que é esperado, já que zinco é um metal raro no oceano, enquanto cálcio não (KATHURIA; MARTINY, 2011; SEBASTIAN; AMMERMAN, 2009).

A presença de PhoX foi relatada em *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae*, *Sinorhizobium meliloti*, *Prochlorococcus* SP. e *Pasteurella multocida* (KATHURIA; MARTINY, 2011; VAN MOURIK et al., 2008; WU et al., 2007; ZAHEER et al., 2009).

PhoD foi primeiramente descrita em *B. subtilis* carente de Pi; uma enzima extracelular com dupla atividade: fosfomonoesterase e diesterase (YAMANE; MARUO, 1978).

Estudos posteriores demonstraram que este gene, *phoD*, é parte do regulon PHO de *B. subtilis*, tendo sua expressão dependente do TCS sinalizador de carência de Pi desta bactéria, PhoPR (EDER et al., 1996).

Assim como PhoX, PhoD também é translocada a seu destino final via sistema TAT e requer cálcio para sua atividade, mas não zinco. Sua atividade é pronunciada em fase estacionária, decorrente da carência de Pi (EDER et al., 1996).

PhoD atua aparentemente sobre a degradação e regeneração de ácido teicóico presente na parede de bactérias Gram-positivas em carência de Pi, sinalizando um papel a mais do regulon PHO em *B. subtilis* e outras bactérias Gram positivas (EDER; LIU; HULETT, 1999).

1.5.3 Outras fosfatases alcalinas

Há, ainda, um relato sobre uma enzima PhoD em *Zymomonas mobilis*, porém esta enzima apresenta características incomuns. Ela é ancorada na membrana e tem maior afinidade por nucleotídeos do que por açúcares fosforilados (GOMEZ; INGRAM, 1995).

E também há a fosfatase alcalina PhoK, isolada de *Shingomonas* sp. usada na bioprecipitação de urânio. Apesar de suas propriedades bioquímicas ainda não terem sido totalmente elucidadas, sabe-se que o pH ótimo desta enzima é em torno de 9 e que provavelmente é um polímero em sua forma ativa, tendo como unidade monomérica uma proteína de 60 kDa, porém não se sabe se as fosfatases alcalinas de *Z. mobilis* ou de *Shingomonas* sp. são parte do regulon PHO (NILGIRIWALA et al., 2008).

Até a presente data, apenas as famílias PhoA, PhoX e PhoD foram bem caracterizadas. Porém, com o avanço nos estudos de metagenoma de ambientes pouco explorados anteriormente pela microbiologia clássica, é possível descobrir novas classes de fosfatases alcalinas e estudá-las, senão nos seus organismos de origem, pelo menos em expressão heteróloga (LUO et al., 2009).

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem por objetivo geral estudar a resposta à carência a fosfato inorgânico e genes pertencentes ao regulon PHO em *Chromobacterium violaceum*, com intuito de entender os mecanismos envolvidos na sobrevivência deste organismo a ambientes oligotróficos.

Especificamente, este trabalho foca no estudo da enzima fosfatase alcalina, pois o gene codificador está duplicado no genoma de *C. violaceum*; no papel fisiológico do transportador Pst, e do gene *phoU*; além da ativação de *phoU* e *phoB*.

3 METODOLOGIA

3.1 Linhagens de bactérias, plasmídeos e iniciadores.

As linhagens de bactérias e plasmídeos utilizados neste trabalho estão descritos na tabela 2.1 e os iniciadores estão descritos na tabela 2.2.

Tabela 2.1. Plasmídeos e cepas utilizadas.

Linhagem	Genótipo relevante	Fonte ou Referência
Cepas de <i>C. violaceum</i>		
<i>C. violaceum</i> ATCC 12472	<i>C. violaceum</i> selvagem	ATCC
FN1	<i>phoA</i> ₂ ::pKNOCK-Km	Este estudo
FN5	<i>phoA</i> ₁ ::pKNOCK-km	Este estudo
FN2	<i>pstS</i> ::pKNOCK-Km	Este estudo
FN3	<i>phoU</i> ::pKNOCK-Km	Este estudo
Cepas de <i>E. coli</i>		
DH10B	F ⁻ <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i> 80d <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ <i>lacX74</i> <i>endA1</i> <i>recA1</i> <i>deoR</i> (<i>ara</i> ; <i>leu</i>) 7697 <i>araD39</i> <i>galU</i> <i>galK</i> <i>nupG</i> <i>rpsL</i>	Coleção do laboratório
DH5α	F ⁻ <i>endA1</i> <i>glnV44</i> <i>thi-1</i> <i>recA1</i> <i>relA1</i> <i>gyrA96</i> <i>deoR</i> <i>nupG</i> Φ80d <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> Δ(<i>lacZYA</i> - <i>argF</i>)U169, <i>hsdR17</i> (<i>r_K</i> ⁻ <i>m_K</i> ⁺), λ ⁻	NEB® (Ipswich, Massachussets, Estados Unidos)
S17	Recipiente para plasmídios dependentes de Pir	(ALEXEYEV, 1999)
RP	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdS</i> (<i>r⁻ m⁻</i>) <i>dcm</i> ⁺ Tet ^r <i>gal</i> λ(DE3) <i>endA</i> Hte [<i>argU</i> <i>proL</i> BB Cam ^r]	Stratagene® (Santa Clara, California, Estados Unidos)
Star pLysS	F ⁻ <i>ompT</i> <i>hsdSB</i> (<i>rB⁻ mB⁻</i>) <i>gal dcm</i> <i>rne131</i> (DE3) pLysS (Cam ^R)	Life Technologies® (Carlsbad, California, Estados Unidos)
Plasmídeos	Genótipo relevante	Fonte ou Referência
pKNOCK-km	Plasmídio suicida, Km ^r	(ALEXEYEV, 1999)
pTZ57R/T	Vetor de clonagem	Thermo Fisher® (Waltham Massachussets, Estados Unidos)
pGEM-T easy	Vetor de clonagem	Promega® (Madison, Wisconsin, Estados Unidos)
pRK/ <i>lacZ</i> 290	Vetor de poucas cópias portando o gene <i>lacZ</i> sem seu promotor	(GOBER; SHAPIRO, 1992)
pFN13	Fusão P <i>phoU</i> - <i>lacZ</i>	Este estudo

pFN15	Fusão P <i>phoB</i> -lacZ	Este estudo
pET3a	Vetor de expressão de proteínas	Merck KGaA® (Darmstadt, Germany)
pET28a	Vetor de expressão de proteínas	Merck KGaA®
pFN21	<i>phoA</i> ₁ (50) clonado nos sítios NdeI e BamHI de pET28a	Este estudo
pFN22	<i>phoA</i> ₂ (33) clonado nos sítios NdeI e BamHI de pET3a	Este estudo

Tabela 2.2. Iniciadores utilizados neste trabalho.

Nome	Orientação	Sequência
<i>PphoB</i>	Adiante	5' – CAAGATTGGTTGCGGATGAG
	Reverso	5' – GTTGAAGGCGATCAGCTCC
<i>PphoU</i>	Adiante	5' – GAAACCATCAACCACATCGCC
	Reverso	5' – GTGTTCTGCCATGATTAGCCTC
<i>phoUp</i>	Adiante	5' – GTGGAGCAACAGATCCTGTC
	Reverso	5' – GGGTCTTCCATCATGAAGGT
<i>phoUg</i>	Adiante	5' TGGAGGAAACCATCAACCAC
	Reverso	5' GGTAACCGCGAGATGTTACC
RT- <i>pitA</i>	Adiante	5' TCACCCATAACATGCAGCAG
	Reverso	5' GTGTTACCGAGATCAACAG
<i>phoA1p</i>	Adiante	5' GGCCTCCAAGATGAACAATG
	Reverso	5' GAACATGCCTTGCTTGCC
<i>lacZ1391</i>	Reverso	5' – CCTCTTCGCTATTACGCCAG
<i>phoA2g</i>	Adiante	5' – CGAAATCCAGGTGCTGGT
	Reverso	5' – GTCTCGGCCAACGACTAC
pstS-PstI	Adiante	5'- TGCCGCTGCAGCCGGAAG
	Reverso	5'- CTGGTTCTGCAGCAGGCCG
<i>phoA2_1109</i>	Adiante	5' – TGCTGCAGACCGGCAGCGAT
	Reverso	5' – TGGCCGTCCACATAGCTGC
<i>phoA1_NdeI_50</i>	Adiante	5' - CCCTTTT <u>CATATG</u> GGCAACGCCAATCGT
<i>phoA1_BamHI</i>	Reverso	5' - TTTTGGATCCTCACAGGCCGGCGGC
<i>phoA2_NdeI_33</i>	Adiante	5' - TTTT <u>CATATG</u> GCCAAGAACGTGATCTTTTTTCTCG
<i>phoA2_BamHI</i>	Reverso	5' - TTGGATCCTTACAGGCCGAGCGCGG
<i>RT_CV1515</i>	Adiante	5'- CGAGGAAATCTGCGTGGTGA
<i>RT_phoA1</i>	Reverso	5'- CTGCCAAAATAAGGCGGCAT
<i>RT_phoA1</i>	Adiante	5'- AACGACTACCACCAGGAAGC
<i>RT_phoA2</i>	Reverso	5'- AGATCACGTTCTTGCCCTCG
<i>RT_phoA2</i>	Adiante	5'- CGACGACTACCAGCAGGAAA
<i>RT_CV1512</i>	Reverso	5'- TAGCGGACGGTTTTCTCGAC

3.2 Meios de cultura

Foram utilizados os seguintes meios de cultura:

Meio Lysogeny Broth (LB)

1% extrato de triptona, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl; pH 7,4.

Meio MOPS X1 (NEIDHARDT; BLOCH; SMITH, 1974)

0,19 M NH_4Cl ; 0,0276 M K_2SO_4 ; 0,0005 mM CaCl_2 ; 0,25 M MgCl_2 ; 0,5 M NaCl, 3×10^{-1} M $(\text{NH}_4)_6(\text{Mo}_7\text{O}_{24})$; 4×10^{-4} M H_3BO_3 ; 3×10^{-5} M CoCl_2 ; 10^{-5} M CuSO_4 ; 8×10^{-5} M MnCl_2 ; 10^{-5} M ZnSO_4 ; 4 mM Tris, 1 mM $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e MOPS (ácido 3-(N-morpholino) propanesulfônico).

Meio MOPS + CaCl_2 sem Tris (meio MCT)

Conforme acima, suplementado com 0,09 mM CaCl_2 e sem adição de Tris.

Meio SOC (Hanahan, 1985)

2% triptona, 0.5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 10 mM MgSO_4 , 10 mM MgCl_2

Meio M9 – Sambrook, 2001

M9 sais (1x), MgSO_4 (0,4 mM), Glicose (2%), CaCl_2 (20 μM), tiamina (0,2 mM), água destilada 1L

M9 sais (10x): Na_2HPO_4 (60 g/L), KH_2PO_4 (30 g/L) NaCl (5 g/L) NH_4Cl (10 g/L), água destilada 1L

Meio A (meio semi-rico utilizado para indução de carência de Pi) (LEVINTHAL; SIGNER; FETHEROLF, 1962).

0,12 M Tris, 80 mM NaCl, 20 mM KCl, 20 mM NH_4Cl , 3 mM Na_2SO_4 , 1 mM MgCl_2 , 0,2 M CaCl_2 , 2 μM ZnCl_2 , 0,5% (m/v) de glicose, 0,5% (m/v) peptona; pH 7,5

Meio TGP (ECHOLS et al., 1961)

1 mM KH_2PO_4 , 0,5% glicose $1 \cdot 2 \times 10^{-1}$ M TRIS (2-amino-2-hydroxymethylpropane-1 :3-diol); 8×10^{-2} M NaCl; 2×10^{-2} M KCl; 2×10^{-2} M NH_4Cl ;

3×10^{-3} M Na_2SO_4 ; 1×10^{-3} M MgCl_2 ; 2×10^{-4} M CaCl_2 ; 2×10^{-6} M FeCl_3

Meio 2XTY

1,6% triptona, 1% extrato de levedura, 0,5% cloreto de sódio pH 7,2

3.3 Detecção *in silico* de PHO-boxes

O genoma de *C. violaceum* foi varrido para localizar as regiões promotoras de genes pertencentes ao regulon PHO com o programa Fuzznuc do pacote EMBOSS. A sequência 5'-CTGTCATAAATCTGTCAT corresponde ao consenso de PHO-box foi utilizada, sendo permitidos até 9 *mismatches* por sequência. A probabilidade de a sequência encontrada corresponder a uma PHO-box real depende de sua localização e também de sua similaridade à sequência consenso, que foi calculada utilizando a seguinte fórmula: $S_i = (1/18) \sum_j [2 + \log_2(F_{ij})]$, onde S_i é a pontuação da sequência e F_{ij} é a frequência da base i na posição j (RICE; LONGDEN; BLEASBY, 2000; YUAN et al., 2006).

Definiu-se uma sequência como verdadeira quando sua pontuação foi igual ou maior que 0,35. A tabela com as pontuações para cada base (A, C, G ou T) em cada uma das posições na sequência do PHO-box pode ser encontrada em Yuan et al (2006).

3.4 Ensaios enzimáticos

3.4.1 Ensaio de F.A.

Para analisar a expressão de F.A. foi utilizado o substrato p-nitrofenilfosfato (FAN et al., 1966). As bactérias foram cultivadas durante a noite em meio limitado em fosfato (meio MOPS suplementado com 50 μM K_2HPO_4 e 0,5% glicose ou meio A) e rico em fosfato (meio MOPS ou meio A suplementado com 1 mM de K_2HPO_4 e 0,5% de glicose). A concentração de bactérias foi medida pelo nível de turbidez da cultura a 660 nm em espectrofotômetro.

O ensaio foi realizado acrescentando-se cerca de 100 μL da cultura de bactérias a uma solução de 900 μL de p-nitrofenilfosfato (1 mg/mL em 1 M Tris pH 9) que foi em seguida incubada a 37°C. A reação foi interrompida quando a solução

adquire a coloração amarela com a adição de 250 μL de 1 M Na_2HPO_4 . As bactérias foram precipitadas por centrifugação e o conteúdo da reação (sobrenadante) foi submetido à leitura de absorbância a 410 nm (A_{410}).

A atividade específica da fosfatase alcalina (U.E.) foi calculada pela equação: $\text{U.E. (Unidades Enzimáticas)} = A_{410} \times \text{FD}/\text{min} \times \text{DO}_{600}$, onde A_{410} é a absorbância da solução a 410 nm; FD é o fator de diluição das bactérias; min é o tempo de reação; e DO_{600} é a concentração de bactérias medida pelo nível de turbidez da cultura a 660 nm.

Para determinar o pH ótimo da enzima, foram utilizados 3 diferentes tampões (citrato, Tris e bicarbonato) englobando 9 diferentes pHs (4-12) conforme descrito em sendo o tampão acetato usado para os pH's 4, 5 e 6, o tampão Tris utilizado para tamponar pH's 7, 8 e 9 e finalmente o tampão bicarbonato para os pH's 10, 11 e 12. Os ensaios foram realizados conforme descrito acima (NILGIRIWALA et al., 2008).

3.4.2 Ensaio de β -galactosidase

A cultura de bactérias foi crescida em meio A durante a noite. No dia seguinte, adicionou-se 50 μL de 1% SDS e 100 μL de clorofórmio aos 100 μL de bactérias suspendidas em 900 μL de tampão Z (16.1 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.5 g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.75 g/L KCl, 0.25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.7 mL β -mercaptoetanol em pH 7). A reação foi iniciada através da adição de 200 μL de 4 mg/mL *orto*-Nitrofenil- β -galactosídio (ONPG) e terminada com a adição de 500 μL de Na_2CO_3 1 M. Quantificou-se a reação através da leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda 420 nm e a atividade enzimática da amostra em Unidades Miller (U.M.) foi obtida pela equação $\text{A.E.} = A_{420} \cdot \text{Fd} \cdot 1000 / \text{min} \cdot \text{DO}_{660}$, onde Fd representa o fator de diluição das células, min é o tempo do ensaio em minutos e DO_{660} representa a concentração celular.⁹

3.4.3 Ensaio de transporte de Pi

Para analisar o transporte de fosfato inorgânico em *C. violaceum*, células foram cultivadas durante a noite em MCT-GP (MCT suplementado com 0,2% de glicose e 1 mM Pi). As células foram diluídas 10 vezes em 10 mL de MCT-GP e

cultivadas até atingirem uma DO_{600} de aproximadamente 0,5.

As células foram então lavadas com MOPS 1X e ressuspensas em 10 ml de MCT-G (suplementado apenas com 0,2% glicose). Para induzir a carência de Pi, 5 mL da cultura são incubados a 37°C com agitação por mais cinco horas. Após esse período, a DO_{600} é ajustada para 0,4.

Para a realização do ensaio, foram utilizados filtros embebidos em PBS. As células preparadas anteriormente foram incubadas por cinco minutos com agitação a 37°C e em seguida foram adicionados 5 µL de 1 mM Pi + 10 µCi ^{32}P . Amostras de 0,1 mL de cada cultura foram depositadas sobre os filtros após 0,5, 1, 1,5, 2, 5, 10 e 20 minutos. Os filtros foram lavados com 5 mL de PBS imediatamente após a coleta, secos e a radioatividade medida em um cintilador Beckman Coulter, (Fullerton, California, Estados Unidos).

3.5 Manipulações de DNA

3.5.1 Reação em cadeia da Polimerase (PCR)

Uma unidade de Taq DNA polimerase, 30 pmol de cada iniciador, 200 µM de cada dNTP, e tampão específico foram adicionados a um tubo de 0,2 ml. A reação foi realizada em um termociclador por 30-35 ciclos. A temperatura de anelamento foi ajustada de acordo com a T_m do par de iniciadores utilizado. Como molde para a reação de PCR, uma colônia de bactérias foi suspensa em 200 µL de água Mili-Q (Merck KGaA) e fervida por 10 minutos. As amostras assim obtidas foram conservadas a -20 °C até o uso.

Para pares de iniciadores portando cauda com sítios de restrição, a amplificação foi realizada em duas etapas, nos cinco primeiros ciclos, a temperatura de anelamento correspondeu a T_m da sequência específica (sem o sítio de restrição). Já nos vinte e cinco ciclos restantes, a temperatura de anelamento correspondeu à T_m do iniciador inteiro.

3.5.2 Extração de DNA plasmidial

Bactérias foram crescidas durante a noite em 2 mL de meio LB. Em seguida a cultura foi centrifugada e ressuspensa em 200 µL de uma solução contendo 50

mM Tris-HCl, 10 mM EDTA e 20 µg/mL RNase A. A esta solução foram adicionados 400 µL de tampão de lise (200 mM NaOH, 1% SDS). A seguir, foram adicionados 400 µL de 3 M acetato de potássio, pH 5,5. Após centrifugação a 13,000 rpm, o sobrenadante foi transferido para outro tubo onde foram adicionados 1000 µL de isopropanol para precipitar o DNA. A seguir a solução foi novamente centrifugada e o sobrenadante descartado. O precipitado foi lavado com etanol 70% e o DNA obtido foi ressuspensionado em tampão TE (25 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA) ou água Mili-Q. Alternativamente, foi usado o kit de extração plasmidial GeneJet (Thermo Scientific®) de acordo com as normas do fabricante.

3.5.3 Eletrotransformação de bactérias

A transformação de *E. coli* com plasmídeos extraídos pelo método descrito acima foi realizada via eletroporação. Para a obtenção de células eletrocompetentes, as cepas de interesse foram cultivadas em LB por 16h à 37°C. Após este período, a amostra foi diluída 100 vezes no mesmo meio e cultivada até a fase exponencial de crescimento ($DO_{600} = 0.6$).

Neste momento, as células foram transferidas ao gelo por 30 min, centrifugadas e em seguida lavadas duas vezes com glicerol 10% gelado. As células foram em seguida ressuspensionadas em glicerol 10% e preservadas a -80°C até o momento da eletroporação.

Quando utilizadas, as culturas foram descongeladas e transferidas para cubetas de eletroporação junto com o DNA. A eletrotransformação foi realizada submetendo as células a um campo elétrico de 12 kV/cm durante 4-5 milissegundos. Logo em seguida, as bactérias foram ressuspensionadas em 1 mL de meio SOC e incubadas a 37°C por uma hora. Para isolar as bactérias transformantes, cerca de 0,1 mL dessa cultura foi semeada sobre placas ágar LB contendo o antibiótico apropriado.

3.6 Clonagens

3.6.1 Criação das fusões transcricionais utilizando o gene repórter lacZ

Os fragmentos de DNA que codificam as regiões promotoras dos genes *phoB* e *phoU* foram amplificados por PCR utilizando os iniciadores *PphoB* e *PphoU* adiante e reverso e clonados no plasmídeo pGEM T-easy (Promega®) ou no vetor pTZR/T (Thermo Fisher®), conforme recomendações dos fabricantes. Em seguida, os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição EcoRI para *PphoU* e EcoRI-HindIII para *PphoB* e ligados ao sítio correspondente no plasmídeo pRK/lacZ290, que contém o gene *lacZ* sem promotor.

Para confirmar a orientação do promotor clonado, foi realizado PCR do plasmídeo recombinante utilizando um iniciador adiante correspondente ao fragmento clonado e um iniciador reverso correspondente a *lacZ*. O produto do PCR foi então sequenciado.

3.6.2 Montagem dos vetores para expressão das proteínas *PhoA₁* e *PhoA₂*

Os genes *phoA₁* e *phoA₂* foram amplificados via PCR utilizando-se os iniciadores NdeI_*phoA₁*_50 e BamHI_*phoA₁*_R para *phoA₁* e NdeI_*phoA₂*_33 e BamHI_*phoA₂*_R para *phoA₂*, que geraram produtos com 1250 e 1430 pares de bases, respectivamente. Os *amplicons* foram digeridos com as enzimas NdeI e BamHI e clonados nos sítios correspondentes dos vetores pET28a, para *phoA₁* e pET3a para *phoA₂*, originando os plasmídeos pFN21 e pFN22, respectivamente.

3.6.3 Construção dos vetores para mutagenização

Fragmentos internos dos genes *phoA₁*, *phoA₂*, *pstS* e *phoU* foram amplificados por PCR utilizando os iniciadores *phoA₁*p Adiante e Reverso, *phoA₂*-1109 Adiante e Reverso, *pstS*_PstI adiante e reverso e *phoU*p adiante e reverso. Estes *amplicons* foram clonados no vetor pTZ57R/T. Os fragmentos internos correspondentes a *phoA₁*, *phoA₂* e *phoU* foram digeridos com as enzimas de restrição XbaI e HindIII, enquanto o fragmento interno de *pstS* foi digerido com PstI e subclonado nos sítios correspondentes de pKNOCK-km.

3.7 Conjugação

Os vetores a serem mobilizados para *C. violaceum* foram transformados em *E. coli* S17 por eletrotransformação. A cepa transformante (doadora do plasmídeo) foi crescida em LB suplementado com o antibiótico adequado durante a noite enquanto *C. violaceum* (receptora) foi incubada em meio suplementado com ampicilina (100 ug/mL). No dia seguinte, as cepas doadora e receptora foram lavadas e misturadas em solução salina 0,9%, na proporção de duas células receptoras para uma doadora. A mistura de células foi filtrada utilizando uma membrana Millipore (Merck KGaA®) 0,22 µm e a membrana foi colocada em uma placa contendo meio LB-ágar sem adição de antibiótico durante a noite.

No dia seguinte, as células foram separadas da membrana por agitação, concentradas e plaqueadas em meio LB acrescido de ampicilina e do antibiótico específico do plasmídeo a ser mobilizado, de forma a selecionar apenas *C. violaceum* portadora do mesmo.

3.8 Mutagenização por recombinação alélica

3.8.1 A. Inserção de pKNOCK

O vetor suicida pKNOCK-Km foi utilizado para nocautear os genes de interesse (ALEXEYEV, 1999). A mutagenização ocorre devido a recombinação entre pKNOCK, no qual um fragmento interno do gene alvo foi clonado, e o cromossomo. A inserção de pKNOCK dá origem a duas cópias truncadas do gene no cromossomo (Figura 3.1). Uma vez montado o vetor de mutagenização (sessão 2.6.3), este foi então mobilizado para *C. violaceum*. As bactérias foram selecionadas por resistência ao antibiótico (canamicina). Para confirmar as inserções foram realizados ensaios de PCR com iniciadores externos a ORF. Este procedimento gerou as cepas FN1, FN2, FN3 e FN5.

Figura 3.1. Esquema de mutagenização utilizado para interromper genes em *C. violaceum*. Um fragmento interno do gene alvo foi amplificado via PCR e clonado em pKNOCK. Por fim, o plasmídeo recombinante foi mobilizado para *C. violaceum*, inserindo-se no cromossomo e interrompendo o gene por um evento de recombinação homóloga. As bactérias conjugantes foram selecionadas pela resistência ao antibiótico e seu genótipo foi confirmado por PCR, utilizando-se iniciadores externos à região recombinante.

3.8.2 Seleção de mutantes *pst* em meio contendo β -glicerol-fosfato

Esse método foi utilizado para selecionar mutantes PHO-constitutivos espontâneos em genes do operon *pst*. Bactérias foram semeadas em meio MOPS enriquecido com 1 mM de K_2HPO_4 contendo 0,4 % β -glicerol-fosfato como única fonte de carbono. Para a visualização das colônias constitutivas foi espalhada sobre a placa uma solução de 40 μ g/mL XP (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato) (TORRIANI; ROTHMAN, 1961).

Uma vez que a bactéria não possui mecanismo de transporte de β -glicerol-fosfato, somente bactérias capazes de clivar essa molécula em glicerol e fosfato podem utilizá-la como fonte de carbono. A enzima que catalisa a clivagem de β -glicerol-fosfato é a fosfatase alcalina. Sendo codificada por um gene do *regulon* PHO, esta é somente sintetizada de forma substancial na fase de carência de fosfato ou de forma constitutiva em mutantes *pst*. Semeando as bactérias em meio contendo β -glicerol-fosfato como fonte de carbono e excesso de P_i , é possível selecionar mutantes nulos no operon *pst* que produzem F.A. de forma constitutiva. A enzima fosfatase alcalina também cliva o composto XP, originando colônias azuis.

3.9 Extração de RNA

A extração de RNA foi feita de acordo com o “método de passo único” descrito em (CHOMCZYNSKI; SACCHI, 1987). Um volume de 20 mL de uma cultura de bactérias foi crescida em MOPS carente ou não de Pi. Como controle, a extração de RNA também foi feita em bactérias crescidas em meio LB. A cultura foi homogeneizada em 2 mL de uma solução de RNazol (50% fenol pH 4, 1,86 M guanidina tiocianato, 12 mM citrato de sódio, 87 mM acetato de sódio pH 4,0, 0,37% sarcosil e 42 mM β -mercaptoetanol). Ao homogenizado foi adicionado clorofórmio na proporção de 400 μ L para cada 1 mL de RNazol e centrifugado por 15 minutos a 12000 rpm. À fase aquosa contendo o RNA, foi adicionado um volume igual de isopropanol e o precipitado foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm. O precipitado obtido foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em formamida. A concentração e a pureza do RNA foi medida pela absorbância a 260 e 280 nm em espectrofotômetro.

Alternativamente, foi utilizado o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as normas do fabricante.

3.10 RT-PCR

3.10.1 Tratamento com DNase

O RNA extraído por um dos métodos descritos acima foi tratado com DNase (Ambion – Life Technologies®) para eliminar o DNA presente nas amostras.

A 9 μ g de RNA foram adicionados 1 μ L da DNase, 5 μ L do tampão, 0.6 μ L de RNAsin (Promega®) em um volume final de 50 μ L. A mistura foi incubada por 30 minutos a 37 °C. Após a incubação, 5 μ L do tampão de inativação foi adicionado e mantido em temperatura ambiente por 5 minutos. Por fim, a amostra foi centrifugada e o sobrenadante foi transferido para um tubo livre de nucleases.

3.10.2 Transcrição Reversa

O seguinte procedimento foi realizado para sintetizar a primeira fita de cDNA: 2 μ g do RNA tratado com DNase foi misturado com o iniciador reverso em um tubo

de micro-centrifuga livre de RNase e mantido à 70 °C por 5 minutos. À esta mistura foram adicionados 5 µL do tampão de reação M-MLV 5X, 1.25 µL de dATP, 1.25 µL de dCTP, 1.25 µL de dGTP, 1.25 µL de dTTP, 25 unidades de Rnasin e 200 unidades da enzima M-MLV RT (Promega®) para um volume final de 25 µL. A reação foi incubada por 60 minutos a 42 °C. A transcriptase reversa foi inativada pela temperatura de 65 °C por 10 minutos para então o cDNA ser amplificado por PCR utilizando-se os iniciadores adequados.

3.11 Expressão das proteínas PhoA₁ e PhoA₂

3.11.1 Super expressão de PhoA₁ e PhoA₂

Culturas da cepa de *E. coli* Star portando o plasmídeo pFN21 e *E. coli* RP portando o plasmídeo pFN22 foram crescidas durante quatro horas em meio 2XTY a 37°C com agitação até atingir a DO₆₀₀ de 0,8. Neste momento, foi recolhida uma alíquota. Ao restante das culturas foram adicionados 400 µM de IPTG e estas foram incubadas com agitação por quatro horas a 28°C. Após este período, as células foram concentradas em 40 mL de Solução de Lise e rompidas por 1,5 horas no sonicador Vibra Cell (Sonics®, Newtown, Connecticut, Estados Unidos) ou por French Press (Thermo Fisher®). O lisado, então, foi centrifugado a 13000 rpm por 40 minutos e o sobrenadante, contendo as proteínas solúveis, foi separado do precipitado, contendo as proteínas insolúveis. Amostras do precipitado e das proteínas solúveis foram ressuspensas em água e uma alíquota de cada amostra foi aplicada em um gel desnaturante de poliacrilamida para verificar o nível de expressão proteica e a solubilidade da mesma. Para os ensaios envolvendo proteínas, apenas a fração solúvel foi utilizada.

Soluções utilizadas:

Solução de Lise

50 mM Tris (pH 7,5 ou pH 7), 1mM EDTA, 25% sacarose, 5% glicerol, 0,03% Tween-20, 0,03% Triton X-100

Tampão de amostra para proteínas

10% glicerol, 2% SDS, 50mM Tris pH6,8, 0.1% Azul de Bromofenol, 100mM β -mercaptoetanol

Soluções para SDS-PAGEGel de separação

12% Acrilamida, 0.32% bis acrilamida, 0,375 M Tris pH 8,8 0,1% SDS 0,1% persulfato de amônio, 0,002% TEMED

Gel de empilhamento

5% Acrilamida, 0, 13% bis acrilamida, 0,189M Tris pH 6,8 0,1% SDS, 0,1% persulfato de amônio, 0,002% TEMED

Tampão de corrida para SDS-PAGE

25 mM Tris, 200 mM glicina, 0,1% SDS

3.11.2 Purificação de PhoA₁

A proteína PhoA₁ foi purificada por cromatografia de afinidade utilizando a coluna HiTrap 5mL (Amersham® - GE Health, Piscataway, New Jersey, Estados Unidos) e por cromatografia de gel filtração utilizando a coluna GF 200 (GE Healthcare®). O sobrenadante do lisado da cultura de *E. coli* Star portando o plasmídeo pFN21, no qual se encontra a proteína PhoA₁, foi aplicado ao aparelho AKTA (GE Healthcare®) para cromatografia de afinidade em coluna quelante de níquel. A coluna foi equilibrada em solução A de coluna de afinidade e foi feito gradiente de concentração da solução B de coluna de afinidade. Os picos de absorbância a 280 nm foram coletados e estes foram separados por SDS-PAGE. As frações contendo a proteína de interesse foram submetidas a gel filtração. As frações resultantes da gel filtração foram submetidas a SDS-PAGE para verificar o grau de pureza das mesmas.

Soluções utilizadas:Soluções de Purificação por Coluna de AfinidadeSolução A

50 mM Tris pH7,5, 200 mM NaCl, 10 mM Imidazol

Solução B

50 mM Tris pH 7,5, 200 mM NaCl, 500 mM Imidazol

Solução de Gel Filtração

10 mM Tris pH7,5, 1 mM EDTA, 20 mM NaCl

3.11.3 Purificação de PhoA₂.

A proteína PhoA₂ foi purificada utilizando o método de cromatografia por troca iônica utilizando uma coluna de SP Sepharose 55 (GE Helthcare®). A coluna foi equilibrada com solução A de troca iônica e foi feito gradiente de solução B de troca iônica. Os picos de absorbância a 280 nm foram coletados e separados por SDS-PAGE para verificar a pureza e quantidade de proteína purificada.

Soluções utilizadas:Solução de Purificação por Troca IônicaSolução A

50 mM Tris pH7, 1 mM EDTA

Solução B

50 mM Tris pH7, 1 mM EDTA, 500 mM NaCl

Solução de Gel Filtração

10 mM Tris pH7, 1 mM EDTA, 20 mM NaCl

3.11.4 Quantificação de proteínas

Para determinar a concentração de proteínas, foi utilizada a fórmula $[Proteína] = (A_{280} - A_{330}) / \text{Coeficiente de extinção}$. Em que A_{280} representa a absorbância da proteína de interesse, A_{330} representa a absorbância de agregados proteicos e impurezas e coeficiente de extinção é um valor intrínseco a cada proteína, sendo 0,373 para PhoA₁ e 0,404 para PhoA₂.

3.11.5 Far-western

Para determinar se há interação entre PhoA₁ e PhoA₂, foi conduzido um ensaio de *far-western*. O extrato celular de *E. coli* RP portando o plasmídeo pFN22 induzido para a produção de PhoA₂ foi submetido a SDS-PAGE (12%) e depois transferido para uma membrana de nitrocelulose utilizando o aparelho de transferência semi-seca TE 70 PWR (Amersham® - GE Healthcare), por 30 minutos, a 60 mA. *E. coli* RP portando o plasmídeo pFN22 não induzida e PhoA₁ purificada foram usadas como controle negativo e positivo, respectivamente. Em seguida, a membrana foi bloqueada utilizando 30 mL de solução de bloqueio por duas horas. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com 0,5 mg de PhoA₁ purificada, durante a noite. No dia seguinte, a membrana foi lavada três vezes com solução TBS, por 15 minutos cada lavagem. Após as lavagens, a membrana foi incubada com 30 mL de solução de bloqueio acrescida de anticorpo monoclonal anti-poly-histidine diluído seis mil vezes (Sigma®, Saint Louis, Missouri, Estados Unidos H1029, produzido em camundongo) durante a noite, com agitação de 50 rpm. No dia seguinte, a membrana foi lavada três vezes com solução TBS por 15 minutos cada lavagem e em seguida incubada durante a noite com solução de bloqueio acrescida de anticorpo anti IgG de camundongo acoplado com peroxidase diluído doze mil vezes (Sigma® - A9044, produzido em coelho) com agitação de 50 rpm.

Para revelar, a membrana foi lavada três vezes com solução TBS e foi utilizado o kit ECL Advance™ Western Blotting Detection (BioRad®, Hercules, California, Estados Unidos) de acordo com as normas do fabricante.

Soluções utilizadas:

Solução de Transferência de proteínas

5,81 g/L Tris base, 2,98 g/L, 0,0375% SDS, 20% metanol pH8,3

Solução TBS

TBS (1x), 0.03% Triton X-100, 0.03% Tween-20

TBS (10x): 24,4 g/L Tris base, 80 g/L NaCl

Solução de Bloqueio de membrana

Solução TBS, 5% leite em pó

3.11.6 Pull Down

Um segundo método para investigar a interação entre PhoA₁ e PhoA₂ é o ensaio de *pull down*. 150 mg de cada proteína foram misturadas e incubadas durante a noite em 350 µL de resina Sepharose quelante fast flow (GE Healthcare®) saturada com níquel e equilibrada com solução A de afinidade. Como controles, foram utilizados PhoA₁ e PhoA₂ separadas, além de uma outra proteína portadora de cauda de histidina. No dia seguinte, a resina foi centrifugada e o primeiro sobrenadante, que possui as proteínas que não ligaram à resina, foi coletado. Seguiram-se quatro lavagens com 1 mL de 50 mM Tris pH8 de 10 minutos cada e depois foi feita eluição com 100 µL de solução B de afinidade. O sobrenadante desta eluição foi coletado e, junto com as proteínas não ligadas, submetido a SDS-PAGE. Alternativamente, o extrato celular de *C. violaceum* e suas derivadas FN1 e FN5 e as diferenças no perfil proteico são analisadas.

3.11.7 Gel Filtração analítica

Outro método utilizado para verificar se há interação entre PhoA₁ e PhoA₂ é a Gel filtração analítica. A coluna de gel filtração analítica GF 200 (GE Helthcare®) foi calibrada com as seguintes proteínas: Blue Dextran (2000 kDa), Albumina (112 kDa), Álcool Desidrogenase (39,8 kDa), Anidrase Carbônica (29 kDa).

Após a calibração da coluna, 300 mg de PhoA₁ foram aplicados à coluna e o volume necessário para eluir a proteína foi comparado aos volumes das proteínas da calibração, permitindo inferir se as proteínas analisadas são monômeros ou homodímeros.

A relação entre o logaritmo da massa molecular de cada proteína e a razão entre o volume de eluição/volume de exclusão da coluna é linear (volume de eluição do composto Blue Dextran). Deste modo, plotando-se estes pontos, é possível obter uma curva de calibração com sua equação de reta, tornando possível inferir a massa de uma proteína pelo volume em que ela eluiu.

Solução utilizada:

Solução de Gel filtração analítica

10 mM Tris pH 7,5, 1 mM MgCl₂, 0,1 mM ZnCl₂

3.12 Micro-determinação de fosfato (CHEN; TORIBARA; WARNER, 1956)

Para medir a concentração de fosfato presente nos meios de cultura nos quais as bactérias foram inoculadas foi realizada a leitura da absorbância (A_{820nm}) gerada pela redução do complexo fosfomolibdato na presença de ácido ascórbico, conforme descrito em Chen *et al*, 1956. Bactérias foram inoculadas nos meios de interesse durante quinze horas. Em seguida, as bactérias foram centrifugadas a 7.000 rpm durante 5 minutos e o sobrenadante foi coletado para realizar a micro-determinação de fosfato. Como comparação, o fosfato contido em meio estéril foi medido. Deste modo, foi possível determinar a concentração de fosfato que cada cepa captou do meio.

Os reagentes utilizados para realizar o ensaio de micro-determinação de fosfato foram 167 mM ácido sulfúrico, 2.5% molibdato de amônio, 10% ácido ascórbico e uma solução padrão de estoque equivalente a 0.16 mM de fosfato diluído em 50 mM de ácido clorídrico. A curva padrão foi construída realizando diluições seriadas obtendo as concentrações de 0.16, 0.08, 0.04, 0.02 e 0.01 mM de Pi. Água deionizada foi utilizada como referência. A mistura de 1 volume de 167 mM ácido sulfúrico, 1 volume de 10% ácido ascórbico, 1 volume de 2.5% molibdato de amônio e 2 volumes de água deionizada foi preparada e 1 mL desta mistura foi adicionado a 1 mL de cada amostra em tubos de 2mL. O tubo foi agitado vigorosamente, vedado com *parafilm* e incubado em estufa 37 °C por uma hora e meia. Após a incubação, foi feita a leitura da turbidez a 820nm. Como padrão de referência a amostra contendo água deionizada foi utilizada.

3.13 Ensaio de sobrevivência em situações de estresse

Bactérias foram crescidas durante a noite em meio LB. No dia seguinte, foram lavadas em solução salina e diluídas para aproximadamente 2×10^3 bactérias por mL na condição estressante a ser testada. O grupo controle não foi submetido a nenhum tipo de stress, sendo plaqueado diretamente em meio LB e incubado durante a noite a 37°C. A taxa de sobrevivência das bactérias foi calculada como sendo a relação entre o número de U.F.C. contadas após a exposição ao stress testado e o grupo controle.

3.13.1 Estresse osmótico

Para testar a sobrevivência a alta osmolaridade, *C. violaceum* foi incubada em NaCl 1 M. Alíquotas de 100 µL foram retiradas em tempos determinados, plaqueadas em meio LB-ágar e incubadas a 37°C durante a noite.

3.13.2 Estresse oxidativo

6 mM H₂O₂ foram adicionados para verificar a resistência de *C. violaceum* a stress oxidativo. Alíquotas de 100 µL foram retiradas em tempos determinados, plaqueadas em meio LB-ágar e incubadas a 37°C durante a noite.

3.13.3 Estresse frio

100 µL foram plaqueados em meio LB-ágar, e as placas incubadas a 4°C por períodos variados de tempo e, por fim, incubadas a 37°C para permitir o crescimento das bactérias sobreviventes.

4 RESULTADOS

4.1 Determinação das condições de cultivo de *C. violaceum*.

Para se estudar a carência de Pi, faz-se necessário, primeiramente, determinar as condições de cultivo desta bactéria para que este estado fisiológico possa ser induzido.

Sendo uma bactéria quimioorganotrófica não fastidiosa, *C. violaceum* deveria ser capaz de crescer, a princípio, em um meio de cultura simples contendo sais e uma fonte orgânica de carbono, para tal, foram testados os meios de cultura definidos TGP, M9 e MOPS tamponados com Tris, $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ e MOPS, respectivamente. A bactéria foi capaz de crescer nos meios MOPS e M9, mas não no meio TGP.

Para melhorar o crescimento de *C. violaceum* no meio MOPS, a este foi adicionado uma concentração de 0,09 mM de CaCl_2 , para se igualar à concentração deste nutriente no meio M9. Outra modificação foi a subtração de Tris deste meio, pois; tendo em vista que *C. violaceum* não apresentou crescimento no meio TGP, é possível que Tris seja tóxico à bactéria. Este meio foi chamado de MCT, sendo adotado como meio mínimo padrão neste trabalho.

Para verificar os requerimentos mínimos de Pi que suportam o crescimento de *C. violaceum* foram testadas concentrações variadas deste nutriente. A Tabela 3.1 mostra a formação de colônias em placas incubadas por 48 h em meio MCT. Ao contrário de *E. coli*, *C. violaceum* apresentou colônias no meio suplementado com apenas 0,001 mM de Pi. Como esperado, nenhuma bactéria cresceu na ausência de Pi.

A figura 4.1 mostra que com 0,01 mM Pi, uma concentração limitante para *E. coli*, *C. violaceum* apresentou um crescimento tão vigoroso quanto com concentrações maiores deste nutriente, com taxa de crescimento de $0,19 \text{ h}^{-1}$ e tempo de geração de 3,63 horas na fase de crescimento exponencial (8 a 15 horas). O único meio em que esta bactéria apresentou taxa de crescimento menor foi aquele suplementado com 0,001 mM Pi, cuja taxa de crescimento foi de $0,11 \text{ h}^{-1}$ e tempo de geração de 6,27 horas, estacionando por volta de 13 horas após o início do ensaio.

Tabela 4.1. Crescimento de *C. violaceum* e *E. coli* em meio MCT suplementado com diferentes concentrações de fosfato após 48 horas.

mM Pi	Cepa	
	<i>E. coli</i>	<i>C. violaceum</i>
0	-	-
0.001	±	+
0.01	±	+
1	+	+
10	+	+

'+' representa formação de colônias grandes; '-' representa ausência de crescimento; '±' representa formação de colônias pequenas (menores que 1,5 mm).

Figura 4.1. Crescimento de *C. violaceum* selvagem em meio MCT suplementado com concentrações diversas de Pi, ao longo do tempo, a 37°C com agitação.

4.2 Fosfatase Alcalina (F.A.)

C. violaceum possui no seu genoma dois genes *in tandem* anotados como *phoA* - *phoA*₁ e *phoA*₂. Não se sabe se ambos os genes codificam para proteínas funcionais, nem se estas proteínas formam duas enzimas monoméricas, uma enzima homodimérica, ou ainda, uma enzima heterodimérica. As condições necessárias para a síntese da F.A. de *C. violaceum* também são desconhecidas.

4.2.1 Cinética da expressão da F.A. em meio A.

C. violaceum exibe rendimento de cultura baixo quando cultivada em meio MCT, levantando a necessidade de se conseguir um meio de cultura com quantidade de Pi variável e que suporte taxas de crescimento e rendimento mais elevados.

Neste sentido, o meio A surgiu como opção ideal, sendo utilizado nos ensaios posteriores. Este meio foi escolhido por ser um meio em que *C. violaceum* apresenta resposta à carência de Pi, observado via indução da expressão de F.A., além de se obter maior rendimento de cultivo quando comparado ao meio MCT.

Portanto, foi feita uma curva de crescimento de *C. violaceum* em meio A suplementado com 1 mM Pi e não-suplementado, cuja concentração inicial de Pi é de 0,1 mM, para comparar as taxas de crescimento e rendimento nestes meios. A cinética de indução de F.A. neste meio de cultura também foi medida para assegurar que a cepa cultivada em baixo Pi induziu a expressão do regulon PHO e foram realizadas contagens de U.F.C., afim de eliminar possíveis artefatos da espectrometria.

A figura 3.2A mostra que o crescimento da bactéria em carência ou suficiência de Pi é praticamente igual. É interessante notar que, mesmo após haver induzido a expressão da F.A. a partir da 7^a hora em meio A -Pi, as bactérias seguem crescendo, se bem que com uma taxa bem mais modesta ($0,22 \text{ h}^{-1}$, frente a $0,65 \text{ h}^{-1}$ observado no começo do experimento) tanto no meio suplementado como no não-suplementado com Pi (Fig. 3.2A e C). Isto sugere que a indução do regulon PHO ocorre antes que as bactérias estacionem, diferentemente de *E. coli*, onde a indução da F.A. ocorre concomitantemente com uma drástica diminuição na taxa de crescimento (WANNER, 1983).

É possível notar que há um paralelo entre o aumento da contagem de U.F.C./mL (figura 3.2B) e o aumento na turbidez (DO_{660}), correspondendo ao crescimento real da cultura.

Relacionando as medidas de turbidez com as colônias resultantes do processo de semeadura, conclui-se que 1 unidade de DO_{660} equivale a 5×10^8 U.F.C./mL.

Figura 4.2. Indução da F.A. em meio A. As bactérias foram cultivadas em meio A suplementado com 1 mM Pi (+Pi) ou sem suplementação (-Pi). A) Densidade óptica medida em 660 nm; B) Contagem das unidades formadoras de colônia. C) Cinética de indução da F.A., medida em unidades enzimáticas (u);

4.2.2 Obtenção de mutantes constitutivos para a expressão da F.A.

E. coli não possui transportadores específicos para β -glicerol-fosfato, sendo preciso hidrolisar este composto em glicerol e Pi no periplasma antes de captá-lo, hidrólise esta feita pela F.A.. Mutantes constitutivos do regulon PHO são capazes de hidrolisar este composto, mesmo em situação de excesso de Pi.

Deste modo, se uma população de células de *E. coli* for semeada em uma placa contendo β -glicerol-fosfato como única fonte de carbono e suficiência de Pi, é possível selecionar mutantes constitutivos para PHO, pois estas serão as únicas capazes de crescer nestas condições. O substrato cromogênico da F.A., XP, é também adicionado ao meio de cultura, conferindo à colônia uma cor azul. Esta metodologia foi aplicada à *C. violaceum* com o objetivo de isolar e posteriormente estudar mutações que causam a constitutividade do regulon PHO.

Depois de uma semana de incubação, entretanto, a placa semeada com *C. violaceum* apresentou um fundo azul, com colônias brancas em grande quantidade (figura 3.3B). Era esperada a obtenção de colônias azuis em um fundo branco, como ocorre com *E. coli* (figura 3.3A), evidenciando o crescimento de mutantes constitutivos para PHO.

Uma possível explicação é a de que, diferentemente do que ocorre com *E. coli*, a F.A. de *C. violaceum* é exportada para o meio, onde o β -glicerol-fosfato é clivado, disponibilizando assim glicerol para que as bactérias possam captá-lo e utilizá-lo como fonte de carbono. Isto explicaria a presença de um “tapete” azul de fundo (X-P hidrolisado pela ação da F.A. extracelular) e a impossibilidade em obter mutantes PHO-constitutivos (colônias azuis) por esse método.

Figura 4.3. Crescimento de *E. coli* MG1655 (A) e *C. violaceum* (B) em placas de meio MCT tendo β -glicerol-fosfato como única fonte de carbono e acrescido de 1 mM Pi e XP após sete dias a 37°C.

4.2.3 Atividade da F.A. em diferentes pHs e localização da enzima.

Tendo uma indicação de que pelo menos parte da atividade de F.A. pode ocorrer fora da célula, como indicado na figura 3.3, faz-se necessário verificar o quanto desta atividade ocorre extracelularmente. Bactérias foram cultivadas durante a noite em meio MCT contendo 50 μ M de Pi (meio limitado em Pi) ou em 10 mM de Pi (concentração saturante de Pi). No dia seguinte, a cultura total (T), somente as bactérias (C) e o *spent* (sobrenadante da cultura) (S) foram ensaiados para a F.A. (figura 3.4).

A maior parte da atividade de F.A. (aproximadamente 75%) foi encontrada na fração celular (citoplasma ou periplasma), mas 25% da atividade foi secretada para o meio. Os resultados mostram também que o pH ótimo de atividade para F.A. de *C. violaceum* é em torno de 11. Apesar deste resultado, os ensaios de F.A. subsequentes foram feitos em pH 9,2, pois o tampão padrão para os ensaios de F.A. é o Tris e este seria o pH limite para a sua utilização.

Há também a presença de uma fosfatase ácida, ativa tanto em carência quanto em suficiência de Pi, indicando que esta enzima não está sob controle de PHO.

Figura 4.4. Atividade de F.A. em diferentes pHs. As culturas foram incubadas durante a noite a 37°C em MCT contendo 50 µM de KH₂PO₄ para induzir carência de Pi e 10 mM de KH₂PO₄ para suficiência de Pi. A reação da F.A. realizou-se a 37°C. Os códigos utilizados para designar as amostras acima significam: T = cultura total; C = pellet (células lavadas); S = sobrenadante; '+' representa bactérias cultivadas em excesso de Pi; e '-' representa bactérias cultivadas em meio limitado em Pi.

4.2.4 *phoA*₁ e *phoA*₂ formam um operon

A análise da região de *phoA* no cromossomo de *C. violaceum* mostra a existência de quatro quadros abertos de leitura *in tandem* na mesma orientação – *cv1512*, *phoA*₁, *phoA*₂ e *cv1515*. *cv1512* e *cv1515* foram anotados como codificadores de proteínas hipotéticas e *phoA*₁ e *phoA*₂, como fosfatases alcalinas, indicando uma duplicação no gene *phoA*. Para verificar se esses genes são transcritos em um mesmo mRNA, e formam, portanto, um operon, o RNA total foi extraído em condição de carência de Pi e o cDNA foi sintetizado conforme descrito na seção Metodologia, utilizando os iniciadores adiantes e reversos descritos na figura 3.5.

Figura 4.5. Esquema do contexto gênico de *C. violaceum* em torno dos genes *phoA*₁ e *phoA*₂, e os iniciadores utilizados para os experimentos de RT-PCR. RTcv1515_For e RTphoA₁_Rev foram utilizados para amplificar um fragmento de 247 pb abrangendo desde a região 3' de *cv1515* até o 5' de *phoA*₁. RTphoA₁_For e RTphoA₂_Rev foram utilizados para amplificar um fragmento de 276 pb abrangendo entre o 3' de *phoA*₁ até o 5' de *phoA*₂. RTphoA₂_For e RTcv1512_Rev foram utilizados para amplificar um fragmento de 346 pb entre o 3' de *phoA*₂ e o 5' de *cv1512*.

Como se pode observar na figura 3.6, um fragmento de cDNA que engloba *phoA*₁ e *phoA*₂ foi formado, indicando que estes dois genes formam um operon. Não foram detectados fragmentos correspondentes aos transcritos *cv1515-phoA*₁ e *phoA*₂-*cv1512*. Como controles, foram utilizados RNA não-tratado com transcriptase reversa (controle negativo) e DNA genômico (controle positivo).

Figura 4.6. RT-PCR dos genes *cv1515*, *phoA1*, *phoA2* e *cv1512* para verificar a transcrição conjunta destes genes. a) RNA, b) cDNA, c) DNA genômico. 1) RT*cv1515*_For e RT*phoA1*_Rev (247 pb) 2) RT*phoA1*_For e RT*phoA2*_Rev (276 pb) 3) RT*phoA2*_For e RT*cv1512*_Rev (346 pb).

4.2.5 Predição de peptídeo sinal e de aminoácidos canônicos para a coordenação dos íons metálicos conservados nas sequências de *PhoA₁* e *PhoA₂*.

Para detectar a possível presença de um peptídeo sinal nas sequências de *PhoA₁* e *PhoA₂*, indicando que elas seriam exportadas, foi realizada uma análise das sequências proteicas com o programa Signal IP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). Como controles, foram usadas as sequências de ECAP, sabidamente exportada para o periplasma e DnaA, sabidamente citoplasmática. As análises mostraram que possivelmente *PhoA₁* e *PhoA₂* possuem peptídeo sinal com pontos de clivagem, respectivamente, entre os aminoácidos 42 e 43 e entre os aminoácidos 29 e 30. Para efeito de comparação, ECAP tem seu peptídeo sinal clivado entre os aminoácidos 22 e 23 e DnaA não possui sítio de clivagem. Esta análise sugere que *PhoA₁* e *PhoA₂* são exportadas do citoplasma, apesar de não precisar o destino final destas proteínas.

Há, na sequência de *PhoA₁*, um resíduo de metionina anotado na posição 25. Se considerar este resíduo como o primeiro aminoácido da proteína, a posição do peptídeo sinal passa a ser entre os aminoácidos 17 e 18.

Com o objetivo de verificar a possibilidade das proteínas *PhoA₁* e *PhoA₂* serem ambas funcionais, foi feito um alinhamento de suas sequências em comparação com ECAP, visando localizar o sítio ativo e os sítios de coordenação dos metais, essenciais para a atividade enzimática de F.A.. Para melhorar o alinhamento, a sequência do peptídeo sinal foi manualmente removida. A figura 3.7 mostra o alinhamento obtido com o programa ClustalW e as marcações dos resíduos Asp327, His331, His412, envolvidos na coordenação do íon Zn^{2+} (1); os resíduos His370, Asp369 e Asp51, responsáveis pela coordenação do segundo íon Zn^{2+} ; os resíduos

Asp51, Glu322 e Thr155, coordenadores do íon Mg^{2+} e o resíduo de serina102, responsável pelo ataque inicial ao fósforo. Todas as regiões envolvidas na atividade enzimática estão conservadas nas duas sequências de *C. violaceum*, sinalizando a possibilidade de que ambas as sequências possam ser proteínas funcionais.

Figura 4.7. Alinhamento de PhoA₁, PhoA₂ (*C. violaceum*) e ECAP utilizando o programa ClustalW. Estão destacadas por retângulos as regiões necessárias para a coordenação dos íons metálicos e o sítio catalítico de ECAP e seus correspondentes em PhoA₁ e PhoA₂ em uma região conservada nas três sequências. O retângulo vermelho mostra o resíduo catalítico Ser102. Os retângulos azuis destacam os resíduos necessários para coordenação do íon Zinco (1), os retângulos roxos destacam os resíduos necessários para a coordenação do íon Zinco (2) e os retângulos verdes indicam os resíduos envolvidos na coordenação do íon Magnésio. O resíduo Asp51 está envolvido na coordenação tanto do íon magnésio quanto do íon Zinco (2).

4.2.6 Filogenia de PhoA₁ e PhoA₂

É interessante notar em *C. violaceum* uma organização incomum de genes codificadores para a fosfatase alcalina. Uma busca no banco de dados GenBank, mostra, entretanto, que *C. violaceum* não é a única bactéria a possuir mais de um gene anotado como *phoA*. A figura 3.8 mostra a relação entre proteínas preditas como PhoA₁ e PhoA₂ das bactérias de ambiente *Cupriavidus necator*, *Cupriavidus metallidurans*, *Ralstonia pickettii* e *Chromobacterium violaceum* e dos patógenos *Burkholderia oklahomensis*, *Burkholderia thaislandensis* e *Aeromonas salmonicida* com base em anotações de genomas depositados nos bancos de dados do NCBI. As sequências foram alinhadas utilizando o programa ClustalX e a árvore foi montada com o programa Mega, utilizando o método de Kimura – dois parâmetros e com valores de bootstrap para 1000 repetições.

Destes organismos, apenas *A. salmonicida* não pertence ao grupo β -proteobacteria e, entre estas, apenas *C. violaceum* não é membro da ordem Burkholderiales. Como grupo externo, foi utilizada a proteína ECAP, pois esta bactéria possui apenas um gene de fosfatase alcalina em seu genoma.

Fica bastante claro por esta árvore que as proteínas PhoA₁ e PhoA₂ formam grupos separados. Uma exceção é a proteína PhoA₂ de *C. Necator*, mas esta poderia ter sido anotada como PhoA₁, pois é a primeira proteína do operon *phoA* no contexto gênico desta bactéria. Fica evidente, também, a distância entre estes conjuntos de proteínas e a proteína ECAP, sugerindo um evento de duplicação gênica ancestral e uma linha evolutiva diferente, com a possibilidade de que a F.A. destas bactérias forme um sistema diferente dos que já foram descritos na literatura, necessitando de PhoA₁ e PhoA₂ para sua completa funcionalidade, ao contrário de ECAP, que é homodimérica.

Figura 4.8. Árvore filogenética de proteínas anotadas como *PhoA₁* e *PhoA₂* de *C. violaceum* e de outras seis bactérias. ECAP foi utilizada como grupo externo. Para o alinhamento das sequências, foi utilizado o programa ClustalX e para a construção da árvore, o programa Mega, utilizando o método de Kimura – dois parâmetros e com valores de bootstrap para 1000 repetições. *C. necator* teve seus genes anotados de forma invertida, sendo *phoA₂* o primeiro gene e *phoA₁* o segundo no operon.

4.2.7 Construção dos mutantes *phoA₂* e *phoA₁*

Para se estudar melhor este sistema gênico, foram construídos mutantes nulos nos genes *phoA₂* e *phoA₁* através da inserção do plasmídeo suicida pKNOCK-Km.

A inserção de pNOCK-Km no cromossomo de *C. violaceum* foi descrita na seção Metodologia, sendo as inserções confirmadas via amplificação por PCR. Os iniciadores utilizados para detectar a inserção em *phoA₂* foram *phoA₂*g Avante e *phoA₂*g Reverso (figura 3.9 A), gerando uma banda de 1837 pb na cepa selvagem e 4258 pb na cepa portando a inserção pKNOCK-km-*phoA₂* (FN1). Para *phoA₁*, foram utilizados os iniciadores RT_*cv1515* adiante e RT_*phoA₂* Reverso, gerando uma banda de 1874 pb na cepa selvagem e uma banda de e 4374 pb na cepa portando a inserção pKNOCK-km-*phoA₁* (FN5) (figura 3.9 B)

Figura 4.9 – A) PCR para detecção da inserção pKNOCK-km-*phoA*₂ no cromossomo de *C. violaceum*. FN1 é a cepa mutante para *phoA*₂ e WT é a cepa selvagem. Os iniciadores utilizados para a reação foram *phoA*₂g Adiante e Reverso. A banda selvagem possui 1837 pb, enquanto o tamanho esperado para a inserção de pKNOCK-km-*phoA*₂ é de 4258 pb. B) PCR para detecção da inserção pKNOCK-km-*phoA*₁ no cromossomo de *C. violaceum*. FN5 é a cepa mutante para *phoA*₁ e WT é a cepa selvagem. Os iniciadores utilizados para a reação foram RT_CV1515 Adiante e RT-*phoA*₂ Reverso. A banda selvagem possui 1874 pb, enquanto o tamanho esperado para a inserção de pKNOCK-km-*phoA*₁ é de 4374 pb..

Testes de fosfatase alcalina foram feitos para confirmar os fenótipos mutantes em bactérias crescidas durante a noite em meio A carente de Pi em comparação à cepa selvagem (figura 3.10). Os resultados mostram que a atividade de F.A. nos mutantes *phoA*₁ e *phoA*₂ ficou em torno de 15% (16% e 13%, respectivamente) da atividade apresentada pela cepa selvagem cultivada nas mesmas condições.

Figura 4.10. Atividade da fosfatase alcalina da cepa mutante *phoA₂* (FN1), *phoA₁* (FN5) em comparação à cepa selvagem (CvWT). Bactérias foram cultivadas em meio A sem adição de Pi durante a noite. A barra de erros indica o desvio padrão da atividade de F.A. de três ensaios distintos.

4.2.8 Análise do efeito polar da mutação *phoA₁::pKNOCK-Km*

É possível que a inserção de pKNOCK em *phoA₁* tenha um efeito polar sobre *phoA₂*. Para testar essa possibilidade, foi realizado um ensaio de RT-PCR em que o RNA total do mutante FN5 cultivado em situação de carência de Pi foi extraído e o cDNA correspondente a *phoA₂* foi amplificado utilizando os iniciadores *phoA₂* F e *phoA₂* R, de acordo com o procedimento detalhado na sessão Metodologia. A figura 3.11A esquematiza o procedimento.

A presença de cDNA amplificado na amostra FN5 indica que não houve terminação de transcrição causada pela inserção do plasmídeo suicida em *phoA₁*. Este resultado refuta a hipótese de que FN5 apresenta atividade defeituosa de F.A. devido a uma terminação transcricional prematura que estaria afetando a expressão do gene *phoA₂* (figura 3.11B).

Figura 4.11. RT-PCR de *phoA₂* em FN5. A) Esquema do contexto gênico e dos iniciadores utilizados para amplificar *phoA₂* na cepa mutante FN5. B) RT-PCR de *phoA₂* em FN5. C representa o controle negativo da reação, ao qual não foi adicionada transcriptase reversa e P mostra o produto de amplificação do cDNA, utilizando RNA extraído da cepa FN5. O RNA total foi extraído de bactérias cultivadas em carência de Pi, a 37°C, durante a noite. O tamanho do produto de RT-PCR esperado é de 450 pb.

4.2.9 Interação entre *PhoA₁* e *PhoA₂*

O incomum contexto gênico de *phoA₁* e *phoA₂*, aliado ao fato de que seus respectivos mutantes apresentaram severa redução na atividade de F.A., suscitou a hipótese de que estas duas proteínas são funcionais, interagindo entre si para resultar na F.A. ativa de *C. violaceum*.

Para testar tal hipótese, as duas proteínas foram super expressas e testadas quanto à capacidade de interagirem entre si e também quanto à capacidade de cada uma delas em formar homodímeros.

4.2.9.1 Expressão de *PhoA₁* e *PhoA₂*

Para expressar *PhoA₁*, um fragmento do gene correspondente à proteína a partir de seu 50º aminoácido (eliminando assim o peptídeo sinal) foi clonado no vetor pET28a, gerando uma proteína fusionada com uma cauda de histidina no N-

terminal. A figura 3.12 mostra PhoA₁ expressa em *E. coli* Star após os processos de purificação de cromatografia de afinidade e gel filtração.

Figura 4.12. PhoA₁ expressa em *E. coli* Star e purificada por cromatografia de afinidade e por exclusão de tamanho e submetida a SDS-PAGE 12% corado com Comassie Blue. Tamanho de banda esperado: 49 kDa.

Para expressar PhoA₂, um fragmento correspondente à proteína a partir do 33º aminoácido (de forma a eliminar o peptídeo sinal) foi clonado em pET3a e expresso em *E. coli* RP.

A figura 3.13 mostra PhoA₂, de peso molecular aproximado de 44 kDa, após expressão e purificação. A cromatografia de troca iônica foi escolhida para esta purificação, pois o vetor pET3a não possui sequências de DNA que codificam peptídeos que poderiam ser isolados por cromatografia de afinidade.

Figura 4.13. Purificação de PhoA₂. 1 – Proteínas totais de *E. coli* RP expressando PhoA₂. 2-9 – PhoA₂ purificada por cromatografia de troca iônica. Proteínas submetidas a SDS-PAGE 12% corado com Comassie Blue. Tamanho esperado da banda: 44 kDa.

4.2.9.2 Far western

O objetivo deste experimento é verificar se há interação entre PhoA₁ e PhoA₂. Em resumo, PhoA₂ é submetida a SDS-PAGE e transferida para uma membrana de nitrocelulose. Em seguida, PhoA₁ acoplada a uma cauda de histidina (PhoA₁-histag) é incubada com a membrana. Se PhoA₁ e PhoA₂ interagirem, PhoA₁ também ficaria aderida à membrana e anticorpos anti-histag (anticorpo primário) reagiriam a este complexo, aderindo-se a ele também. Este novo complexo (PhoA₂ + PhoA₁-histag + anticorpo anti-histag) reagiria então com o anticorpo secundário, que está conjugado com peroxidase, de forma que se PhoA₂ e PhoA₁ se complexam, o resultado será uma banda visível na chapa de detecção.

Porém, no experimento mostrado na figura 3.14, não há banda aparente do tamanho esperado para o complexo PhoA₁-PhoA₂, indicando que não há interação entre PhoA₁ e PhoA₂.

Figura 4.14. Far Western de PhoA₂ contra PhoA₁. A) Membrana de nitrocelulose corada com Ponceau 1% mostrando o extrato celular das cepas de *E. coli* não induzida (3 e 7) e induzidas para produção de PhoA₂ (4, 5 e 6), induzida para produção de PhoA₁ (2) e PhoA₁ purificada (1) A seta verde mostra a altura da banda de PhoA₂ e a seta preta, PhoA₁. B) Far western de A. PhoA₁ pura foi utilizada para incubar a membrana de nitrocelulose descrita em A. A detecção das proteínas foi realizada utilizando anticorpos anti-cauda de histidina seguida de incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase.

4.2.9.3 Pull Down

Esta técnica também permite inferir se PhoA₂ interage com PhoA₁. A proteína PhoA₁ fusionada com uma cauda de histidina foi ancorada a uma coluna de níquel. Se PhoA₂ interagir com PhoA₁, ao passar uma suspensão de proteínas PhoA₂ pela coluna, estas deverão interagir com PhoA₁ e serem eluídas conjuntamente, sendo

analizadas por SDS-PAGE.

A figura 3.15 mostra uma variação da técnica, em que o extrato celular contendo todas as proteínas de *C. violaceum* selvagem e das cepas FN1 e FN5 foram utilizados, ao invés de PhoA₂ purificada. Esperava-se obter diferenças de bandas entre a cepa selvagem e as cepas mutantes, porém não foi possível conseguir uma resolução suficiente non gel para visualizar tais diferenças, gerando resultados inconclusivos.

Figura 4.15. SDS-PAGE corado com Comassie Blue de PhoA₁ fusionada com cauda de histidina e ligada à uma resina de sefarose saturada de níquel encubada com extrato celular ou sobrenadante de *C. violaceum* selvagem ou mutantes FN1 e FN5. AP – Resina tratada com PhoA₁ purificada. 1 - *C. violaceum* selvagem – células. 2 – *C. violaceum* selvagem – sobrenadante. 3 – FN4 – células. 4 – FN4 – sobrenadante. 5 – FN1 – células. 6 – FN1 – sobrenadante. A – proteínas que se ligaram à coluna. B – Proteínas que não se ligaram à coluna. MM – Marcador de peso molecular.

4.2.9.4 Gel filtração analítica

Para analisar se a proteína PhoA₁ forma um homodímero, foi empregada a técnica de Gel Filtração Analítica, que consiste em comparar os volumes de solução necessários para eluir proteínas. Proteínas maiores são eluídas em volumes menores e vice versa. Comparando o volume necessário para se eluir a amostra com proteínas de tamanhos conhecidos, é possível inferir o tamanho da proteína eluída e assim determinar a sua organização.

As figuras 3.16A e 3.16B mostram as calibrações feitas com objetivo de determinar o volume de eluição de proteínas com diferentes tamanhos. Na figura 3.17C, 300 mg de PhoA₁ previamente purificada da expressão heteróloga em *E. coli* foram aplicados na coluna de gel filtração e seu volume de eluição foi avaliado

Figura 4.16: Volumes de eluição de proteínas com massas conhecidas e PhoA₁, de massa desconhecida, na coluna de Gel Filtração Analítica GF 200. A) Blue Dextran – 64,5 mL (2000 kDa – seta vermelha) e Álcool Desidrogenase – 114,2 mL (39,8 kDa - seta azul). B) Albumina – 116,5 mL (66,5 kDa – seta laranja) e Anidrase Carbônica - 133 mL (29 kDa – seta roxa). C) Volume de eluição de PhoA₁ - 129 mL

Conhecendo o log das massas das proteínas e as respectivas razões entre o volume de eluição e o volume de exclusão da coluna (representado pelo volume de eluição do Blue Dextran), é possível relacioná-los de maneira linear, como mostra a figura 3.17. A partir desta relação, calculou-se que PhoA₁ possui massa molecular de 42,38 kDa, contra uma massa esperada de 49 kDa, porém ainda dentro da margem de erro do método, indicando que esta proteína não forma um homodímero.

Figura 4.17. Relação entre o log da massa molecular de proteínas conhecidas e a razão entre os volumes de eluição (Ve) e o volume de exclusão da coluna GF 200 (V0). A equação da reta resultante desta calibração e o R^2 estão mostrados no gráfico. As proteínas utilizadas neste procedimento são Albumina (65 kDa), Álcool Desidrogenase (39,8 kDa) Anidrase Carbônica (25 kDa) e Blue Dextran (2000 kDa). O composto Blue Dextran tem seu volume de eluição no limite de exclusão da coluna, sendo utilizado como V0.

Os resultados do experimento de *far western* indicam que PhoA₁ e PhoA₂ não interagem, já o ensaio de *pull down* foi inconclusivo e a gel filtração analítica mostrou que PhoA₁ não forma um homodímero. Porém, como ambos os mutantes, FN1 e FN5, apresentaram severa redução na atividade enzimática de F.A., estes dois produtos gênicos são, de alguma forma, necessários para a completa funcionalidade de F.A. desta bactéria (vide Discussão).

4.3 A ativação do regulon PHO de *C. violaceum*

4.3.1 Busca por PHO-boxes no genoma de *C. violaceum*

Os genes de PHO em *E. coli* possuem, em seus promotores, sequências PHO-boxes, que interagem com a proteína PhoB fosforilada, ativando a sua transcrição. Baseado em sequências dos diversos genes de PHO de *E. coli* e de *S. meliloti*, foi determinado que o consenso para a PHO-box de proteobacérias é C T G T C A T A A A T C T G T C A T (YUAN et al., 2006).

Os promotores dos genes de PHO preditos em *C. violaceum* foram pesquisados para a presença de PHO-boxes. O número de PHO-boxes por promotor, a posição delas em relação ao ATG, e o *score* atribuído estão apresentados na tabela 3.2. Os genes anotados como *phoU*, *phoB* e o operon *phoA* possuem, em suas sequências promotoras, sítios de reconhecimento de PhoB condizentes com a sequência consenso previamente determinada. A sequência consenso utilizada para a busca, assim como as sequências de *C. violaceum*, encontram-se em anexo.

Interessante notar que não foram encontradas PHO-boxes na região promotora de *pstS* e a estranha posição da PHO-box encontrada no promotor de *phoA*₁. Porém, se o resíduo de metionina na posição 25 for considerada como o códon inicial, a posição relativa desta PHO-box é de -77 (Vide Discussão).

Tabela 3.2 PHO-boxes nos promotores de genes de PHO preditos em *C. violaceum*.

Gene	Mismatches	Distância (a montante do ATG)	Score	Acerto
<i>phoU</i>	5	-36	0,81	Sim
<i>phoB</i>	5	-46	0,83	Sim
<i>phoA1</i>	7	-2	0,58	Sim
<i>pstS</i>	9	-63	0,3	Não

4.3.2 Ativação do gene *phoB*

O gene *phoB* codifica para o ativador transcricional do regulon PHO, cuja transcrição aumenta em carência de Pi. Com o intuito de observar a ativação do promotor do gene *phoB* de *C. violaceum* durante a entrada das bactérias na fase de

carência de Pi, foi construída uma fusão transcricional entre seu promotor e o gene *lacZ* (plasmídeo pFN15).

O plasmídeo foi conjugado na cepa selvagem de *C. violaceum* e os transformantes foram cultivados em meio A sem suplementação de Pi por sete horas, com amostras sendo coletadas a cada hora para a medição de crescimento bacteriano, atividade da F.A., concentração de Pi no meio e atividade da enzima β -galactosidase. A figura 3.18 mostra os resultados obtidos.

Figura 4.18. A) Crescimento de *C. violaceum* portando a fusão transcricional *PphoB-lacZ* em meio A sem suplemento de Pi. B) Concentração de Pi restante no meio de cultura C) Atividade de β -galactosidase (*PphoB-lacZ*) D) Atividade da F.A., em unidades enzimáticas (u). Os pontos indicam a média de três experimentos independentes, enquanto a barra simboliza o desvio padrão entre eles.

Os resultados sugerem que a ativação da fusão *phoB-lacZ* e de F.A. ocorrem aproximadamente depois de cinco horas de cultivo em meio A, indicando uma resposta sistêmica à carência deste nutriente. Neste momento, a concentração de Pi extracelular atinge um nível menor do que 0,01 mM. Em relação à suficiência de Pi, a resposta à carência deste nutriente eleva a atividade do promotor de *phoB* em 100%, aproximadamente, sendo interessante notar que, mesmo em situação de suficiência de Pi, já há atividade da fusão, indicando que a expressão basal deste gene é alta, porém abaixo dos níveis necessários para ativação de PHO.

Dados da literatura mostram que *E. coli* entra em carência de Pi quando o nível deste nutriente no meio fica abaixo de 4 μ M. O regulon PHO de *C. violaceum* também é ativado nessa faixa de concentração de Pi (WANNER, 1993).

4.4 Operon *pst*

4.4.1 Construção do mutante *pstS::Km*

O gene *pstS* codifica para uma proteína captadora de Pi, que participa do transporte de Pi através do sistema Pst. Para obter um mutante neste gene, foi inserido plasmídeo suicida pKNOCK-Km no quadro aberto de leitura correspondente a *pstS*, como descrito na seção metodologia.

Para confirmar a inserção, esta foi amplificada via PCR com oligonucleotídeos que se hibridizam nas regiões contíguas àquela afetada pela mutação. A Figura 3.19 mostra que o mutante amplificou uma banda de 4166 bp, conforme esperado. A bactéria selvagem apresentou uma banda de 1716 bp. É possível notar uma banda fraca do tamanho de *pstS* selvagem na amostra do mutante. Esta banda é possivelmente devido a excisão espontânea do plasmídeo pKNOCK do cromossomo de algumas poucas bactérias mutantes. Apesar de ser um evento raro, a técnica de PCR, que é muito sensível, é capaz de detectar esse tipo de evento genético. O fragmento de DNA correspondente ao *pstS* selvagem é bem menor que o do mutante, sendo sintetizado mais rapidamente que este último, originando mais produto, mesmo se partindo de uma concentração inicial de molde bem menor.

Figura 4.19. PCR para detecção da inserção de pKNOCK no cromossomo de *C. violaceum*. Os iniciadores utilizados foram *pstSg* Diante e *pstSg* Reverso. FN2 é a cepa candidata a mutante pKNOCK-km-*pstS* e WT é a cepa selvagem, usada como controle. O tamanho da banda selvagem esperado é de 1716 pb. Já o mutante possui banda esperada de 4166 pb.

O fenótipo mutante foi confirmado por um ensaio de captação de ^{32}Pi , conforme descrito na seção Metodologia. A Figura 3.20, mostra que a capacidade de captação de Pi é aproximadamente dez vezes maior na cepa selvagem do que no mutante *pstS*, indicando que este é defeituoso na captação de Pi e que a mutação *pstS* é responsável por este fenótipo.

Figura 4.20. Captação de ^{32}Pi ao longo do tempo por *C. violaceum* selvagem (CvWT) e mutante *pstS* (FN2) submetidas previamente a cinco horas de carência de Pi.

Em proteobactérias já estudadas, tais como *E. coli* e *P. aeruginosa*, o sistema Pst atua como repressor do regulon PHO. Logo, era esperado que o mutante *pstS* fosse constitutivo para a F.A.. Com esse objetivo, foi testada a atividade de F.A. de oito candidatos a mutantes pKNOCK-*pstS* inoculados durante a noite em Meio A

suplementado com Pi (Pi+) e não suplementado com Pi (Pi-) e ensaiados para F.A.. Nenhum se mostrou constitutivo e a figura 3.21 mostra os resultados para um deles. Logo, sugere-se que o gene *pstS* de *C. violaceum* não participa da regulação da expressão do regulon PHO.

Figura 4.21. Atividade de F.A. de um candidato a mutante *pstS*. Bactérias foram inoculadas durante a noite em Meio A suplementado com Pi (Pi+) e não suplementado com Pi (Pi-).

4.4.2 Construção do mutante *phoU::Km*

phoU codifica uma proteína que, em *E. coli* e outras proteobactérias estudadas, foi descrita como parte do operon *pst*, atuando como repressora do regulon PHO.

A fim de elucidar o papel de *phoU* na fisiologia de *C. violaceum*, um mutante foi construído através da inserção do plasmídeo suicida pKNOCK-Km, gerando a cepa FN3. Para verificar a presença da inserção, esta foi amplificada via PCR, usando iniciadores externos ao gene alvo, conforme mostrado pela figura 3.22.

Figura 4.22. PCR do gene *phoU* de *C. violaceum* selvagem (WT) e mutante *phoU* (FN3) para detectar inserção do plasmídeo suicida pKNOCK. Os iniciadores utilizados foram *phoU*990F e *phoU*990R, sendo esperada uma banda de 990 pb para a cepa selvagem e uma de 3,5 kb para a cepa mutante.

Em *E. coli* e em outras proteobacterias, a mutação *phoU* resulta na constitutividade do regulon PHO. Porém, o mutante *phoU* de *C. violaceum* apresentou atividade enzimática basal quando cultivada com suficiência de Pi, sendo fenotipicamente igual à cepa selvagem, conforme mostra a figura 3.23. Os dados indicam que, ao contrário do que ocorre em *E. coli*, tanto *pstS* como *phoU* de *C. violaceum* não têm função repressora sobre a expressão do regulon PHO (WANNER, 1993).

Figura 4.23. Atividade de fosfatase alcalina, medida em unidades enzimáticas, na cepa mutante *phoU* (FN3) em carência (-) e suficiência (+) de Pi. Cepas cultivadas em meio A com ou sem adição de Pi por 16 horas a 37°C com agitação.

O gene *phoU* de *C. violaceum* não é transcrito em conjunto com o operon *pst*, ocorrendo como unidade transcricional distinta e possui em seu promotor sequências que guardam identidade com a sequência consenso PHO-box para α e γ proteobactérias. Para verificar se este gene responde à carência de Pi, sua sequência promotora foi clonada acima do gene repórter *lacZ* e o plasmídeo resultante foi transferido para *C. violaceum* selvagem. Esta cepa foi então incubada em meio A sem adição de Pi, com objetivo de monitorar sua entrada na fase de carência deste nutriente, indicada pelo aumento na atividade de F.A. e verificar se há ativação da enzima β -galactosidase. Além disso, foi monitorado o consumo de Pi e o crescimento bacteriano.

A figura 3.24 mostra que *PphoU* é ativado em carência de Pi, como pode ser observado pelo aumento da atividade de β -galactosidase, ocorrendo concomitantemente com F.A., quando a concentração de Pi no meio cai para abaixo de 0,01 mM. Interessante notar que a bactéria aparenta estacionar quando Pi fica baixo, retomando seu crescimento após uma hora. Estes resultados permitem concluir que *phoU* pertence ao regulon PHO de *C. violaceum*.

Figura 4.24. A) Crescimento de *C. violaceum* portando a fusão transcricional *PphoU-lacZ* em meio A sem suplemento de Pi. B) Concentração de Pi restante no meio de cultura C) Atividade da fusão do promotor de *phoU* com o gene *lacZ* D) Atividade enzimática da fosfatase alcalina das cepas de *C. violaceum* portando as fusões transcacionais *PphoU-lacZ* ao longo do tempo. Os pontos mostrados são a média de três experimentos independentes e a barra de erros indica o desvio padrão entre estes experimentos.

4.4.3 Transcrição de *pstB-pitA*.

No genoma de *C. violaceum*, está anotado o gene *pitA*, que codifica um transportador de Pi de baixa afinidade, apenas 200 pb a jusante do gene *pstB*, na mesma orientação. Há diversos organismos (bactérias do grupo das ϵ , β , γ –proteobactérias, além de actinobactérias) que apresentam esta organização gênica em que *pitA* está de alguma forma associado ao operon *pst*.

Para testar se *pitA* forma um operon com o operon *pst*, um ensaio de RT-PCR foi conduzido. RNA foi extraído de bactérias crescidas em meio A não suplementado com Pi. A entrada na fase de carência de Pi foi monitorada por ensaios de F.A. (não mostrado). Uma banda de 665 pb indicaria a presença de um transcrito *pstB-pitA*. A figura 3.25 mostra o gene *pitA* é transcrito juntamente com *pstB* e que consequentemente faz parte do operon *pst*.

Figura 4.25. RT-PCR de *pstB-pitA*. RT) cDNA sintetizado a partir de RNA de *C. violaceum* extraído em situação de carência de Pi. C) Controle de RNA sem adição da enzima transcriptase reversa. A banda esperada, de 655 pares de bases, está indicada pela seta.

4.5 Resistência de *C. violaceum* a estresses ambientais

C. violaceum é uma bactéria de vida livre e, como tal, está exposta a estresses ambientais como variação de osmolaridade, temperatura e ação de radicais livres. Investigar a resistência das bactérias a estresses ambientais dá indícios das estratégias selecionadas por estes organismos para lidar com o ambiente que os cerca.

4.5.1 Alta osmolaridade

Para testar se *C. violaceum* apresenta resistência a alta osmolaridade, foi feito um ensaio de sobrevivência desta bactéria com diferentes concentrações de NaCl em diferentes tempos. No primeiro ensaio, 2×10^3 bactérias foram incubadas em soluções contendo 1, 2, 3, 4 ou 5 M NaCl, que são concentrações salinas padrão para ensaios de resistência a estresse osmótico em *E. coli* em nosso laboratório, e plaqueadas após quatro horas. Como a sobrevivência observada foi muito baixa, foi realizado outro ensaio, com concentrações menores (0,5, 1, 1,5 e 2 M NaCl) e por menos tempo (duas horas). Porém, neste ensaio também foi observada alta mortalidade (Não mostrado). Finalmente, as bactérias foram inoculadas em 1 M NaCl e sua capacidade de sobreviver a tal osmolaridade foi avaliada ao longo de duas horas (figura 3.26)

Figura 4.26. Sobrevivência de *C. violaceum* selvagem alta osmolaridade. 2000 bactérias foram inoculadas em salina 1 M e amostras foram retiradas ao longo do tempo. O controle (0) foi feito plaqueando a amostra imediatamente antes da exposição desta à alta osmolaridade.

Os dados sugerem que *C. violaceum* pode estar adaptada apenas a ambientes com baixa osmolaridade, não possuindo mecanismos de defesa contra ambientes hiperosmóticos, o que condiz com o ambiente fluvial em que vive.

4.5.2 Frio (4 °C)

Apesar de *C. violaceum* ser encontrada em ambientes tropicais, é esperado que esta bactéria seja capaz de sobreviver a variações bruscas de temperatura.

Para testar esta hipótese, 2×10^2 células foram plaqueadas em LB-ágar e incubadas a 4°C. As placas foram transferidas a cada 12 horas para 37°C e incubadas por 36 h. As UFC resultantes foram contadas no dia seguinte. A figura 3.27 mostra que *C. violaceum* não resiste a baixas temperaturas por períodos longos de tempo.

Figura 4.27. Sobrevivência de *C. violaceum* selvagem (WT) a incubação a 4°C ao longo do tempo. Após a exposição ao frio, as bactérias foram incubadas a 37°C e as UFC resultantes contadas no dia seguinte. Valores relativos à amostra controle, que não foi exposta ao frio. Os pontos mostram a média de três ensaios; e as barras, o desvio entre eles.

4.5.3 Estresse oxidativo.

Como qualquer organismo aeróbico, *C. violaceum* gera e está sujeita à ação de espécies reativas de oxigênio, fontes de estresse oxidativo, fazendo-se necessários mecanismos para neutralizá-las. Para testar a resistência ao stress oxidativo, as bactérias foram crescidas aerobicamente durante a noite em meio LB. No dia seguinte, elas foram diluídas em solução salina na concentração final de 2×10^3 UFC/mL e incubadas com 6 mM H_2O_2 – por no máximo 20 minutos. A sobrevivência das bactérias foi então medida ao longo do tempo, tendo sido verificada uma alta taxa de mortalidade nestas condições (figura 3.28). Isto sugere que *C. violaceum* não possui mecanismos eficientes para neutralizar o peróxido de hidrogênio.

Figura 4.28. Sobrevivência de *C. violaceum* a estresse oxidativo (6 mM H_2O_2) ao longo do tempo. Após a exposição ao peróxido de hidrogênio, as bactérias foram plaqueadas e incubadas a 37°C. As UFC resultantes contadas no dia seguinte. Os pontos representam a média de dois ensaios e as barras, o desvio entre eles.

5 DISCUSSÃO

5.1 Indução do regulon PHO

Fosfato é um nutriente essencial para qualquer ser vivo e bactérias precisam ser capazes de sentir sua concentração e captá-lo ativamente caso esta concentração for baixa. A evolução selecionou estratégias distintas para lidar com a flutuação na disponibilidade de fosfato. *C. violaceum* foi cultivada com várias concentrações deste nutriente em vários meios.

Os resultados mostraram que *C. violaceum* requer menos Pi para manter seu crescimento em meio sólido, uma vez que esta bactéria foi capaz de crescer com 0,01 mM Pi tão bem quanto em concentrações mais altas deste nutriente, enquanto que *E. coli*, a bactéria controle, não obteve o mesmo rendimento. Em meio líquido, *C. violaceum* apresentou taxas de crescimento similares quando cultivada com 0,1 mM de Pi ou com concentrações mais elevadas deste nutriente. É interessante notar que esta bactéria não cresce na presença de TRIS, indicando algum papel tóxico deste composto; logo, foi preciso adaptar um outro meio, tamponado com MOPS, sem adição de TRIS, para a realização dos ensaios.

Ao contrário do que acontece em *E. coli*, *C. violaceum* continua apresentando taxas de crescimento similares às apresentadas em situação de abundância de Pi quando entra em carência deste nutriente, medida pela atividade de F.A.. Há uma diminuição do seu ritmo de crescimento, sim, mas não há uma parada, acompanhando o ritmo da cultura não carente.

Uma possível explicação para este resultado é o acúmulo de Pi na forma de polifosfato intracelular (PoliP). *C. violaceum* possui em seu genoma genes anotados como *ppk*, que codifica para a proteína polifosfato kinase e *ppx*, que codifica para uma exopolifosfatase. Esta bactéria pode utilizar suas reservas de PoliP para manter seu crescimento mesmo quando a concentração de Pi no meio é baixa.

O gene *ppx* está a 150 pb a jusante de *phoU*. É possível que estes genes formem um operon, com *ppx* respondendo à carência de Pi e desfosforilando PoliP a fim de suprir a célula. Esta organização gênica não é exclusiva a *C. violaceum*, sendo observada também em outras bactérias do grupo das β -proteobactérias quando analisada no programa STRING (FRANCESCHINI et al., 2013).

Foram feitas tentativas de medição de PoliP em *C. violaceum*, porém os resultados foram inconclusivos pois a técnica disponível consistia em corar as células com DAPI e medir sua fluorescência, que seria decorrente da ligação do corante com PoliP. Como o pico de emissão do DAPI é 550 nm, uma hipótese levantada foi a de que a violaceína, cujo pico de absorção é em 585 nm, interferiu na medição da emissão do corante (ASCHAR-SOBBI et al., 2008).

Experimentos com o promotor do gene anotado como codificador da proteína PhoB, o ativador transcricional do regulon PHO, mostram que a expressão deste gene aumenta quando as concentrações de Pi caíram para baixo de 0,01 mM, confirmando que phoB faz parte do regulon PHO. A região promotora de *phoB* possui uma sequência PHO-box putativa.

5.2 Das fosfatases alcalinas

Fosfatase alcalina é uma enzima amplamente distribuída na natureza, sendo encontrada tanto em bactérias quanto em mamíferos. No genoma de *C. violaceum*, estão anotadas duas sequências de genes codificadores de fosfatase alcalina, chamadas de *phoA*₁ e *phoA*₂. Buscas no banco de dados do NCBI revelam que outras bactérias também possuem este gene duplicado, com organização que sugere a formação de um operon (DE BACKER et al., 2002).

A análise da árvore filogenética montada com as sequências de PhoA₁ e PhoA₂ de diversas bactérias mostrou que estas proteínas se agrupam em dois conjuntos distintos. Também foi verificado que ECAP é suficientemente diferente para não se agrupar com nenhuma das sequências duplicadas, sendo grupo externo na árvore filogenética montada com as mesmas, sugerindo um evento de duplicação gênica antigo, provavelmente na linhagem das *Burkholderiales*, e com possível efeito na atividade das proteínas resultantes. Esta enzima tem geralmente em sua forma nativa a conformação de um homodímero, sendo que formas alternativas são fruto de mutações construídas, não ocorrendo no tipo selvagem. Não há relatos de enzimas PhoA monoméricas ou heterodiméricas ocorrendo naturalmente em bactérias na literatura. Há, no entanto, uma outra família de fosfatases alcalinas, PhoX, que são monoméricas. Porém, esta não guarda similaridade com a família PhoA (BOULANGER; KANTROWITZ, 2003; HEHIR; MURPHY; KANTROWITZ, 2000; ZAHEER et al., 2009).

Há, em *E. coli*, um gene a jusante de *phoA*, *psiF*, que, apesar de não formar operon com *phoA*, também responde à carência de Pi. Buscas no banco de dados do NCBI e no Pfam não retornaram nenhuma estrutura conservada para o gene *cv1512*, que está anotado para uma proteína hipotética e que aparece em outras bactérias que possuem esta duplicação no gene *phoA*, como analisado pela ferramenta SMART protein. A modelagem das estruturas secundárias de CV1512 usando o pacote PHYRE2 também não retornaram resultados confiáveis. Os únicos dados sobre este gene vêm de análises de bioinformática, que indicam a presença de um sítio de ligação ao ribossomo na posição -11 e um peptídeo sinal em sua sequência de aminoácidos, indicando que esta proteína é periplasmática ou exportada (KELLEY; STERNBERG, 2009; LETUNIC; DOERKS; BORK, 2012; WANNER; WIEDER; MCSHARRY, 1981).

O gene *cv1515*, por sua vez, não aparece na vizinhança de outras bactérias portadoras da duplicação em *phoA*. Buscas no banco de dados também não retornaram resultados confiáveis para a estrutura desta proteína hipotética.

Kim e colaboradores afirmam que PhoA de *E. coli* possui sítios de ligação a dois íons de zinco e um de magnésio, além de reportar que o resíduo de aminoácido responsável pelo ataque nucleofílico ao fosfato a ser hidrolizado é uma serina na posição 102 (KIM; WYCKOFF, 1991). Quando confrontadas com a sequência de aminoácidos de PhoA de *E. coli*, as sequências de *C. violaceum* apresentam os resíduos de aminoácidos canônicos para estes sítios específicos conservados, dando indícios de que ambas as proteínas de *C. violaceum* poderiam ser funcionais, formando um heterodímero, dois monômeros ou dois homodímeros.

No experimento para obter cepas constitutivas para a expressão do regulon PHO realizado neste trabalho, foi verificada que pelo menos uma parte da atividade de fosfatase alcalina ocorre extracelularmente, observação confirmada com a medição desta atividade no sobrenadante.

Há relatos de F.A. extracelulares em cepas de *Bacillus* e em *Streptomyces*, porém estas enzimas pertencem à família de fosfatases alcalinas / fosfodiesterases PhoD, e não à família PhoA. Também foi relatada a presença de PhoA extracelular em estudos de metagenoma marinho. Porém, como a maior parte dos organismos de habitats marinhos não é cultivável, o estudo destas proteínas em seus sistemas nativos se torna uma tarefa complicada (EDER et al., 1996; LUO et al., 2009; MOURA et al., 2001).

Uma análise das regiões regulatórias no promotor do gene *phoA*₁, mostrou uma PHO-box predita na posição -1 a partir do códon de iniciação anotado. Esta PHO-box estaria muito próxima ao sítio de início de tradução para ter algum efeito fisiológico.

PhoA₁ tem uma metionina anotada na posição 25. Se o início de tradução for a partir da Met25, o PHO-box ocuparia a posição -76 em relação ao início da ORF, compatível com a posição de uma região regulatória de transcrição. Há, na sequência de DNA a montante de Met25, uma possível sequência RBS na posição -8, indicando que pode ter havido um engano quando da anotação deste gene e que o real códon de iniciação de PhoA₁ é aquele que traduz para Met25. Este tipo de erro é bastante comum, pois o sistema de anotação utilizado neste genoma foi automatizado e dificilmente há curadoria para todos os genes anotados.

A fosfatase alcalina tem seu pico de atividade em pH's na faixa de 9, em *E. coli* a 11, em *B. subtilis*. Neste trabalho, foi verificado que o pico de atividade enzimática da F.A. se dá em torno do pH 11. Experimentos realizados com *C. violaceum* não carente não mostram atividade neste pH, creditando então à enzima a degradação do substrato e não à autólise devido ao alto pH do tampão. Entretanto, é preciso frisar que os testes de determinação do pH ótimo foram realizados com extratos celulares ou com células inteiras, e não com a enzima purificada (KOKSHAROV et al., 2013).

Mais interessante ainda é notar que o tanto o mutante *phoA*₁ como o mutante *phoA*₂ apresentaram baixíssima atividade enzimática em todos pH's alcalinos testados (não mostrado), levando a crer que *C. violaceum* precisaria de ambos os produtos gênicos para compor a enzima funcional.

Com intuito de verificar se há interação entre PhoA₁ e PhoA₂, formando assim uma fosfatase alcalina heterodimérica foram feitos ensaios de *far western* e *pull down*. Foi também realizado um ensaio de gel filtração analítica para determinar se PhoA₁ forma um homodímero, além de ensaios da atividade enzimática de cada proteína em separado, *in vitro*.

O ensaio de *far western* não acusou interação entre as duas proteínas. Este resultado pode ser explicado pelo fato de uma das proteínas testadas estar associada a uma membrana na forma desnaturada. É possível que, a interface responsável pela dimerização em PhoA₂ estivesse desestruturada, dando um resultado negativo.

Os ensaios de *pull down* não mostraram diferenças significativas entre as bandas da cepa selvagem quando comparadas com suas derivadas mutantes, mas estes resultados, inconclusivos, podem ser atribuídos à própria técnica, em que foi usado o extrato celular de *C. violaceum* ao invés de PhoA₂ purificada, pois não foi possível obter quantidades suficientes de PhoA₂ purificada que viabilizasse a realização do experimento.

Interessantemente, PhoA₁ se apresentou como monômero em experimentos de gel filtração analítica. Esta organização para uma proteína da família PhoA é incomum, pois é sabido que a ECAP e outras PhoA's estudadas forma um dímero (DE BACKER et al., 2002; ROTHMAN; BYRNE, 1963).

Infelizmente, não foi possível realizar este ensaio com PhoA₂, devido aos problemas de purificação com esta proteína.

5.3 *phoU* não participa da repressão do regulon PHO de *C. violaceum*

Em *E. coli*, o operon *pst*, formado pelos genes *pstS*, *pstC*, *pstA* e *pstB*, forma um transportador de Pi de alta afinidade, ativo principalmente quando este nutriente está em baixas concentrações no meio. Há, ainda, um quinto gene, *phoU*, que não faz parte do transportador, porém atua como repressor do regulon PHO (HSIEH; WANNER, 2010; WANNER, 1993).

O gene *phoU*, em *C. violaceum*, não faz parte do operon *pst*, estando a aproximadamente 300 kb de distância do mesmo. A análise de seu promotor revelou a presença de uma PHO-box putativa e ensaios com a fusão transcricional *phoU-lacZ* confirmaram sua ativação em situação de carência de Pi, concomitante à detecção da atividade de F.A. e à baixa concentração de Pi no meio de cultura, confirmando o papel deste gene como integrante do regulon PHO de *C. violaceum*.

A fim de se conhecer a fisiologia de *phoU* na resposta à carência de Pi nesta bactéria, foi construída uma cepa *knockout* deste gene e testada a atividade de F.A. Era esperado que o mutante *phoU* apresentasse uma atividade constitutiva de F.A., ou seja, alta atividade desta enzima mesmo em situação de suficiência de Pi, tal como acontece com o mutante *phoU* de *E. coli*. Este comportamento, porém, não foi verificado, tendo a cepa mutante apresentado o mesmo nível de F.A. da cepa selvagem, induzindo sua expressão apenas em situação de carência de Pi (STEED; WANNER, 1993).

Foi reportado que o mutante $\Delta phoU$ de *E. coli* apresentou dificuldade em crescer em meio definido e acumulou mutações secundárias em *pstSCAB* ou *phoBR* que suprimem o efeito deletério sobre o crescimento. A deleção de *phoU* teria um efeito tóxico devido ao acúmulo de Pi, sob a forma de polifosfato, no interior da bactéria. Se *phoU* tivesse o mesmo comportamento em *C. violaceum*, seria esperado que a construção de um mutante *phoU* estável não fosse uma tarefa fácil, porém, este efeito não foi observado no mutante *phoU* de *C. violaceum* (RICE et al., 2009; STEED; WANNER, 1993).

5.4 Pst é o principal transportador de Pi em situação de carência de Pi, porém não é repressor de PHO

Pst é um sistema de transporte do tipo ABC que tem alta afinidade por Pi. Mutantes neste sistema exibem uma deficiência na captação de Pi em carência do mesmo, além de ter o regulon PHO ativo constitutivamente (LAMARCHE et al., 2008a).

A interrupção do gene *pstS* de *C. violaceum* inibiu a captação de Pi em bactérias carentes de Pi, medida ao longo de 20 minutos.

Assim como o mutante *phoU*, o mutante *pstS* também não é constitutivo para a F.A., apresentando baixa atividade de F.A. em excesso de Pi, fenotipicamente igual à cepa selvagem, o que não era esperado.

Em *E. coli*, organismo que teve seu transportador mais estudado, mutantes que perdem a capacidade de transporte de Pi podem não perder a capacidade de inibição de PHO, levando a crer que a repressão de PHO não se deve ao transporte de Pi em si, mas sim à integridade do sistema Pst. Como o método de mutagenização empregado utiliza a inserção de um plasmídeo suicida no gene alvo, o transportador está, obviamente, não íntegro. Este sistema difere, então, daquele descrito para *E. coli* e *P. mirabilis*, sendo similar, neste aspecto, ao sistema Pst de *B. subtilis*, que não também possui efeito repressor no regulon PHO desta bactéria (ECHOLS et al., 1961; HSIEH; WANNER, 2010; JACOBSEN et al., 2008; QI; KOBAYASHI; HULETT, 1997)

5.5 *pitA* de *C. violaceum* responde à carência de Pi

À jusante do gene *pstB* de *C. violaceum*, encontra-se um gene anotado como *pitA*, que codifica um transportador de fosfato de baixa afinidade, exibindo 54% de identidade de amino ácidos com a proteína homóloga de *E. coli*.

Ensaaios de RT-PCR mostraram que este gene é transcrito em conjunto com *pstB* em situação de carência de Pi. Em *E. coli*, *Pseudomonas* sp e outras bactérias pesquisadas, o gene *pitA* se apresenta como uma unidade transcricional monocistrônica, porém em *C. violaceum* e em outra bactéria da família Neisseriaceae, *Pseudogulbenkiania* sp., ele está localizado logo após *pstB*, indicando que este gene pode estar sob controle de PHO.

Nos quase 200 pb que separam *pstB* de *pitA*, foram encontradas possíveis sequências promotoras -10 e -35, porém não foram encontrados indícios de PHO-boxes, indicando que *pitA* pode ser transcrito constitutivamente ou até mesmo responder a outros estímulos, não só a carência de Pi.

Dados mais recentes indicam que a função primordial de *pitA* em *E. coli* seria o transporte de íons divalentes complexados com fosfato. Desta maneira, o sistema Pst seria o principal sistema de transporte de Pi, mesmo quando em suficiência deste nutriente (BEARD et al., 2000; HSIEH; WANNER, 2010).

É interessante pensar que em *C. violaceum*, o papel principal de PitA estaria atrelado a captação de Pi, uma vez que diferentemente de *E. coli*, *pitA* é induzido em condição de carência deste nutriente, fato este condizente com o ambiente oligotrófico em que a bactéria se encontra.

5.6 *C. violaceum* é pouco resistente a estresses ambientais.

Esta bactéria demonstra possuir baixa resistência aos estresses osmótico, frio e oxidativo. De fato, quando exposta a 4°C por 24 horas, cinco minutos a H₂O₂ e 60 minutos a NaCl 1M, *C. violaceum* selvagem apresenta taxa de mortalidade maior que 60%.

A cepa padrão, ATCC 12472, utilizada neste trabalho, parece ser incapaz de crescer em temperaturas abaixo de 15°C, como demonstraram Dall'Agnol e Hungria, apesar de algumas cepas isoladas do ambiente apresentarem crescimento nestas condições (DALL'AGNOL et al., 2008; HUNGRIA et al., 2005).

Foram anotadas pelo menos nove proteínas ligadas diretamente à resposta ao estresse pelo frio em *E. coli*: a família de proteínas *csp*. Pesquisas *in silico* no cromossomo de *C. violaceum* apontam a ausência das três principais proteínas necessárias à resposta ao frio: CspA, CspB e CspC, o que poderia explicar a grande sensibilidade desta bactéria a baixas temperaturas (COHEN-OR et al., 2010; GIULIODORI et al., 2007a; PHADTARE, 2004; SHENHAR; BIRAN; RON, 2012).

De fato, sendo *C. violaceum* uma bactéria adaptada a ambientes tropicais e subtropicais, uma resposta ao estresse frio seria pouco utilizada, indicando que estes genes podem ter sido perdidos ao longo da evolução da mesma.

C. violaceum também não apresentou grande resistência à alta osmolaridade. Estes resultados contradizem a predição de grande osmorresistência de *C. violaceum* com base no sequenciamento de seu genoma. Foram anotados genes que codificam proteínas responsáveis pela resposta ao estresse osmótico no genoma de *C. violaceum*, como a lipoproteína OsmB; transportadores de íons K⁺ de alta e baixa afinidade, canal de transporte de K⁺; a porina OmpC e os reguladores EnvZ e OmpR também foram anotados. Porém, o gene *osmC* não foi encontrado. A ausência deste gene pode estar relacionada à alta taxa de mortalidade de *C. violaceum* quando exposta a altas concentrações de sal (HUNGRIA et al., 2004).

Em microrganismos aeróbios, a proteção contra o estresse oxidativo é crucial, pois espécies reativas de oxigênio são produtos colaterais deste tipo de metabolismo. *C. violaceum* apresentou alguma resistência ao estresse oxidativo. No genoma de *C. violaceum*, foram encontrados os genes cujos produtos estão relacionados à proteção desta bactéria contra o estresse oxidativo, como o regulador transcricional SoxR; o fator de transcrição OxyR, que é ativado na presença de peróxido de hidrogênio e a proteína ligante de DNA em situação de estresse oxidativo Dps, e o sistema de detoxicação de hidroperóxidos orgânicos, OhrRA, sendo estes funcionais e a principal via de proteção de *C. violaceum* contra hidroperóxidos orgânicos. Porém, não foram encontrados no genoma desta bactéria os genes *soxS*, *micF*, *inaA* e *sodA*, cuja falta possivelmente causaria a baixa resistência desta bactéria ao estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio (DA SILVA NETO; NEGRETTO; NETTO, 2012).

6 CONCLUSÃO

Com este trabalho, conclui-se que *C. violaceum* exibe um comportamento peculiar quando cultivada em concentrações limitantes de Pi, pois seu crescimento não é fortemente afetado pela carência deste nutriente, apesar de ativar as respostas de carência a Pi.

É interessante notar a organização incomum do contexto gênico de *phoA*₁ e *phoA*₂, que fornece indícios de que a proteína F.A. desta bactéria forme um heterodímero, diferentemente de outros modelos estudados, requerendo mais estudos para confirmar esta hipótese.

Outra particularidade é o gene *phoU*, que em outras bactérias integra o operon *pst*, porém em *C. violaceum* está em outro contexto gênico e não é repressor de PHO. Sugere-se que o papel de *phoU* tenha relação ao metabolismo de polifosfato.

O sistema de transporte Pst não possui papel regulatório em *C. violaceum*, sendo apenas um transportador de Pi em situação de carência do mesmo.

Surpreendentemente, *C. violaceum* não é uma bactéria resistente a estresses ambientais, como haveria de se supor tendo em vista o habitat em que vive.

REFERÊNCIAS¹

- AGUENA, M.; SPIRA, B. RT-PCR of long prokaryotic operon transcripts without DNase treatment. **Journal of Microbiological Methods**, v. 55, n. 2, p. 419–423, 2003.
- AKIYAMA, M.; CROOKE, E.; KORNBERG, A. An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its ppx gene in a polyphosphate operon. **J. Biol. Chem.**, v. 268, n. 1, p. 633–639, 1993.
- ALEXEYEV, M. F. The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of gram-negative bacteria. **BioTechniques**, v. 26, n. 5, p. 824–826, 1999.
- ANDRIGHETTI-FRÖHNER, C. R. et al. Cytotoxicity and potential antiviral evaluation of violacein produced by *Chromobacterium violaceum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 6, p. 843–848, 2003.
- ASCHAR-SOBBI, R. et al. High sensitivity, quantitative measurements of polyphosphate using a new DAPI-based approach. **Journal of Fluorescence**, v. 18, n. 5, p. 859–866, 2008.
- BAEK, J. H.; KANG, Y. J.; LEE, S. Y. Transcript and protein level analyses of the interactions among PhoB, PhoR, PhoU and CreC in response to phosphate starvation in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 277, n. 2, p. 254–259, 2007.
- BEARD, S. J. et al. Evidence for the transport of zinc(II) ions via the pit inorganic phosphate transport system in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 184, n. 2, p. 231–235, 2000.
- BOULANGER, R. R.; KANTROWITZ, E. R. Characterization of a monomeric *Escherichia coli* alkaline phosphatase formed upon a single amino acid substitution. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 26, p. 23497–23501, 2003.
- CAMPBELL, J. I. et al. A successful antimicrobial regime for *Chromobacterium violaceum* induced bacteremia. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 4, 2013.
- CARMANY, D. O.; HOLLINGSWORTH, K.; MCCLEARY, W. R. Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 3, p. 1112–1115, 2003.
- CHANG, C. Y. et al. *Chromobacterium violaceum* infection in Taiwan: a case report and literature review. **J Microbiol Immunol Infect** v. 40, n. 3, p. 272–275, 2007.
- CHEN, P. S.; TORIBARA, T. Y.; WARNER, H. Microdetermination of Phosphorus. **Analytical Chemistry**, v. 28, n. 11, p. 1756–1758, 1956.
- CHENG, C. et al. Contribution of the *pst-phoU* operon to cell adherence by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and virulence of *Citrobacter rodentium*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 5, p. 1936–1944, 2009.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156–159, 1987.
- COHEN-OR, I. et al. CspC regulates *rpoS* transcript levels and complements *hfq* deletions. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 8, p. 694–700, 2010.
- COLEMAN, J. E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. **Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure**, v. 21, p. 441–483, 1992.

¹ De acordo com:

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

- COWAN, S. W. et al. Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. **Nature**, v. 358, n. 6389, p. 727–733, 1992.
- DA SILVA NETO, J. F.; NEGRETTO, C. C.; NETTO, L. E. S. Analysis of the organic hydroperoxide response of *Chromobacterium violaceum* reveals that OhrR is a cys-based redox sensor regulated by thioredoxin. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e47090, 2012.
- DALL'AGNOL, L. T. et al. Diversity of *Chromobacterium violaceum* isolates from aquatic environments of state of Pará, Brazilian Amazon. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 7, p. 678–682, 2008.
- DE BACKER, M. et al. The 1.9Å Crystal Structure of Heat-labile Shrimp Alkaline Phosphatase. **Journal of Molecular Biology**, v. 318, n. 5, p. 1265–1274, 2002.
- DUPR, B.; ALLBGRE, C. J.; NGREL, P. CHEMICAL Chemical and physical denudation in the Amazon River Basin. v. 2541, n. 97, 1997.
- DURÁN, N.; MENCK, C. F. *Chromobacterium violaceum*: a review of pharmacological and industrial perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 201–222, 2001.
- ECHOLS, H. et al. Genetic control of repression of alkaline phosphatase in *E. coli*. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, n. 4, p. 425–438, 1961.
- EDER, S. et al. A *Bacillus subtilis* secreted phosphodiesterase/alkaline phosphatase is the product of a Pho regulon gene, *phoD*. **Microbiology**, v. 142, n. 1, pt. 8, p. 2041–2047, 1996.
- EDER, S.; LIU, W.; HULETT, F. M. Mutational analysis of the *phoD* promoter in *Bacillus subtilis*: implications for PhoP binding and promoter activation of Pho regulon promoters. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 7, p. 2017–25, 1999.
- FAN, D. P. et al. Isolation and characterization of complementation products of *Escherichia coli* alkaline phosphatase. **Journal of Molecular Biology**, v. 15, n. 1, p. 32–48, 1966.
- FANTINATTI-GARBOGGINI, F. et al. Drug resistance in *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 1, p. 134–147, 2004.
- FERREIRA, G. M.; SPIRA, B. The *pst* operon of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances bacterial adherence to epithelial cells. **Microbiology**, v. 154, pt. 7, p. 2025–2036, 2008.
- FRANCESCHINI, A. et al. STRING v9.1: protein-protein interaction networks, with increased coverage and integration. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. Database issue, p. D808–815, 2013.
- FURCH, K. **The Amazon**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1984. v. 56
- GIULIODORI, A. M. et al. Cold-stress-induced de novo expression of *infC* and role of IF3 in cold-shock translational bias. **RNA**, v. 13, n. 8, p. 1355–1365, 2007a.
- GIULIODORI, A. M. et al. Review on bacterial stress topics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1113, p. 95–104, 2007b.
- GOBER, J. W.; SHAPIRO, L. A developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3' enhancer and IHF binding elements. **Molecular Biology of the Cell**, v. 3, n. 8, p. 913–26, 1992.
- GOMEZ, P. F.; INGRAM, L. O. Cloning, sequencing and characterization of the alkaline phosphatase gene (*phoD*) from *Zymomonas mobilis*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 125, n. 2-3, p. 237–45, 1995.
- HASELKORN, R. et al. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 20, p. 11660–5, 2003.

- HEHIR, M. J.; MURPHY, J. E.; KANTROWITZ, E. R. Characterization of heterodimeric alkaline phosphatases from *Escherichia coli*: an investigation of intragenic complementation. **Journal of Molecular Biology**, v. 304, n. 4, p. 645–656, 2000.
- HIRATSU, K. et al. Autophosphorylation and activation of transcriptional activator PhoB of *Escherichia coli* by acetyl phosphate in vitro. **Gene**, v. 161, n. 1, p. 7–10, 1995.
- HIROTA, R. et al. Stable polyphosphate accumulation by a pseudo-revertant of an *Escherichia coli* *phoU* mutant. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 5, p. 695–701, 2013.
- HSIEH, Y.-J.; WANNER, B. L. Global regulation by the seven-component Pi signaling system. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 2, p. 198–203, 2010.
- HUNGRIA, M. et al. Tolerance to stress and environmental adaptability of *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and molecular research**, v. 3, n. 1, p. 102–116, 2004.
- HUNGRIA, M. et al. Genetic characterization of *Chromobacterium* isolates from black water environments in the Brazilian Amazon. **Letters in Applied Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 17–23, 2005.
- JACOBSEN, S. M. et al. The high-affinity phosphate transporter Pst is a virulence factor for *Proteus mirabilis* during complicated urinary tract infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 180–93, 2008.
- KATHURIA, S.; MARTINY, A. C. Prevalence of a calcium-based alkaline phosphatase associated with the marine cyanobacterium *Prochlorococcus* and other ocean bacteria. **Environmental microbiology**, v. 13, n. 1, p. 74–83, 2011.
- KELLEY, L. A.; STERNBERG, M. J. E. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 363–371, 2009.
- KIM, E. E.; WYCKOFF, H. W. Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. **Journal of Molecular Biology**, v. 218, n. 2, p. 449–464, 1991.
- KOCAN, M. et al. Two-component systems of *Corynebacterium glutamicum*: deletion analysis and involvement of the PhoS-PhoR system in the phosphate starvation response. **Journal of bacteriology**, v. 188, n. 2, p. 724–732, 2006.
- KODACH, L. L. et al. Violacein synergistically increases 5-fluorouracil cytotoxicity, induces apoptosis and inhibits Akt-mediated signal transduction in human colorectal cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 27, n. 3, p. 508–516, 2006.
- KONZEN, M. et al. Antioxidant properties of violacein: possible relation on its biological function. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 24, p. 8307–8313, 2006.
- KORNBERG, A.; RAO, N. N.; AULT-RICHÉ, D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. **Annual Review of Biochemistry**, v. 68, p. 89–125, 1999.
- KORTELAND, J.; DE GRAAFF, P.; LUGTENBERG, B. PhoE protein pores in the outer membrane of *Escherichia coli* K-12 not only have a preference for Pi and Pi-containing solutes but are general anion-preferring channels. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 778, n. 2, p. 311–316, 1984.
- LAMARCHE, M. G. et al. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 32, n. 3, p. 461–473, 2008a.
- LAMARCHE, M. G. et al. Modulation of hexa-acyl pyrophosphate lipid A population under *Escherichia coli* phosphate (Pho) regulon activation. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 15, p. 5256–5264, 2008b.

LEON, L. L. et al. Antileishmanial activity of the violacein extracted from *Chromobacterium violaceum*. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 449–450, 2001.

LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART 7: recent updates to the protein domain annotation resource. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. Database issue, p. D302–305, 2012.

LEVINTHAL, C.; SIGNER, E. R.; FETHEROLF, K. Reactivation and hybridization of reduced alkaline phosphatase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 48, p. 1230–1237, 1962.

LUO, H. et al. Subcellular localization of marine bacterial alkaline phosphatases. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 50, p. 21219–21223, 2009.

MAJUMDAR, A.; GHATAK, A.; GHOSH, R. K. Identification of the gene for the monomeric alkaline phosphatase of *Vibrio cholerae* serogroup O1 strain. **Gene**, v. 344, p. 251–258, 2005.

MAKINO, K. et al. Role of the sigma 70 subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*. **Genes & Development**, v. 7, n. 1, p. 149–160, 1993.

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

MCCLEAN, K. H. et al. Quorum sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. **Microbiology**, v. 143, n. 1, pt. 1, p. 3703–3711, 1997.

MIKI, T. et al. *Chromobacterium* pathogenicity island 1 type III secretion system is a major virulence determinant for *Chromobacterium violaceum*-induced cell death in hepatocytes. **Molecular Microbiology**, v. 77, p. 1–18, 2010.

MOROHOSHI, T. et al. Accumulation of inorganic polyphosphate in *phoU* mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. strain PCC6803. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 8, p. 4107–4110, 2002.

MOROHOSHI, T. et al. N-acylhomoserine lactone regulates violacein production in *Chromobacterium violaceum* type strain ATCC 12472. **FEMS Microbiology Letters**, v. 279, n. 1, p. 124–30, 2008.

MOROHOSHI, T. et al. Regulation of the Violacein Biosynthetic Gene Cluster by Acylhomoserine Lactone-Mediated Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 74, n. 10, p. 2116–2119, 2010.

MOURA, R. S. et al. Substrate analysis and molecular cloning of the extracellular alkaline phosphatase of *Streptomyces griseus*. **Microbiology**, v. 147, pt. 6, p. 1525–1533, 2001.

NEIDHARDT, F. C.; BLOCH, P. L.; SMITH, D. F. Culture medium for enterobacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 119, n. 3, p. 736–747, 1974.

NILGIRIWALA, K. S. et al. Cloning and overexpression of alkaline phosphatase PhoK from *Sphingomonas* sp. strain BSAR-1 for bioprecipitation of uranium from alkaline solutions. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 17, p. 5516–5523, 2008.

PHADTARE, S. Recent developments in bacterial cold-shock response. **Current Issues in Molecular Biology**, v. 6, n. 2, p. 125–136, 2004.

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

- QI, Y.; KOBAYASHI, Y.; HULETT, F. M. The *pst* operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate-regulated promoter and is involved in phosphate transport but not in regulation of the PHO regulon. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 8, p. 2534–2359, 1997.
- RAO, N. N.; TORRIANI, A. Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 1083–1090, 1990.
- RICE, C. D. et al. Employment of a promoter-swapping technique shows that PhoU modulates the activity of the PstSCAB2 ABC transporter in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 3, p. 573–582, 2009.
- RICE, P.; LONGDEN, I.; BLEASBY, A. EMBOS: the European Molecular Biology Open Software Suite. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 6, p. 276–277, 2000.
- ROSENBERG, H.; GERDES, R. G.; CHEGWIDDEN, K. Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 131, n. 2, p. 505–511, 1977.
- ROTHMAN, F.; BYRNE, R. Fingerprint analysis of alkaline phosphatase of *Escherichia coli* K12. **Journal of Molecular Biology**, v. 6, n. 4, p. 330–IN11, 1963.
- ROY, N. K.; GHOSH, R. K.; DAS, J. Monomeric alkaline phosphatase of *Vibrio cholerae*. **Journal of Bacteriology**, v. 150, n. 3, p. 1033–1039, 1982.
- SCHOLTEN, M.; TOMMASSEN, J. Topology of the PhoR protein of *Escherichia coli* and functional analysis of internal deletion mutants. **Molecular Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 269–275, 1993.
- SEBASTIAN, M.; AMMERMAN, J. W. The alkaline phosphatase PhoX is more widely distributed in marine bacteria than the classical PhoA. **The ISME Journal**, v. 3, n. 5, p. 563–572, 2009.
- SHENHAR, Y.; BIRAN, D.; RON, E. Z. Resistance to environmental stress requires the RNA chaperones CspC and CspE. **Environmental Microbiology Reports**, v. 4, n. 5, p. 532–539, 2012.
- SMIL, V. Phosphorus in the environment: natural flows and human interferences. **Annual Review of Energy and the Environment**, v. 25, n. 1, p. 53–88, 2000.
- SNEATH, P. H. et al. Fatal infection by *Chromobacterium violaceum*. **Lancet**, v. 265, n. 6780, p. 276–277, 1953.
- SOLÁ, M. et al. Three-dimensional crystal structure of the transcription factor PhoB receiver domain. **Journal of Molecular Biology**, v. 285, n. 2, p. 675–687, 1999.
- SOUZA, A. O. DE et al. In vitro activity of violacein against *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 58, n. 1, p. 59–62, 1999.
- STEED, P. M.; WANNER, B. L. Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 21, p. 6797–6809, 1993.
- SURIN, B. P.; ROSENBERG, H.; COX, G. B. Phosphate-specific transport system of *Escherichia coli*: nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships. **Journal of Bacteriology**, v. 161, n. 1, p. 189–198, 1985.
- TORRIANI, A.; ROTHMAN, F. Mutants of *Escherichia coli* constitutive for alkaline phosphatase. **Journal of Bacteriology**, v. 81, p. 835–836, 1961.
- VAN MOURIK, A. et al. Functional analysis of a *Campylobacter jejuni* alkaline phosphatase secreted via the Tat export machinery. **Microbiology**, v. 154, n. Pt 2, p. 584–592, 2008.
- VAN VEEN, H. W. et al. Translocation of Metal phosphate via the Phosphate Inorganic Transport System of *Escherichia coli*. **Biochemistry**, v. 33, n. 7, p. 1766–1770, 1994.

- VANBOGELEN, R. A. et al. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 15, p. 4344–4366, 1996.
- WANNER, B. L. Overlapping and Separate Controls on the Phosphate Regulon in *Escherichia coli* K12. **Journal of Molecular Biology** p. 283–308, 1983.
- 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.; WIEDER, S.; MCSHARRY, R. Use of bacteriophage transposon Mu d1 to determine the orientation for three *proC*-linked phosphate-starvation-inducible (*psi*) genes in *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 146, n. 1, p. 93–101, 1981.
- WILLSKY, G. R.; MALAMY, M. H. Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 144, n. 1, p. 356–365, 1980.
- WU, J.-R. et al. Cloning of the gene and characterization of the enzymatic properties of the monomeric alkaline phosphatase (PhoX) from *Pasteurella multocida* strain X-73. **FEMS Microbiology Letters**, v. 267, n. 1, p. 113–20, 2007.
- YAMADA, M. et al. Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: properties of *phoR* deletion mutants and subcellular localization of PhoR protein. **Molecular & General Genetics**, v. 220, n. 3, p. 366–372, 1990.
- YAMAMOTO, K. et al. Functional characterization in vitro of all two-component signal transduction systems from *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 2, p. 1448–1456, 2005.
- YAMANE, K.; MARUO, B. Purification and characterization of extracellular soluble and membrane-bound insoluble alkaline phosphatases possessing phosphodiesterase activities in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 134, n. 1, p. 100–107, 1978.
- YUAN, Z.-C. et al. Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 9, p. 2686–2697, 2006.
- ZAHEER, R. et al. Genetic and biochemical properties of an alkaline phosphatase PhoX family protein found in many bacteria. **Environmental Microbiology**, v. 11, n. 6, p. 1572–1587, 2009.
- ZHANG, H. et al. Specificity of SecYEG for PhoA precursors and SecA homologs on SecA protein-conducting channels. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 437, n. 2, p. 212–216, 2013.

ANEXOS

Anexo 1.

Comparação de crescimento de *C. violaceum* em meio LB, meio A suplementado com 1 mM Pi e meio MCT suplementado com 10 mM Pi

Anexo 2.

Sequência de PHO-box consenso para *E. coli* e α -proteobactérias e PHO-boxes encontradas em promotores de genes anotados como membros do regulon PHO em *C. violaceum*. Os nucleotídeos em desacordo com a sequência consenso estão grafados em caixa baixa.

Gene	Sequência
Consenso	CTGTCATAAATCTGTCAT
PphoB	aTGTCATAttagTGTCAT
PphoU	CTGTCATctgaCTGTCtT
PphoA	tcGTCATAAAatctTaAT
PpstS	CgGcgAaAcggCTGaCgT

Anexo 3

Experimentos de Dicroísmo circular com PhoA1 e PhoA2 purificadas mostrando que ambas as proteínas possuem estruturas secundárias.