

Cláudia Ramos de Carvalho Pinto

**Caracterização e aptidão de mutantes PHO
constitutivos em *Escherichia coli***

São Paulo

Janeiro 2023

Cláudia Ramos de Carvalho Pinto

**Caracterização e aptidão de mutantes PHO constitutivos em
*Escherichia coli***

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Microbiologia ICB/USP, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Universidade de São Paulo - USP
Instituto de Ciências Biomédicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Orientador: Beny Spira

São Paulo
Janeiro 2023

Resumo

Ortofosfato (Pi) é um dos macronutrientes mais abundantes na bactéria, sendo necessário para diversas funções celulares. *Escherichia coli* possui 3 sistemas de captação deste nutriente: PitA, PstSCAB-PhoU (Pst) e PhnCDE (Phn). Os dois últimos pertencem a um grupo de genes, conhecido como regulon PHO. Os genes deste regulon estão envolvidos em processos de captação e assimilação de Pi e são regulados pelo sistema de dois componentes PhoB-PhoR. Mutações em qualquer um dos genes do operon *pst* e algumas mutações específicas em *phoR* causam a expressão constitutiva dos genes do regulon PHO. Essas mutações podem ser constituídas por substituições pontuais ou por inserções/deleções de base única ou de múltiplas bases. Mutantes que não regulam a expressão dos genes do regulon PHO são conhecidos como mutantes PHO-constitutivos. Tais mutantes podem ser selecionados em meio mínimo contendo glicerol-2-fosfato (G2P) como única fonte de carbono na presença de excesso de Pi. O objetivo deste trabalho foi isolar e caracterizar genética e molecularmente mutantes PHO-constitutivos em cepas derivadas de *E. coli* K-12, e correlacionar as mutações com o nível de aptidão destes mutantes. Para isso, foram isolados 255 mutantes: 76 derivados da cepa selvagem MG1655, 40 derivados do mutante MG1655 $\Delta phnCDE$, 72 derivados do duplo mutante $\Delta phnCDE\Delta pitA$ e 67 mutantes derivados da cepa MG1655 *pitA::kan*. Desses, 107 apresentaram grandes *indels* e os demais 148 mutantes portavam substituições ou pequenos *indels*; 90 mutações foram caracterizadas por sequenciamento e 148 tiveram o locus da mutação identificado por meio de ensaios de complementação *in trans*. As mutações identificadas molecular e geneticamente ocorreram nos genes *pstS* (62%), *pstC* (9,8%), *pstA* (0,8%), *pstB* (22,3%) e *phoR* (5,1%). O nível de atividade da enzima fosfatase alcalina (FA), utilizada como repórter do nível de constitutividade do regulon PHO, foi medida em todos os mutantes. Os resultados sugerem que o nível de atividade da FA varia de acordo com o gene afetado, com o *background* genético da cepa ancestral e com o tipo de mutação.

Palavras-chave: regulon PHO; operon *pst*; mutações PHO-constitutivas; taxa de mutação; aptidão; revertentes.

Abstract

Orthophosphate (Pi) is one of the most abundant macronutrients in bacteria, being necessary for several cellular functions. *Escherichia coli* carries 3 Pi uptake systems: PitA, PstSCAB-PhoU (Pst) and PhnCDE (Phn). The last two belong to the PHO regulon. The PHO regulon genes are involved in Pi metabolism and are controlled by the two-component system PhoB-PhoR. Mutations in any gene of the *pst* operon and some mutations in *phoR* cause the constitutive expression of the PHO regulon genes. These mutations may consist of single base substitutions, or indels of one or more bases. Mutants that do not repress the expression of the PHO regulon under Pi excess are known as PHO-constitutive mutants. Such mutants can be selected in minimal medium containing glycerol-2-phosphate (G2P) as the sole carbon source in the presence of Pi sufficiency. The objective of this work was to genetically and molecularly characterize PHO-constitutive mutants derived from *E. coli* K-12 derivatives and to correlate the mutations with the fitness level of these mutants. Thus far 255 mutants were isolated: 76 derived from the wild-type MG1655 strain, 40 derived from the MG1655 $\Delta phnCDE$ mutant, 72 derived from the double mutant $\Delta phnCDE\Delta pitA$ and 67 mutants derived from the MG1655 *pitA::kan* strain. One hundred and seven mutants carry large *indels*; while the remaining 148 hold point mutations or small indels. Ninety mutants characterized by sequencing the mutations and one hundred and forty-eight had the mutation locus identified through *in trans* complementation assays. The molecularly and genetically identified mutations occurred in the genes *pstS* (62%), *pstC* (9.8%), *pstA* (0.8%), *pstB* (22.3%) and *phoR* (5.1%). The enzymatic level of the alkaline phosphatase (AP), used as a reporter of the PHO regulon expression, was measured in all mutants. The results suggest that the constitutive activity of AP is correlated to the nature of the affected gene, the genetic background of the ancestral strain and the type of mutation.

Keywords: PHO regulon; *pst* operon, PHO-constitutive mutations; mutation rate; fitness; revertants

1 Introdução

1 Ortofosfato: homeostase e transporte

1.1 Ortofosfato e o regulon PHO

Ortofosfato (Pi) é o terceiro macronutriente mais abundante da célula bacteriana, atrás apenas do carbono e nitrogênio (WANNER et al., 1996). Ele constitui moléculas que participam do metabolismo energético, ácidos nucleicos, fosfolípidios, aminoácidos, lipopolissacarídeos e algumas proteínas, através de modificações pós-traducionais (VERSHININA; ZNAMENSKAYA, 2002). Fosfonatos, organofosfatos e Pi são as fontes primárias de fósforo que a *Escherichia coli* consegue utilizar, sendo o Pi o principal dos três (WANNER et al., 1996; SANTOS-BENEIT, 2015). O Pi pode entrar na célula com a ajuda de diversos transportadores, dependendo da sua concentração no meio e, embora seja um macronutriente essencial, sua escassez é condição frequente em ambientes naturais (VERSHININA; ZNAMENSKAYA, 2002; SANTOS-BENEIT, 2015). Para sobreviver à constante competição por nutrientes e às diferentes condições no ambiente, as bactérias utilizam mecanismos que as permitem sentir e responder de diferentes formas aos estímulos ambientais (CRÉPIN et al., 2011; SANTOS-BENEIT, 2015). Um exemplo de mecanismo regulador de adaptação às variações nas condições de disponibilidade de Pi no meio é o regulon PHO (SANTOS-BENEIT, 2015).

O regulon PHO é um conjunto de algumas dezenas de genes que estão envolvidos na captação e assimilação de Pi (CRÉPIN et al., 2011). A expressão dos genes do regulon PHO é positivamente regulada pela concentração de Pi disponível no meio e está sob o controle do sistema de dois componentes, PhoB/PhoR e do sistema de transporte de Pi de alta afinidade, PstSCAB-PhoU (VUPPADA et al., 2018; SANTOS-BENEIT, 2015). Os genes do regulon PHO são ativamente transcritos quando a concentração de Pi se encontra abaixo de 4 μM . O sistema de dois componentes *phoB/R* é organizado em um operon autoregulado (VERSHININA; ZNAMENSKAYA, 2002). PhoR é a histidina quinase sensorial do sistema e é composta por quatro domínios: um domínio N-terminal de membrana; um domínio citoplasmático PAS, que funciona como receptor de sinal; um domínio DHp (do inglês, *Dimerization and Histidine Phosphorylation*), onde ocorre a fosforilação de histidina e funções de dimerização; e um domínio C-terminal catalítico, onde se liga o ATP (VUPPADA et al., 2018; GARDNER et al., 2015). PhoB é uma proteína reguladora de resposta (SANTOS-BENEIT, 2015), que possui dois domínios: o N-terminal, que é fosforilado por PhoR e o C-terminal, que se liga às sequências alvo no DNA (GARDNER et al., 2015). As sequências alvo, formadas por 18 pb, cujo consenso em *E. coli* é CTGTCATA(A/T)A(T/A)CTGTCA(C/T), são chamadas de PHO box (MAKINO et al., 1996). Elas estão localizadas na região promotora dos genes do regulon PHO a montante

da região -10. A transcrição dos genes de PHO é catalizada pela holoenzima RNA polimerase associada ao fator s^{70} (MAKINO et al., 1996). A concentração de Pi no meio é sinalizada para PhoR, que se autofosforila no resíduo de histidina 213 e então transfere o grupo fosforil para o resíduo de aspartato 53 de PhoB (SANTOS-BENEIT, 2015). PhoB fosforilado é capaz de se ligar nas sequências PHO box e interagir com a subunidade s^{70} da RNA polimerase, permitindo a transcrição dos genes do regulon PHO (VUPPADA et al., 2018; SANTOS-BENEIT, 2015). Em situações onde a concentração de Pi no meio é suficiente, PhoR age como fosfatase e remove o grupo fosfato de PhoB, inibindo a transcrição dos genes (GARDNER et al., 2015). A Figura 1 ilustra como é feito o transporte de Pi através do transportador PstSCAB-PhoU e como é feita a regulação da transcrição dos genes de PHO.

O sistema *pst* codifica um transportador do tipo ABC formado por 5 proteínas: PstS, PstC, PstA, PstB e PhoU (VUPPADA et al., 2018). PstS é uma proteína periplasmática ligadora de Pi, PstC e PstA são proteínas transmembrana, que formam o canal por onde o Pi é transportado, PstB é a proteína citoplasmática responsável por fornecer a energia necessária para o transporte de Pi por meio da hidrólise de ATP (VUPPADA et al., 2018; VERSHININA; ZNAMENSKAYA, 2002). PhoU é uma proteína citoplasmática que não participa diretamente do transporte de Pi (RICE et al., 2009). Aparentemente, ela interage com PstB e PhoR e é necessária para a transdução de sinal (GARDNER et al., 2015). Além disso, PhoU regula o transporte de Pi via Pst, para que a bactéria não acumule quantidades tóxicas desta molécula (RICE et al., 2009; GARDNER et al., 2015).

Outro gene pertencente ao regulon PHO, importante para este trabalho, é *phoA*, que codifica a enzima periplasmática fosfatase alcalina (FA) (VUPPADA et al., 2018). Em situações onde há limitação de Pi, sua síntese é aumentada em mais de 1000 vezes, o que a faz um excelente repórter do status de ativação do regulon (WANNER et al., 1996; VUPPADA et al., 2018).

A difusão de Pi e outros compostos fosfatados para o periplasma é facilitada pela porina PhoE, também membro do regulon PHO (VERSHININA; ZNAMENSKAYA, 2002). No periplasma, compostos fosfatados que não conseguem penetrar a membrana citoplasmática são hidrolizados pela FA (VERSHININA; ZNAMENSKAYA, 2002). O Pi liberado se liga à proteína PstS e é carregado até o canal de membrana formado por PstC e PstA, que junto com a energia fornecida por PstB, transporta o Pi para o interior da célula (VERSHININA; ZNAMENSKAYA, 2002).

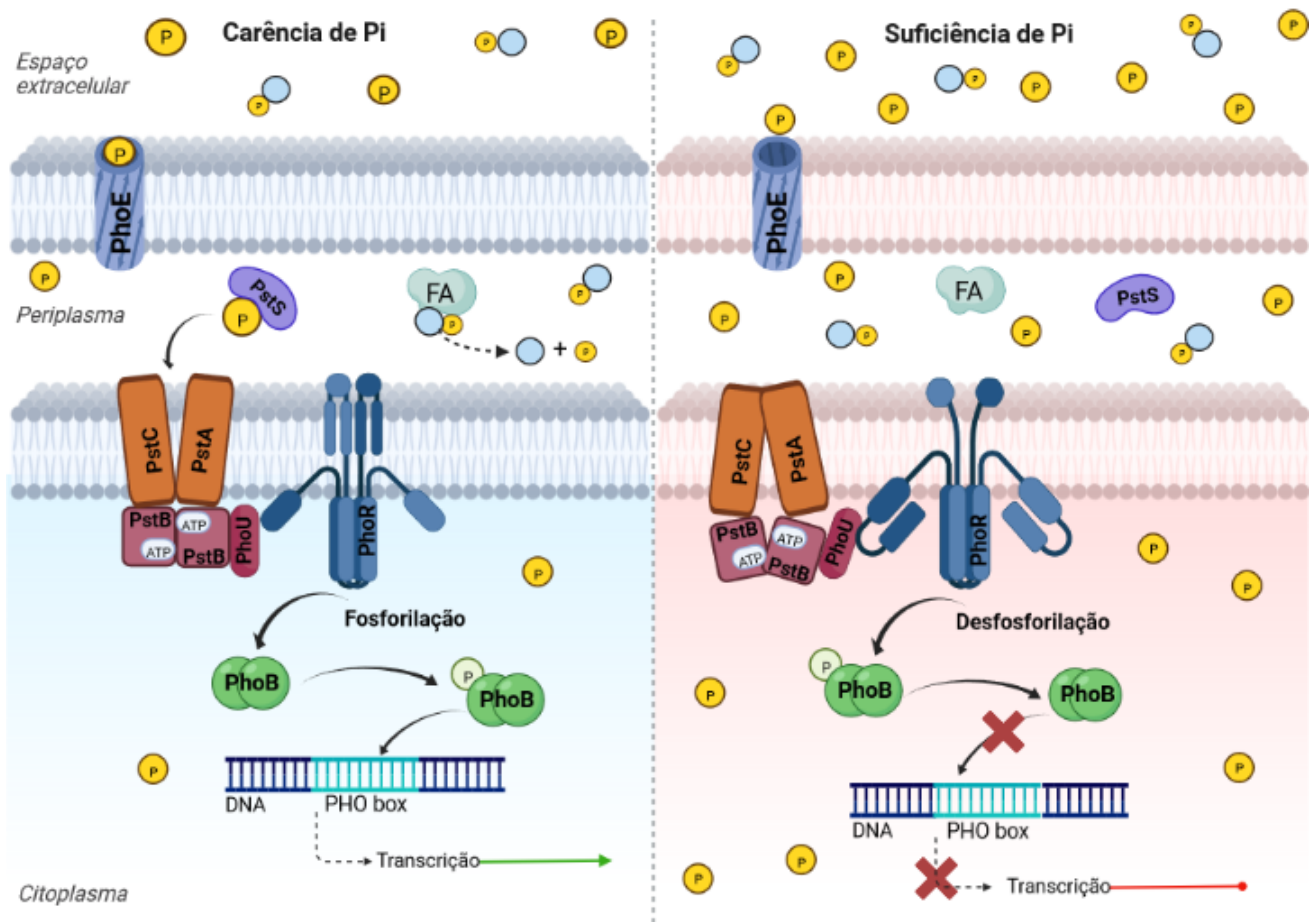


Figura 1 – Transporte de Pi via Pst e regulação da transcrição dos genes do regulon PHO. Pi e compostos fosfatados entram no periplasma da bactéria por meio de PhoE. Os compostos fosfatados são clivados pela enzima fosfatase alcalina (FA). O Pi é levado, por PstS, para o canal de membrana formado por PstC e PstA e é transportado para dentro da célula pela energia fornecida por PstB. A concentração de Pi no periplasma é transduzida para PhoR, que em situações de carência de Pi, ativa PhoB, permitindo a transcrição dos genes do regulon PHO. Quando há suficiência de Pi no meio, PhoR desfosforila PhoB e a transcrição dos genes de PHO é inibida. Esquema criado com BioRender.com, adaptado de McCleary, W. R. (2017) (MCCLEARY, 2017).

1.2 Transportadores de Pi e outros compostos fosfatados

Além de Pst, *E. coli* possui outro transportador de Pi canônico, o sistema de transporte de baixa afinidade PitA, que não faz parte do regulon PHO (HARRIS et al., 2001). Em situações onde há suficiência de Pi no meio, o transporte é realizado principalmente pelo transportador PitA. PitA é constituído por uma única proteína integral e é expresso de forma constitutiva (HARRIS et al., 2001). Ele realiza o transporte de Pi formando um complexo solúvel de Mg^{2+} ou Ca^{2+} ou Zn^{2+} com fosfato, que são juntamente transportados para o interior da célula (HARRIS et al., 2001). A Figura 2 ilustra como é realizado o transporte via PitA. *E. coli* possui um transportador de Pi homólogo ao PitA, chamado PitB, que normalmente está inativo (HOFFER

et al., 2001).

phnCDEFGHIJKLMNOP é um operon de 14 genes responsáveis pelo transporte e assimilação de fosfonatos (Pn) (STASI; NEVES; SPIRA, 2019). O transporte de Pn é realizado pelo transportador do tipo ABC PhnCDE codificado pelos 3 primeiros genes do operon – *phnCDE* (STASI; NEVES; SPIRA, 2019). PhnC é uma proteína ligadora de ATP, PhnD uma proteína periplasmática de ligação ao Pn e PhnE é a permease pela qual ocorre o transporte ativo de Pn (STASI; NEVES; SPIRA, 2019). O transporte de fosfonatos está esquematizado na Figura 2. PhnF é uma proteína regulatória do operon e as demais são enzimas envolvidas no catabolismo de fosfonato (STASI; NEVES; SPIRA, 2019). O gene *phnE* de *E. coli* K-12 carrega uma inserção de 8 pares de bases, que leva a uma quebra do quadro de leitura, resultando em um codon de parada prematuro e na inativação da permease (STASI; NEVES; SPIRA, 2019). Essa inserção pode ser deletada de forma espontânea em bactérias que crescem com Pn como única fonte de fósforo, ocasionando a ativação do transportador (STASI; NEVES; SPIRA, 2019). Foi recentemente demonstrado que, além de Pn, o sistema PhnCDE pode transportar Pi na ausência de *pst* e *pitA* (STASI; NEVES; SPIRA, 2019).

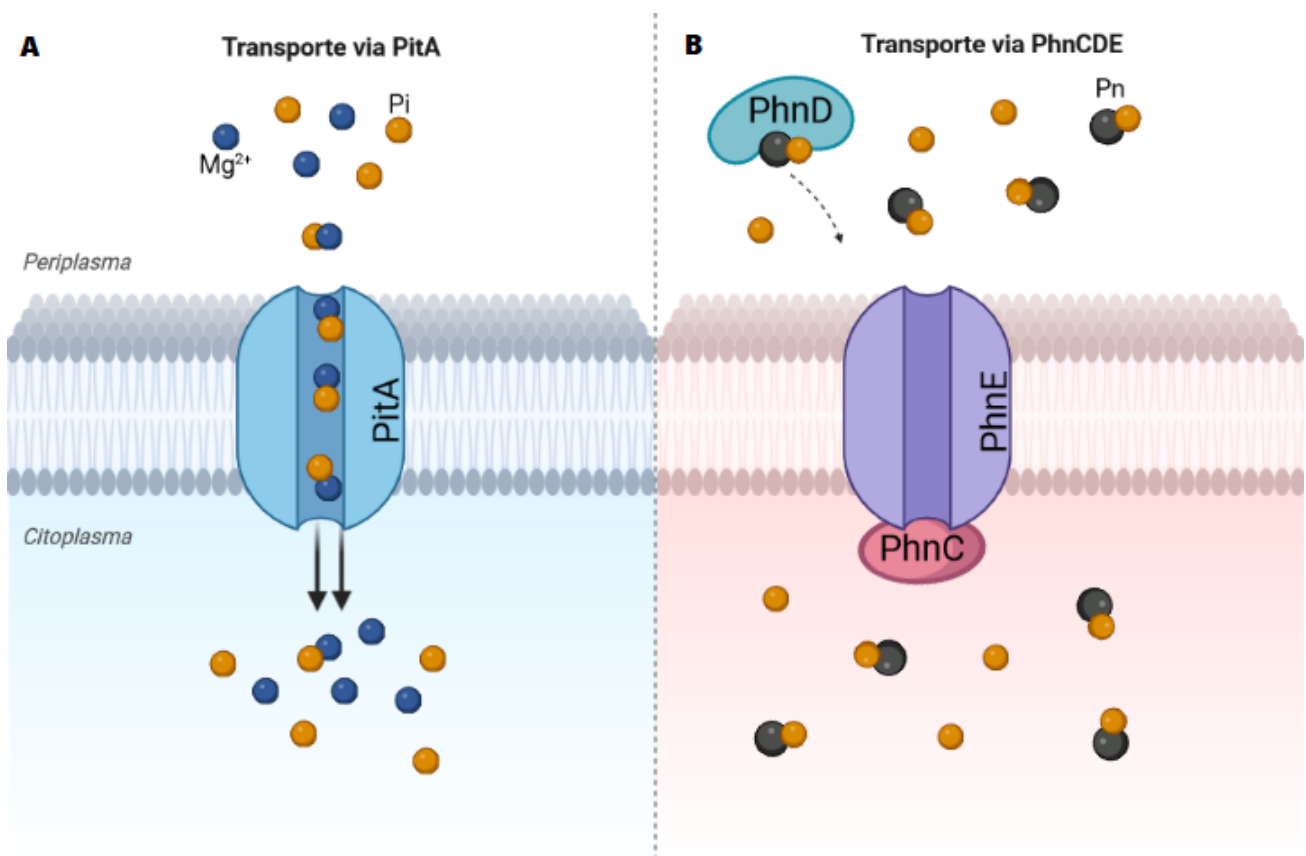


Figura 2 – Transporte de Pi via PitA e via PhnCDE. (A) Pi e íons metálicos são transportados em conjunto para o interior da célula através do transportador PitA. (B) O fosfonato é levado, por PhnD, para o canal de membrana formado pela proteína PhnE, e é transportado para o interior da célula através da energia fornecida por PhnC. Esquema criado com BioRender.com.

E. coli consegue captar diretamente organofosfatos, como o glicerol-3-fosfato (G3P) e o glicose-6-fosfato (VERSHININA; ZNAMENSKAYA, 2002). O primeiro através do sistema Ugp-BAEC e do transportador GlpT e o segundo, por meio do transportador UhpT (VERSHININA; ZNAMENSKAYA, 2002; HARRIS et al., 2001). Os transportadores GlpT e UhpT funcionam como *antiporters* no transporte de Pi, mas são incapazes de sustentar o crescimento da bactéria com Pi (HARRIS et al., 2001).

2 Mutações

Alterações na sequência genômica de um organismo, também conhecidas como mutações, são a fonte primária de variação fenotípica em uma espécie (GORDO; PERFEITO; SOUSA, 2011; HALL, 1990). Há diversos tipos de mutação: substituições de bases, deleções, e inserções, que podem envolver uma ou poucas bases ou longas sequências. Mutações são aleatórias, ou seja, ocorrem independentemente da capacidade de conferir vantagem adaptativa ou não ao organismo. Elas podem, portanto, ser neutras, deletérias ou benéficas (GORDO; PERFEITO; SOUSA, 2011; HALL, 1990; FITZGERALD; ROSENBERG, 2019). Algumas mutações resultam em um aumento da aptidão do organismo em determinadas condições do meio (GORDO; PERFEITO; SOUSA, 2011). Por exemplo, mutações que aumentam a expressão de determinados genes podem ser vantajosas em mudanças rápidas de ambiente, porém podem prejudicar a aptidão em outras condições ambientais (FITZGERALD; ROSENBERG, 2019). Além de mutações, microrganismos podem incrementar a sua diversidade genética por meio da transferência horizontal de genes, que também pode ser benéfica ou deletéria (GORDO; PERFEITO; SOUSA, 2011).

Mutações podem ocorrer durante o processo de replicação, por meio de substituições de bases, que são classificadas em transições (troca de uma purina por outra purina, ou de uma pirimidina por outra pirimidina) ou transversões (substituição de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa) (MARQUES, 2012). Alterações na sequência de DNA também podem ser causadas por alterações químicas, como a desaminação e a alquilação de bases, ou pela oxidação por radicais livres e peróxidos que provocam o pareamento errôneo de bases nitrogenadas (MARQUES, 2012). Deleções e inserções de bases, também chamadas de *indels* ocorrem, principalmente, por meio de recombinação homóloga ou transposição de elementos móveis (MARQUES, 2012). *Indels* resultam muitas vezes em alterações na sequência aminoácidos e acarretam mudanças no quadro de leitura e o surgimento de códons de parada prematuros (MARQUES, 2012).

Cada espécie tem uma taxa de mutação característica. Em *Escherichia coli*, mutações espontâneas ocorrem numa taxa de aproximadamente 10^{-3} por genoma por geração ou 10^{-6} /gene (FITZGERALD; ROSENBERG, 2019; SCHAAPER; DUNN, 1991; MADIGAN et al., 2016), sendo que inserções de elementos IS ocorrem numa taxa de $\sim 3.5 \times 10^{-4}$ por genoma por geração (NZABARUSHIMANA; TANG, 2018).

2.1 Mutações PHO-constitutivas

Mutantes PHO-constitutivos surgem quando a bactéria perde a capacidade de reprimir os genes de PHO quando há excesso de Pi no meio (TORRIANI; ROTHMAN, 1961). Os primeiros mutantes PHO-constitutivos foram isolados em 1961, quando bactérias selvagens foram semeadas em meio contendo glicerol-2-fosfato (G2P) como única fonte de carbono, na presença de suficiência de Pi (TORRIANI; ROTHMAN, 1961). Os primeiros mutantes surgem na placa após 72 horas de incubação e vão se acumulando paulatinamente ao longo de 14 dias (NEVES et al., 2020). Mutações PHO-constitutivas apresentam características semelhantes a de mutações adaptativas, com a curva de surgimento longitudinal de mutantes apresentando um padrão sigmoide e apenas após 3 dias de contato das bactérias com o meio seletivo (NEVES et al., 2020). Porém, um estudo recente de nosso laboratório mostrou que essas mutações são, em realidade, preexistentes. A baixa frequência destes mutantes, em torno de $1 - 2 \times 10^{-8}$ /gene e a forma como eles se acumulam, ocorre em razão da inibição do crescimento dos mutantes por bactérias vizinhas (NEVES et al., 2020). Algumas mutações específicas em *phoR* ou mutações nulas em qualquer um dos 5 genes do sistema *pst* leva PhoR a se comportar apenas como quinase, levando à expressão constitutiva dos genes (GARDNER et al., 2015; NEVES et al., 2015).

Poucos estudos sobre mutações PHO-constitutivas já foram realizados. Em 1989, Yamada et al publicaram um estudo onde eles haviam testado alguns mutantes nos genes *phoB* e *phoR* afim de correlacionar os tipos de mutações encontrados com os fenótipos apresentados pelos mutantes. Nenhum dos mutantes em *phoB* expressou o gene *phoA* e apenas um mutante *phoR* não possuía mutação *nonsense* e este mutante não era capaz de reprimir a expressão do regulon *pho* em excesso de Pi (YAMADA et al., 1989). Em estudos sobre mutações PHO-constitutivas anteriormente realizados no nosso laboratório, mutantes em *phoR* só foram isolados em cepas MG1655 *pitA* (NEVES et al., 2015).

3 Elementos IS

Elementos IS ou sequências de inserção (do inglês, *Insertion Sequences*) são elementos genéticos simples, capazes de se mover dentro de um mesmo cromossomo (*in cis*) ou entre cromossomos dentro de uma mesma célula (*in trans*) (VANDECRAEN et al., 2017; XIE; TANG, 2017). Elementos IS são os menores elementos genéticos móveis (EGMs) conhecidos, possuindo entre 700 e 3000 pb. A sua sequência inclui, geralmente, a ORF de uma transposase e sítios cis-ativos, que são terminais de sequências repetidas e invertidas (IR) (LEE et al., 2016). A transposase catalisa a mobilização desses elementos, atuando sobre os sites cis-ativos, realizando a clivagem do DNA e a transferência da sequência do IS (LEE et al., 2016; VANDECRAEN et al., 2017). Existem alguns mecanismos de transposição distintos, os mais frequentes são do tipo copia-cola e corta-cola (LEE et al., 2016). O mecanismo copia-cola é do tipo replicativo,

nele, uma cópia do IS é inserida na região alvo, mantendo a cópia original e a nova cópia no genoma (MARQUES, 2012; LEE et al., 2016). Já o mecanismo corta-cola é não replicativo. O IS doador é clivado do site de origem e colado no site-alvo, mantendo apenas uma cópia do mesmo elemento no genoma (MARQUES, 2012). A classificação dos elementos IS é baseada, principalmente, na similaridade entre as suas transposases (VANDECRAEN et al., 2017). Porém, outras características importantes para a classificação das famílias são: o tamanho e a sequência dos terminais IR; a similaridade e a organização dos terminais repetidos que normalmente são gerados no momento de inserção (SIGUIER; FILÉE; CHANDLER, 2006). Além disso, esses elementos também podem ser classificados de acordo com o mecanismo químico utilizado para quebrar e religar o DNA alvo durante a transposição (SIGUIER et al., 2015). Atualmente, os elementos IS são organizados em 29 famílias. Em *E. coli* são encontradas, principalmente, 4 famílias: IS1, IS3, IS4 e IS5 (LEE et al., 2016).

Estresses ambientais podem aumentar a frequência com a qual um EGM se move no genoma, mas os mecanismos pelos quais isso ocorre são pouco compreendidos (FITZGERALD; ROSENBERG, 2019). Elementos IS são muito relacionados com a reorganização do genoma e são, por isso, considerados elementos chave na evolução genômica (NZABARUSHIMANA; TANG, 2018). Os efeitos de mutações causadas por inserções de elementos IS, vão desde a melhora na aptidão bacteriana, promovendo uma melhora na captação de nutrientes em meios limitantes, até a alteração em fatores de virulência, como os de aderência celular e produção de toxinas (VANDECRAEN et al., 2017). Inserções por elementos IS também estão relacionadas a ativação de genes normalmente inativos (HOFFER et al., 2001), porém a inativação do gene ou dos genes adjacentes por inserção do IS dentro do gene ou na região promotora é o efeito mais comum (VANDECRAEN et al., 2017).

2 Objetivos

Mutantes PHO-constitutivos surgem quando as bactérias perdem a capacidade de regular a expressão dos genes do regulon PHO independentemente da concentração de ortofosfato no meio. Até o momento, as mutações PHO-constitutivas foram pouco caracterizadas e o efeito dessas mutações sob a aptidão desses mutantes não foi testado. Em vista disso, o presente trabalho buscou caracterizar mutantes PHO-constitutivos derivados de 4 cepas de origem. Essas cepas são derivadas da cepa protótipo de *E. coli* K-12 MG1655: MG1655 selvagem, MG1655 *pitA::kan*, MG1655 $\Delta phnCDE$ e MG1655 $\Delta phnCDE\Delta pitA$.

Os objetivos específicos são:

1. Isolamento de mutantes PHO-constitutivos a partir da cepa selvagem MG1655 e dos seus derivados $\Delta phnCDE$ e $\Delta phnCDE\Delta pitA$;
2. Caracterização do gene de *pst* ou de *phoR* mutado. A seguir:
 - Localização do gene mutado por meio de ensaios de complementação *in trans* com plasmídeos carreando os genes de *pst* selvagens ou pela transdução de *phoR* selvagem;
 - No caso de mutações em *pst*, determinação da polaridade da mutação
 - Sequenciamento do gene afetado pela mutação
 - Determinação da aptidão dos mutantes PHO-constitutivos por meio dos ensaios de atividade de FA

6 Conclusões

- As taxas de mutação calculadas neste estudo utilizando o sistema de mutações PHO-constitutivas para MG1655 e seus derivados estão dentro dos limites esperados para *E. coli*.
- A adição da mistura isomérica G3P/G2P alivia a pressão seletiva do meio sobre as mutações PHO-constitutivas, minimizando a segregação dos mutantes.
- Os segregantes de mutantes derivados da cepa *pitA::kan* não aparentam ser supressores. Mais experimentos serão necessários para identificar se eles são revertentes verdadeiros, ou não.
- O *background* de origem dos mutantes PHO-constitutivos tem influencia sobre o nível de FA produzido por esses mutantes. O tipo de mutação e o gene afetado também parecem influenciar o nível de FA produzido.
- A expressão constitutiva dos genes do regulon PHO tem um custo sobre a aptidão dos mutantes PHO-constitutivos que pode ser evidenciado pela a correlação negativa entre a atividade de FA e o crescimento dos mutantes e a instabilidade das mutações. Experimentos de competição e a quantificação da taxa de reversão dos mutantes serão necessários para avaliar o real custo da expressão constitutiva dos genes de PHO nos diferentes mutantes PHO-constitutivos identificados neste estudo.
- As inserções de elementos IS encontradas nos mutantes foram causadas pela transposição de elementos IS1 e IS2.

Referências

- ALMEIDA, L. G. de et al. phou inactivation in pseudomonas aeruginosa enhances accumulation of ppgpp and polyphosphate. *Applied and environmental microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 81, n. 9, p. 3006–3015, 2015. Citado na página 62. Citado 1 vezes nas páginas 62.
- BRACHA, M.; YAGIL, E. Genetic mapping of the pho regulator gene of alkaline phosphatase in escherichia coli. *Microbiology*, Microbiology Society, v. 59, n. 1, p. 77–81, 1969. Citado na página 41. Citado 1 vezes nas páginas 41.
- CHEN, X.; ZHANG, J. No gene-specific optimization of mutation rate in escherichia coli. *Molecular biology and evolution*, Oxford University Press, v. 30, n. 7, p. 1559–1562, 2013. Citado na página 61. Citado 1 vezes nas páginas 61.
- CRÉPIN, S. et al. The pho regulon and the pathogenesis of escherichia coli. *Veterinary microbiology*, Elsevier, v. 153, n. 1-2, p. 82–88, 2011. Citado na página 27. Citado 1 vezes nas páginas 27.
- DRAKE, J. W. et al. Rates of spontaneous mutation. *Genetics*, Oxford University Press, v. 148, n. 4, p. 1667–1686, 1998. Citado na página 61. Citado 1 vezes nas páginas 61.
- ECHOLS, H. et al. Genetic control of repression of alkaline phosphatase in e. coli. *Journal of molecular biology*, Elsevier, v. 3, n. 4, p. 425–438, 1961. Citado na página 38. Citado 1 vezes nas páginas 38.
- FIANDT, M.; SZYBALSKI, W.; MALAMY, M. Polar mutations in lac, gal and phage λ consist of a few is-dna sequences inserted with either orientation. *Molecular and General Genetics MGG*, Springer, v. 119, n. 3, p. 223–231, 1972. Citado na página 64. Citado 1 vezes nas páginas 64.
- FITZGERALD, D. M.; ROSENBERG, S. M. What is mutation? a chapter in the series: How microbes “jeopardize” the modern synthesis. *PLoS genetics*, Public Library of Science San Francisco, CA USA, v. 15, n. 4, p. e1007995, 2019.
- GALAS, D. J.; CALOS, M. P.; MILLER, J. H. Sequence analysis of tn9 insertions in the lacZ gene. *Journal of molecular biology*, Elsevier, v. 144, n. 1, p. 19–41, 1980. Citado na página 63. Citado 1 vezes nas páginas 63.
- GARDNER, S. G. et al. Genetic analysis, structural modeling, and direct coupling analysis suggest a mechanism for phosphate signaling in escherichia coli. *BMC genetics*, BioMed Central, v. 16, n. 2, p. 1–11, 2015.
- GHOSAL, D.; SOMMER, H.; SAEDLER, H. Nucleotide sequence of the transposable dna-element is2. *Nucleic Acids Research*, Oxford University Press, v. 6, n. 3, p. 1111–1122, 1979. Citado na página 63. Citado 1 vezes nas páginas 63.
- GORDO, I.; PERFEITO, L.; SOUSA, A. Fitness effects of mutations in bacteria. *Microbial Physiology*, Karger Publishers, v. 21, n. 1-2, p. 20–35, 2011. Citado na página 31. Citado 1 vezes nas páginas 31.

- HALL, B. G. Spontaneous point mutations that occur more often when advantageous than when neutral. *Genetics*, Genetics Soc America, v. 126, n. 1, p. 5–16, 1990. Citado na página 31. Citado 1 vezes nas páginas 31.
- HARRIS, R. M. et al. Characterization of pita and pitb from escherichia coli. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 183, n. 17, p. 5008–5014, 2001.
- HOFFER, S. M. et al. Activation by gene amplification of pitb, encoding a third phosphate transporter of escherichia coli k-12. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 183, n. 15, p. 4659–4663, 2001.
- KASSAMBARA, A. *ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots*. [S.l.], 2020. R package version 0.4.0. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>>. Citado na página 42. Citado 1 vezes nas páginas 42.
- KASSAMBARA, A. *rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests*. [S.l.], 2021. R package version 0.7.0. Disponível em: <<https://CRAN.R-project.org/package=rstatix>>. Citado na página 42. Citado 1 vezes nas páginas 42.
- LEE, H. et al. Insertion sequence-caused large-scale rearrangements in the genome of escherichia coli. *Nucleic acids research*, Oxford University Press, v. 44, n. 15, p. 7109–7119, 2016.
- LEVINTHAL, C.; SIGNER, E. R.; FETHEROLF, K. Reactivation and hybridization of reduced alkaline phosphatase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 48, n. 7, p. 1230–1237, 1962. Citado na página 38. Citado 1 vezes nas páginas 38.
- LURIA, S. E.; DELBRÜCK, M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, Oxford University Press, v. 28, n. 6, p. 491, 1943.
- MADIGAN, M. T. et al. *Microbiologia de Brock-14^a Edição*. [S.l.]: Artmed Editora, 2016. Citado na página 31. Citado 1 vezes nas páginas 31.
- MAHILLON, J.; CHANDLER, M. Insertion sequences. *Microbiology and molecular biology reviews*, Am Soc Microbiol, v. 62, n. 3, p. 725–774, 1998. Citado na página 63. Citado 1 vezes nas páginas 63.
- MAKINO, K. et al. Dna binding of phob and its interaction with rna polymerase. *Journal of molecular biology*, Elsevier, v. 259, n. 1, p. 15–26, 1996.
- MARQUES, M. d. V. *Biologia molecular e genética bacteriana*. [S.l.]: Sociedade Brasileira de Genética (SBG), 2012.
- MCCLEARY, W. R. Molecular mechanisms of phosphate homeostasis in escherichia coli. *Escherichia coli—recent advances on physiology, pathogenesis and biotechnological applications. InTechOpen, Rijeka*, p. 333–357, 2017. Citado na página 29. Citado 1 vezes nas páginas 29.
- MCWILLIAM, H. et al. Analysis tool web services from the embl-ebi. *Nucleic acids research*, Oxford University Press, v. 41, n. W1, p. W597–W600, 2013. Citado na página 42. Citado 1 vezes nas páginas 42.
- MILLER, J. H. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for escherichia coli and related bacteria. *Trends in Biochemical Sciences-Library Compendium*, Amsterdam: Elsevier, c1976-c1999., v. 18, p. 193, 1993. Citado na página 38. Citado 1 vezes nas páginas 38.

- MORITA, T. et al. Hyperproduction of phosphate-binding protein, phos, and pre-phos proteins in escherichia coli carrying a cloned phos gene. *European journal of biochemistry*, Wiley Online Library, v. 130, n. 3, p. 427–435, 1983. Citado na página 61. Citado 1 vezes nas páginas 61.
- NEVES, H. I. et al. Competition for nutritional resources masks the true frequency of bacterial mutants. *BMC biology*, BioMed Central, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2020.
- NEVES, H. I. et al. Ugp and pita participate in the selection of pho-constitutive mutants. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 197, n. 8, p. 1378–1385, 2015.
- NZABARUSHIMANA, E.; TANG, H. Insertion sequence elements-mediated structural variations in bacterial genomes. *Mobile DNA*, Springer, v. 9, n. 1, p. 1–5, 2018.
- ONONECHNINOV, K.; GOLOSOVA, O.; FURSOV, M. Ugene team (2012). unipro ugene: a unified bioinformatics tool. *Bioinformatics*, v. 28, n. 8, p. 1166–1167. Citado na página 42. Citado 1 vezes nas páginas 42.
- OU, J.; ZHU, L. J. trackviewer: a bioconductor package for interactive and integrative visualization of multi-omics data. *Nature Methods*, v. 16, p. 453–454, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41592-019-0430-y>>. Citado na página 42. Citado 1 vezes nas páginas 42.
- PHILLIPS, K. N.; COOPER, T. F. The cost of evolved constitutive lac gene expression is usually, but not always, maintained during evolution of generalist populations. *Ecology and evolution*, Wiley Online Library, v. 11, n. 18, p. 12497–12507, 2021. Citado na página 61. Citado 1 vezes nas páginas 61.
- 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*, Am Soc Microbiol, v. 75, n. 3, p. 573–582, 2009.
- RStudio Team. *RStudio: Integrated Development Environment for R*. Boston, MA, 2021. Disponível em: <<http://www.rstudio.com/>>. Citado na página 42. Citado 1 vezes nas páginas 42.
- SANTOS-BENEIT, F. The pho regulon: a huge regulatory network in bacteria. *Frontiers in microbiology*, Frontiers, v. 6, p. 402, 2015.
- SCHAAPER, R. M.; DUNN, R. L. Spontaneous mutation in the escherichia coli lacI gene. *Genetics*, Genetics Soc America, v. 129, n. 2, p. 317–326, 1991. Citado na página 31. Citado 1 vezes nas páginas 31.
- SIGUIER, P.; FILÉE, J.; CHANDLER, M. Insertion sequences in prokaryotic genomes. *Current opinion in microbiology*, Elsevier, v. 9, n. 5, p. 526–531, 2006. Citado na página 33. Citado 1 vezes nas páginas 33.
- SIGUIER, P. et al. Everyman's guide to bacterial insertion sequences. *Mobile DNA III*, Wiley Online Library, p. 555–590, 2015. Citado na página 33. Citado 1 vezes nas páginas 33.
- SPIRA, B. et al. Alternative promoters in the pst operon of escherichia coli. *Molecular Genetics and Genomics*, Springer, v. 284, n. 6, p. 489–498, 2010. Citado na página 45. Citado 1 vezes nas páginas 45.

- STASI, R.; NEVES, H. I.; SPIRA, B. Phosphate uptake by the phosphonate transport system phn_{ncd}. *BMC microbiology*, BioMed Central, v. 19, n. 1, p. 1–8, 2019.
- STEED, P.; WANNER, B. 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*, Am Soc Microbiol, v. 175, n. 21, p. 6797–6809, 1993. Citado na página 62. Citado 1 vezes nas páginas 62.
- STOEBEL, D. M.; DEAN, A. M.; DYKHUIZEN, D. E. The cost of expression of escherichia coli lac operon proteins is in the process, not in the products. *Genetics*, Oxford University Press, v. 178, n. 3, p. 1653–1660, 2008. Citado na página 61. Citado 1 vezes nas páginas 61.
- TOGAWA, R. C.; BRÍGIDO, M. M. Phph: Web based tool for simple electropherogram quality analysis. In: *1st International Conference on Bioinformatics and Computational Biology-IcoBiCoBi 14th to 16th May*. [S.l.: s.n.], 2003. Citado na página 42. Citado 1 vezes nas páginas 42.
- TORRIANI, A.; ROTHMAN, F. Mutants of escherichia coli constitutive for alkaline phosphatase. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 81, n. 5, p. 835–836, 1961.
- VANDECRAEN, J. et al. The impact of insertion sequences on bacterial genome plasticity and adaptability. *Critical reviews in microbiology*, Taylor & Francis, v. 43, n. 6, p. 709–730, 2017.
- VERSHININA, O.; ZNAMENSKAYA, L. The pho regulons of bacteria. *Microbiology*, Springer, v. 71, n. 5, p. 497–511, 2002.
- VUPPADA, R. K. et al. Phosphate signaling through alternate conformations of the pstscab phosphate transporter. *BMC microbiology*, BioMed Central, v. 18, n. 1, p. 1–9, 2018.
- WANNER, B. L. et al. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, ASM press Washington, DC, v. 1, p. 1357–1381, 1996.
- XIE, Z.; TANG, H. Isescan: automated identification of insertion sequence elements in prokaryotic genomes. *Bioinformatics*, Oxford University Press, v. 33, n. 21, p. 3340–3347, 2017. Citado na página 32. Citado 1 vezes nas páginas 32.
- YAMADA, M. et al. Regulation of the phosphate regulon of escherichia coli: analysis of mutant phoB and phoR genes causing different phenotypes. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 171, n. 10, p. 5601–5606, 1989. Citado na página 32. Citado 1 vezes nas páginas 32.
- YANG, K.; WANG, M.; METCALF, W. W. Uptake of glycerol-2-phosphate via the ugp-encoded transporter in escherichia coli k-12. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 191, n. 14, p. 4667–4670, 2009. Citado na página 45. Citado 1 vezes nas páginas 45.
- ZHANG, Z. et al. A greedy algorithm for aligning dna sequences. *Journal of Computational biology*, Mary Ann Liebert, Inc., v. 7, n. 1-2, p. 203–214, 2000. Citado na página 42. Citado 1 vezes nas páginas 42.