

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)

São Paulo
2014

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 interations, 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.

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 patogena 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).

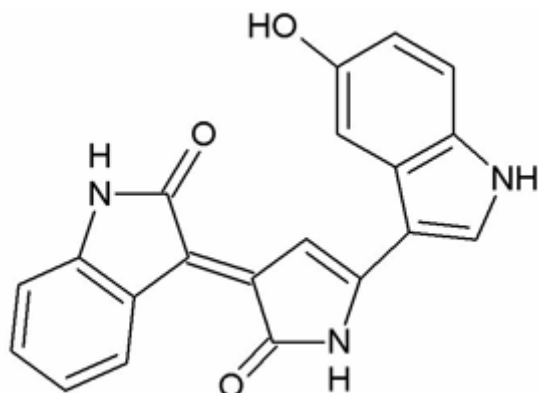


Figura 1.1. Estrutura da violaceína.

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).

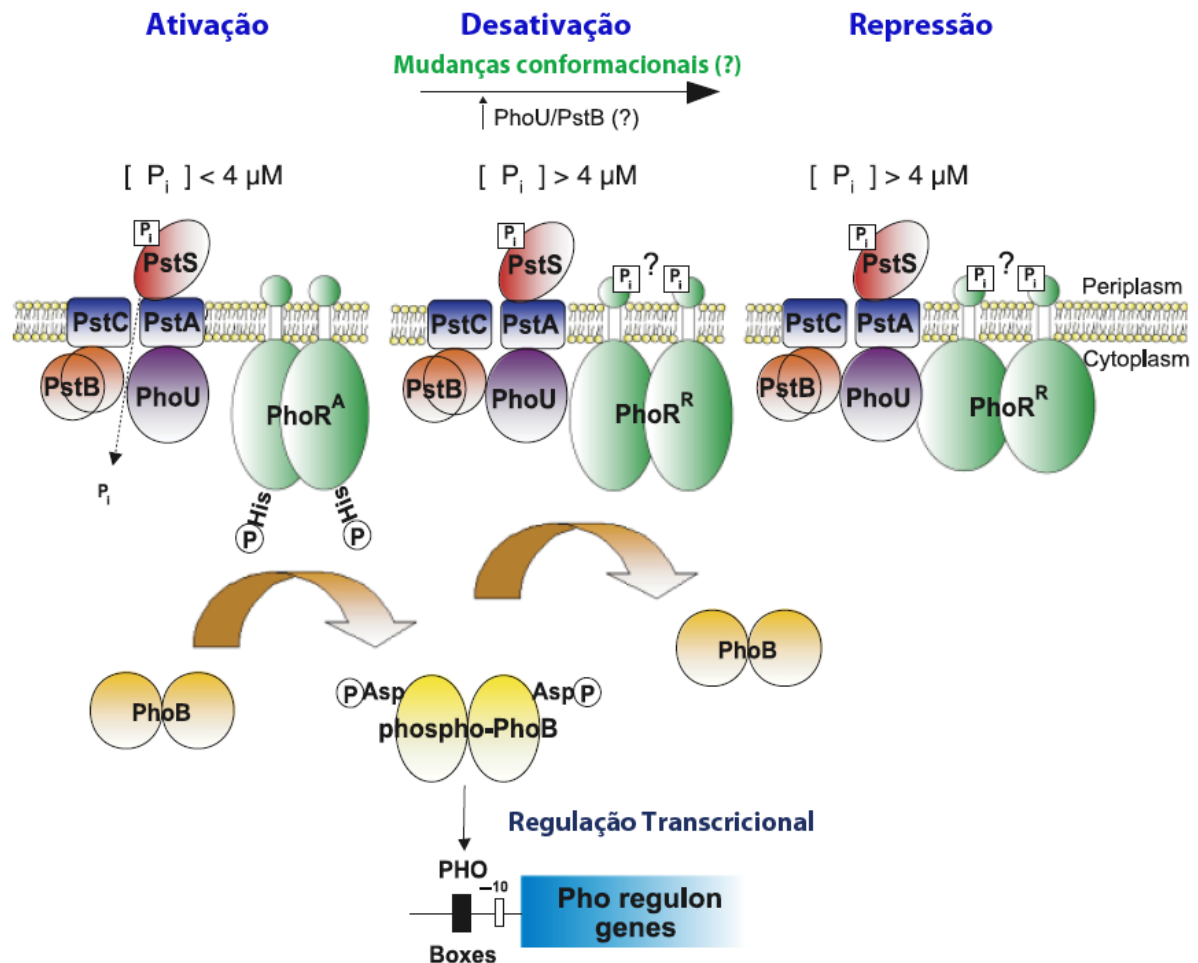


Figura 1.2. Regulação de PHO por PhoBR e Pst-PhoU. Quando a concentração de P_i no periplasma é baixa, PhoB é fosforilada por PhoR, tornando-se ativa. Em altas concentrações deste nutriente, PstB e PhoU interagem com PhoR de modo a evitar a fosforilação de PhoB. A desativação do sistema ocorre quando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

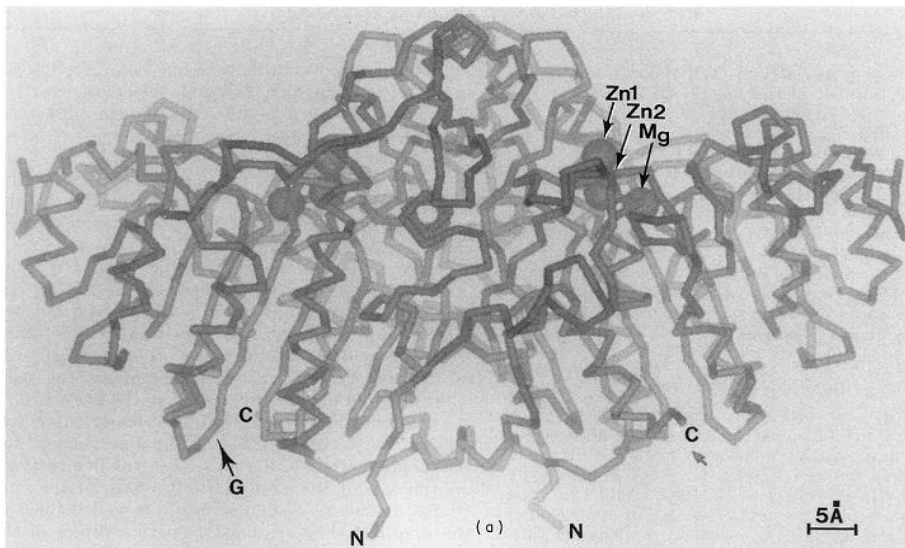
A fosfatase alcalina é, por excelência, o gene repórter da carência de Pi em *E. coli* e outras bactérias estudadas, sendo expressa em carência deste nutriente. Sua ação, hidrolisar fosfomonoésteres, é de fundamental importância para a obtenção de fosfato a partir de fontes alternativas, orgânicas de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

Há, atualmente, três famílias de fosfomonoesterases expresas 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.



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•Pi), seguida por uma covalente (E-Pi). Esta ligação é desfeita, sendo substituída por uma ligação não covalente (E•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 1.3 ilustra a interação entre PhoA e seu substrato (COLEMAN, 1992).

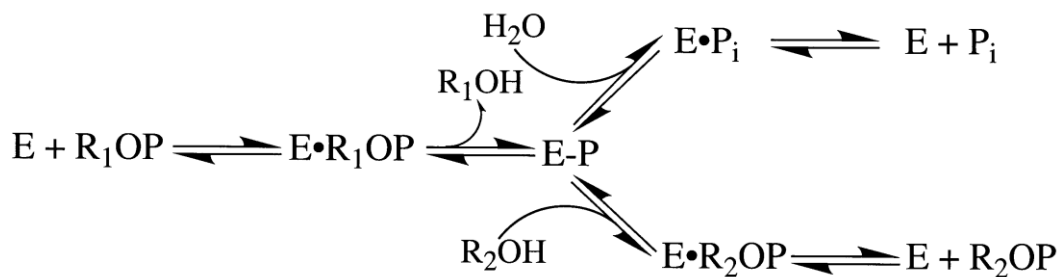


Figura 1.3. Reação de PhoA (E) com seu substrato (R_1OP). Há um ataque nucleofílico do resíduo de serina 102 (Ser102) ao fósforo, com coordenação dos íons metálicos da F.A., resultando primeiramente em uma ligação não covalente entre Ser102 e Pi (E•Pi). Em seguida, Ser102 e Pi formam uma ligação covalente, 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•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• 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).

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. EMBOSS: 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.