

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Centro de Ciências da Saúde  
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Carolina Lage Goulart

Caracterização da porina putativa PhoE de  
*Vibrio cholerae* O1 e avaliação de seu  
papel na sobrevivência da bactéria ao  
deoxicolato de sódio

Rio de Janeiro

2007

# **Livros Grátis**

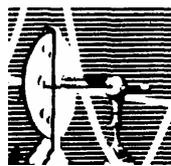
<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

*Carolina Lage Goulart*

Caracterização da porina putativa PhoE de  
*Vibrio cholerae* O1 e avaliação de seu  
papel na sobrevivência da bactéria ao  
deoxicolato de sódio

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE  
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO A OBTENÇÃO DO GRAU  
DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)



**Universidade Federal do Rio de Janeiro**

**Centro de Ciências da Saúde**

**Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho**

**2007**

## Ficha catalográfica

Goulart, CL

Caracterização da porina putativa PhoE de *Vibrio cholerae* O1 e avaliação de seu papel na sobrevivência da bactéria ao deoxicolato de sódio / Carolina Lage Goulart. – Rio de Janeiro: UFRJ / IBCCF, 2007

x, 122 f., il.; 29,7 cm

Orientadora: Wanda Maria Almeida von Krüger

Dissertação (mestrado): UFRJ / IBCCF / Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), 2007.

Referências Bibliográficas: f. 106–117

Anexo: f. 119–122

1. fosfoporinas 2. resistência a sais biliares - Dissertação

I. von Krüger, Wanda Maria Almeida. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica). III. Título

Este trabalho foi desenvolvido na Unidade Multidisciplinar de Genômica do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Dra. Wanda Maria Almeida von Krüger, com auxílios concedidos pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo Programa de Apoio a Núcleos de Excelência em Ciência e Tecnologia (PRONEX), e pelo Programa ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (PADCT).

## **Agradecimentos**

A minha orientadora Dra. Wanda von Krüger, por confiar em mim e por ter partilhado muitos conhecimentos (e inúmeros momentos de alegria).

Ao Dr. Paulo Bisch, por todo o apoio.

A todos que passaram ou ainda se mantêm na Unidade Genômica: sem vocês não haveria nada. Às muitas mulheres do laboratório: valeu pela TPM em conjunto! Às alegres meninas da biomedicina do estágio rotatório em 2006: foi muito bom explorar vocês por alguns meses! Valeu, Letícia, por tudo o que você fez e me ensinou.

À Dra. Ana Gisele, da Fiocruz, obrigada pelo seqüenciamento de proteínas.

Aos meus amigos e familiares, agradeço a paciência.

Ao Marlos: obrigada por (ser) tudo.

“Se enxerguei mais longe foi porque estava sobre os ombros de gigantes.”

Isaac Newton

“All my life I've had one dream, to achieve my many goals.”

Homer Simpson

(de Matt Groening)

## Resumo

*Vibrio cholerae* causa cólera, uma doença caracterizada por uma intensa diarreia aquosa. A bactéria coloniza o intestino delgado humano, onde expressa diversos fatores de virulência, mesmo na presença de substâncias tóxicas como a bile. Dentre as proteínas de membrana externa (OMP), OmpU é crítica para a resistência da bactéria à bile *in vitro*. Recentemente, uma nova OMP (VCA1008) foi identificada em *V. cholerae* O1. *In vitro*, sua expressão é induzida pela limitação de fosfato inorgânico (Pi) de maneira dependente de PhoB/R. Dados da literatura sugerem que ela seja expressa também *in vivo* e essencial para a colonização intestinal de modelos animais. VCA1008 apresenta similaridade de sequência com a PhoE<sup>Ec</sup>, uma porina aniônica de *E. coli* cuja expressão também é induzida pela limitação de Pi. VCA1008 foi considerada homóloga de PhoE<sup>Ec</sup> e denominada PhoE<sup>Vc</sup>. Neste trabalho, é demonstrado que, em limitação de Pi, PhoE<sup>Vc</sup> é expressa em cepas clássicas e El Tor de *V. cholerae*. Uma análise eletroforética de preparações de membrana externa sob condições não-desnaturantes revelou que a PhoE<sup>Vc</sup> pode formar trímeros. Entretanto, quando submetidas a temperaturas mais elevadas, a PhoE<sup>Vc</sup> dissocia em monômeros de pI 4,4 que migram como proteínas de 40 kDa. Durante a exportação para a membrana externa, PhoE<sup>Vc</sup> perde um peptídeo sinal de 21 aminoácidos, predito pela análise de VCA1008 com o programa Signal-P e confirmado pelo seqüenciamento da porção N-terminal da PhoE<sup>Vc</sup> madura. Outras análises revelaram que a PhoE<sup>Vc</sup> possui similaridade com diversas fosfoporinas, incluindo PhoE<sup>Ec</sup>. Resultados da análise da topologia sugerem que PhoE<sup>Vc</sup> seja uma porina, já que ela se insere na membrana externa através de 16 folhas  $\beta$ , com sete alças (L1-7) voltadas para o periplasma e oito (T1-8) voltadas para o meio externo, sendo a terceira alça (L3) excepcionalmente longa, o que já foi descrito como uma característica de porinas do grupo *Vibrio-Photobacterium*. Além disto, a L3 em PhoE<sup>Vc</sup> possui o domínio GTFTGD, característico das porinas clássicas. PhoE<sup>Vc</sup> possui ainda três dos quatro resíduos de lisina necessários à seletividade aniônica de PhoE<sup>Ec</sup> em posições equivalentes na estrutura secundária predita. A posição do quarto resíduo da lisina (K<sup>18</sup>) em PhoE<sup>Ec</sup> foi ocupada por um resíduo de ácido glutâmico (E<sup>18</sup>) em PhoE<sup>Vc</sup>. O resíduo E<sup>18</sup>, assim como as três lisinas conservadas foram também encontrados em posições equivalentes em porinas putativas, similares à PhoE<sup>Vc</sup>, de outras espécies do gênero *Vibrio*. Curiosamente, a montante de seus genes foram encontradas seqüências com características de caixa *pho*, sugerindo regulação por Pi, dependente de PhoB/R. A PhoE<sup>Vc</sup>, aparentemente, tem um papel na resistência aos sais biliares, uma vez que células de *V. cholerae* cultivadas em limitação de Pi na presença de deoxicolato de sódio (DOC) apresentaram maiores níveis de PhoE<sup>Vc</sup> na membrana externa e um aumento da atividade transcricional do promotor *vca1008*. Além disto, estas células de *V. cholerae*, ao contrário de seus mutantes  $\Delta$ *phoB/R*, se mostraram mais resistentes ao DOC. Estes resultados sugerem que PhoE<sup>Vc</sup>, uma OMP induzida por limitação de Pi, seja uma fosfoporina importante para resistência aos sais biliares em células de *V. cholerae* O1.

## Abstract

*Vibrio cholerae* causes cholera, an often fatal human diarrhoeal disease. The bacterium colonizes the small intestine, where it expresses virulence factors, despite the presence of toxic substances such as bile. A major outer membrane protein (OMP), OmpU, seems to be critical for bile *V. cholerae* resistance *in vitro*. Recently, a new OMP (VCA1008) has been identified in cells grown under low inorganic phosphate (Pi), in a PhoB/R-dependent manner in *V. cholerae* classical strain 569B. The gene *vca1008* is apparently expressed *in vivo* and is essential for the colonization of animal models. VCA1008 bears similarity to PhoE<sup>Ec</sup>, an anionic porin of *E. coli*, which is also induced by Pi starvation; therefore, it was denominated PhoE<sup>Vc</sup>. Here, we demonstrated that, under low Pi, PhoE<sup>Vc</sup> is expressed by classical and El Tor strains of *V. cholerae*. Electrophoretic analysis of outer membrane preparations under non-denaturing conditions revealed that PhoE<sup>Vc</sup> can form trimers. When subjected to heat treatments it can dissociate in monomers of pI 4.4 that run in gel as a protein of 40 kDa. During its translocation to the outer membrane, PhoE<sup>Vc</sup> loses a 21-residue peptide, as it was predicted by the SignalP program analysis of VCA1008 and confirmed by N-terminal sequencing of the mature form of the protein (PhoE<sup>Vc</sup>). Bioinformatic analysis with several programs grouped PhoE<sup>Vc</sup> among the  $\beta$ -barrel forming OMPs, a characteristic of classical porins. Secondary structure prediction revealed 16  $\beta$  strands with seven turns (T) and eight loops (L) and a large loop L3 containing the domain GTFTGD, also a hallmark of classical porins. PhoE<sup>Vc</sup> has three of the four conserved lysine residues, responsible for the anionic selectivity of PhoE<sup>Ec</sup> (K<sup>18</sup>, K<sup>29</sup>, K<sup>64</sup> and K<sup>125</sup>). In place of K<sup>18</sup>, PhoE<sup>Vc</sup> has an acid residue, E<sup>18</sup>. These characteristics have been also identified in the aminoacid sequences of putative porins of *Vibrio sp.* with similarity to PhoE<sup>Vc</sup>. Curiously, upstream their corresponding genes, *pho* box-like sequences have been found, suggesting regulation by Pi in a PhoB/R-dependent manner. Additionally, PhoE<sup>Vc</sup> seems to play an essential role in bile resistance, since *V. cholerae* cells under low Pi, in the presence of sodium deoxycholate (DOC), showed increased levels of PhoE<sup>Vc</sup> and higher activities for the *vca1008* promoter. Moreover, these *V. cholerae* cells, but not their  $\Delta$ *phoB/R* mutants, presented increased resistance to the bile salt. These results strongly suggest that PhoE<sup>Vc</sup>, a Pi induced OMP, is a phosphoporin that plays a role in bile resistance in *V. cholerae* O1 cells.

## Lista de Siglas

---

ADP	difosfato de adenosina
AMP	monofosfato de adenosina
Amp	ampicilina
ASB-14	amidosulfobetaína-14
BSA	albumina bovina sérica
CAPS	ácido 3-ciclohexilamino-propano sulfônico
CT	toxina colérica
DO	densidade óptica
DOC	deoxicolato de sódio
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilenodiamina tetracético
LB	meio de cultura Luria Bertani
LPS	lipopolissacarídeo
MS	espectrometria de massas
MS/MS	espectrometria de massas em sequência
octil-POE	octil-polioxietileno
OMP	proteína de membrana externa
OMP-Pg	proteína de membrana externa associada à mureína
ONPG	o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
pb	pares de base
PBS	solução salina tamponada
PCR	reação em cadeia da polimerase

---

---

Pi	fosfato inorgânico
pI	ponto isoelétrico
PMF	<i>peptide mass fingerprinting</i> (espectro de massas dos peptídeos resultantes da digestão trípica)
PMSF	fluoreto de fenil metil sulfonil
PNPP	p-nitrofenil-fosfato
PVDF	poli (fluoreto de vinilideno)
SDC	sistema de dois componentes
SDS	dodecil sulfato de sódio
TCP	pilus co-regulado à toxina colérica
TE	tampão Tris-HCl com EDTA
TG	meio de cultura Tris-glicose
TGHP	meio de cultura Tris-glicose suplementado com alta concentração de fosfato inorgânico
TGLP	meio de cultura Tris-Glicose suplementado com baixa concentração de fosfato inorgânico
VPI	ilha de patogenicidade de <i>Vibrio</i>
VSP	ilha de patogenicidade da sétima pandemia

---

# Sumário

<b>1. Introdução.....</b>	<b>13</b>
1.1. <i>A cólera</i> .....	14
1.2. <i>Vibrio cholerae</i> .....	16
1.3. <i>Biotipos do sorogrupo O1 e virulência</i> .....	18
1.4. <i>Regulação da expressão dos genes de virulência</i> .....	20
1.5. <i>Sistemas de dois componentes</i> .....	22
1.6. <i>O sistema PhoB/R e a resposta à limitação de fosfato</i> .....	24
1.7. <i>Proteínas de membrana externa</i> .....	27
1.8. <i>A bile e os mecanismos de resistência aos sais biliares</i> .....	29
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>34</b>
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>36</b>
3.1. <i>Cepas bacterianas, plasmídeos, meios de cultura e condições de cultivo</i> .....	37
3.2. <i>Análise da expressão de proteínas de membrana externa</i> .....	39
3.2.1. <i>Extração das OMPs ligadas à parede celular (OMPs-Pg)</i> .....	39
3.2.2. <i>Purificação parcial da PhoE<sup>Vc</sup></i> .....	40
3.2.3. <i>Preparação das amostras para SDS-PAGE</i> .....	40
3.2.4. <i>Preparação das amostras de membrana para eletroforese bi-dimensional</i> (2D) .....	41
3.2.5. <i>Análise eletroforética de proteínas</i> .....	41
3.2.5.1. <i>SDS-PAGE</i> .....	41
3.2.5.2. <i>Eletroforese 2D</i> .....	42
3.2.6. <i>Identificação das proteínas por espectrometria de massas</i> .....	43
3.2.6.1. <i>Preparação das amostras</i> .....	43

3.2.6.2. Obtenção dos PMFs ( <i>peptide mass fingerprinting</i> ) por espectrometria de massas.....	44
3.2.6.3. Seqüenciamento dos peptídeos.....	45
3.2.7. Seqüenciamento do N-terminal .....	45
<b>3.3. Ferramentas computacionais.....</b>	<b>46</b>
3.3.1. Busca por homologia e alinhamentos.....	46
3.3.2. Caracterização funcional da PhoE <sup>Vc</sup> .....	46
3.3.3. Predição da estrutura secundária .....	47
3.3.4. Busca por caixas <i>pho</i> putativas.....	47
<b>3.4. Avaliação da ativação transcricional dos promotores de <i>vca1008</i> e <i>phoB/R</i>.....</b>	<b>47</b>
3.4.1. Métodos genéticos .....	48
3.4.1.1. Preparação de DNA cromossomal.....	48
3.4.1.2. Amplificação do promotor putativo de <i>vca1008</i> .....	48
3.4.1.3. Construção da fusão transcricional (promotor de <i>vca1008-lacZ</i> ) ...	49
3.4.2. Atividades transcricionais dos promotores de <i>vca1008</i> e <i>phoBR</i> : dosagem da atividade da $\beta$ -galactosidase.....	50
3.4.3. Atividade do regulon Pho: dosagem da atividade da fosfatase alcalina (PhoA) .....	51
3.4.4. Dosagem de proteínas.....	51
<b>3.5. Teste de sobrevivência bacteriana ao DOC .....</b>	<b>52</b>
<b>4. Resultados .....</b>	<b>53</b>
<b>4.1. Expressão de proteínas de membrana externa associadas à parede celular         (OMPs-Pg) por cepas de <i>V. cholerae</i> selvagens e mutantes (<math>\Delta</math><i>phoB/R</i>)         cultivadas em meio rico .....</b>	<b>54</b>

4.2. Expressão de OMPs-Pg por cepas de <i>V. cholerae</i> selvagens e mutantes ( $\Delta$ phoB/R) cultivadas em meio definido na abundância (TGHP) e escassez (TGLP) de Pi.....	58
4.3. Caracterização da PhoE <sup>Vc</sup> da cepa de <i>V. cholerae</i> El Tor N16961 .....	65
4.4. Caracterização da PhoE <sup>Vc</sup> da cepa de <i>V. cholerae</i> clássica 569BSR.....	76
4.4.1. Seqüenciamento N-terminal da PhoE <sup>Vc</sup> .....	76
4.4.2. Purificação parcial da PhoE <sup>Vc</sup> .....	77
4.4.3. Formação de oligômeros e estabilidade térmica da PhoE <sup>Vc</sup> .....	78
4.4.4. Análise por eletroforese 2D das OMPs de <i>V. cholerae</i> .....	80
4.5. Papel da PhoE <sup>Vc</sup> na resistência ao deoxicolato de sódio (DOC).....	82
4.5.1. Expressão de OMPs em células cultivadas na presença de DOC.....	82
4.5.2. Análise da expressão de componentes do regulon Pho em resposta ao DOC.....	86
4.5.3. Avaliação da sobrevivência ao DOC.....	92
<b>5. Discussão .....</b>	<b>95</b>
5.1. Plasticidade da membrana externa de <i>V. cholerae</i> .....	96
5.2. A proteína PhoE <sup>Vc</sup> : uma (fosfo)porina? .....	99
5.3. Um papel para PhoE <sup>Vc</sup> na resistência à bile.....	100
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>104</b>
<b>Referências bibliográficas .....</b>	<b>107</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>119</b>

## **1. Introdução**

### 1.1. A cólera

A cólera é uma das doenças de maior impacto em saúde pública e vigilância sanitária em vários países. Sua propagação ocorre naturalmente sob a forma de grandes epidemias periódicas em escala continental (pandemias), provocando milhares de mortes (BARUA, 1992; SACK e cols., 2004; WHO, 2006). Existem relatos da ocorrência de oito pandemias de cólera (Tabela 1).

**Tabela 1 – Pandemias de cólera.**

Período	Origem
1817 – 1823	Índia
1829 – 1851	Índia
1852 – 1859	Índia
1863 – 1875	Índia
1881 – 1896	Índia
1899 – 1923	Índia
1961 em diante	Ilhas Célebes
1992 em diante	Índia e Bangladesh

Fonte: BARUA, 1992; SACK e cols., 2004

A sétima pandemia de cólera chegou ao Brasil em 1991. Desta data até o ano 2000, o Ministério da Saúde confirmou 168.286 casos da doença com 2.019 óbitos, sendo o Nordeste a região mais afetada. A partir de 2001, houve uma redução no número de casos de cólera, mas a doença não deverá desaparecer do país em curto espaço de tempo. A ocorrência regular de casos e flutuações cíclicas de maior ou menor gravidade não pode ser descartada, principalmente devido às condições ambientais que favorecem a circulação do agente

etiológico da cólera em várias regiões do país (PEDROSA e XIMENES, 2003). Na Tabela 2, são mostrados os números de casos de cólera no Brasil de 1996 até 2005.

**Tabela 2 – Casos confirmados de cólera no Brasil, por local de transmissão.**

<b>Região</b>	<b>1996</b>	<b>1997</b>	<b>1998</b>	<b>1999</b>	<b>2000</b>	<b>2001</b>	<b>2002</b>	<b>2003</b>	<b>2004</b>	<b>2005</b>	<b>Total</b>
Norte	81	48	17	0	0	0	0	0	0	0	146
Nordeste	936	2996	2728	4279	733	7	0	0	21	5	11705
Sudeste	0	0	0	13	0	0	0	0	0	0	13
Sul	0	0	0	467	0	0	0	0	0	0	467
Centro-Oeste	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Total</b>	<b>1017</b>	<b>3044</b>	<b>2745</b>	<b>4759</b>	<b>733</b>	<b>7</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>21</b>	<b>5</b>	<b>12331</b>

Fonte: Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde, 2006.

A cólera é caracterizada por uma intensa perda de água na forma de diarreia (“água de arroz”), acompanhada de vômitos, chegando a uma perda de 1 litro de líquidos por hora nos casos mais severos. Sem tratamento, a doença mata por choque hipovolêmico 50% dos indivíduos infectados (SACK e cols., 2004). O tempo de incubação da doença varia de 6 a 48 horas e a manifestação dos sintomas ocorre durante um período de dois a sete dias. Os portadores assintomáticos são raros e contribuem pouco para a disseminação da doença (FINKELSTEIN, 1996). Por ser transmitida através da água e de alimentos contaminados, a cólera é uma doença endêmica em áreas sem saneamento básico, sendo característica de países em desenvolvimento.

O tratamento da cólera consiste na reposição de fluidos tão rapidamente quanto eles são perdidos. Quando isto é possível, o índice de mortalidade é baixo. Muitas vezes, porém, a terapia de reidratação é realizada com água contaminada ou não é eficiente, principalmente no caso de pandemias, devido à falta de pessoal especializado para orientar os pacientes (SACK

e cols., 2004). A prevenção da doença consiste em medidas sanitárias simples, como tratamento de água, rede de esgoto e o cozimento de alimentos de alto risco, principalmente frutos do mar. Além das medidas profiláticas, as vacinas orais contra a cólera desenvolvidas recentemente têm se mostrado seguras e imunogênicas, oferecendo 90% de proteção, mas crianças e idosos são menos protegidos pela vacinação. (HOLMGREN e cols., 1989; TAYLOR e cols., 1999; TRACH e cols., 2002).

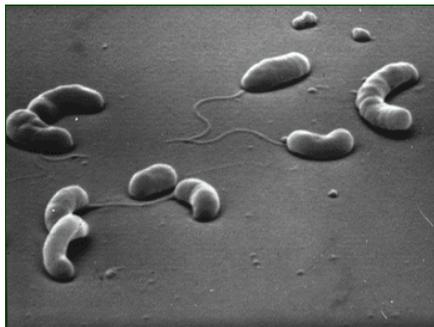
### **1.2. *Vibrio cholerae***

O agente etiológico da cólera foi primeiramente descrito por Filippo Pacini na Itália em 1854. Ao examinar o conteúdo intestinal de cadáveres de vítimas da doença, ele encontrou um grande número de bactérias curvas, que denominou de *Vibrio cholerae*. Na época, a relação etiológica não foi demonstrada de forma convincente (BENTIVOGLIO e PACINI, 1995), o que foi feito posteriormente, em 1883, por Robert Koch, estudando casos de cólera no Egito. A confirmação de que a doença era causada por um organismo em forma de vírgula, que Koch denominou de *Vibrio comma*, levou os pesquisadores a reconhecer o trabalho de Pacini e por isto o nome do organismo foi trocado para *Vibrio cholerae* (KAPER e cols., 1995).

*V. cholerae* (Figura 1) é uma bactéria do gênero *Vibrio*, da família *Vibrionaceae* (KAY e cols., 1994). As 30 espécies incluídas neste gênero são bastonetes Gram-negativos em forma de vírgula, anaeróbios facultativos, móveis, possuindo de 1,4 a 2,6 µm de comprimento (KAY e cols., 1994). *V. cholerae* pode ser encontrado em diversos ecossistemas aquáticos, variando de águas doces a salobras, costeiras ou estuarinas, fazendo parte da microflora autóctone (COLWELL e SPIRA, 1992; COLWELL e HUQ, 1994).

A espécie *V. cholerae* está classificada em mais de 200 sorogrupos, de acordo com as diferenças de reações sorológicas entre os diversos antígenos somáticos O, um dos elementos

que constituem o lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa (KAPER e cols., 1995). A maioria das cepas é composta por bactérias ambientais, que não são patogênicas (FARUQUE e MEKALANOS, 2003). Até 1992, apenas cepas do sorogrupo O1 estavam associadas a epidemias e pandemias de cólera, sendo responsáveis pela ocorrência das sete primeiras pandemias (Tabela 1). Após esta data, um novo sorogrupo patogênico foi identificado na Ásia e classificado como O139 (KAY e cols., 1994), o responsável pela oitava pandemia de cólera (SACK e cols., 2004). Algumas cepas que não pertencem aos sorogrupos O1 e O139 também podem causar infecções esporádicas fracas ou moderadas que se manifestam, principalmente, sob a forma de gastroenterites (MORRIS, 1994).



**Figura 1 – Micrografia eletrônica de varredura de *Vibrio cholerae*.**

Fonte: [http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC420/lecture\\_notes/vibrio/vibrio\\_general.html](http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC420/lecture_notes/vibrio/vibrio_general.html), consultado em dezembro de 2004.

Aparentemente, os humanos são os únicos hospedeiros naturais de *V. cholerae*, mas essas bactérias podem ser encontradas também associadas ao exoesqueleto de quitina dos crustáceos (COLWELL e SPIRA, 1992). Durante a ingestão de água ou alimentos contaminados, a maioria das bactérias morre no estômago devido a sua sensibilidade a pH menores do que 6,0. Aquelas que sobrevivem podem colonizar o intestino delgado sem a invasão das células do hospedeiro (FINKELSTEIN, 1996).

### **1.3. Biotipos do sorogrupo O1 e virulência**

As cepas agrupadas no sorogrupo O1 podem pertencer aos biotipos clássico ou El Tor, de acordo com diversas diferenças fenotípicas, que incluem propriedades bioquímicas, susceptibilidade a bacteriófagos e antibióticos, e capacidade de aglutinação do sangue e de hemólise. Cada biotipo reúne cepas de três diferentes sorotipos ou formas antigênicas O denominadas Ogawa, Inaba e Hikojima, que se diferem pela composição do antígeno O (FINKELSTEIN, 1996).

O biotipo clássico, descrito por Robert Koch, está associado às seis primeiras pandemias de cólera. Já o biotipo El Tor, responsável pela sétima pandemia, foi isolado por Gotschlich, em 1906 na cidade de El Tor, no Egito, de peregrinos provenientes de Meca (SACK e cols., 2004). Atualmente as cepas clássicas são encontradas apenas em Bangladesh, já as cepas El Tor estão espalhadas por todos os continentes, em países da América Latina, Ásia, África, Europa e ainda na Austrália e Estados Unidos (KAY e cols., 1994).

As bactérias das cepas patogênicas do sorogrupo O1 são capazes de penetrar na camada de muco e aderir às células do epitélio intestinal. Esse processo é mediado pela motilidade da bactéria e por enzimas mucinolíticas, neuramidases e proteases (FINKELSTEIN, 1996). A adesão das bactérias do sorogrupo O1 depende, principalmente, do TCP (pilus co-regulado à toxina), que promove o reconhecimento e a adesão das bactérias às células do hospedeiro. O TCP é o principal fator de colonização intestinal em cepas clássicas e El Tor e os genes responsáveis pela sua biossíntese estão localizados em uma ilha de patogenicidade de *Vibrio* designada VPI-1 (THELIN e TAYLOR, 1996).

As cepas El Tor, ao contrário das clássicas, apresentam a habilidade de aglutinar hemácias do sangue devido à hemaglutinina MSHA (hemaglutinina sensível à manose), que também atua como um fator de adesão a superfícies bióticas e abióticas. Entretanto, as cepas

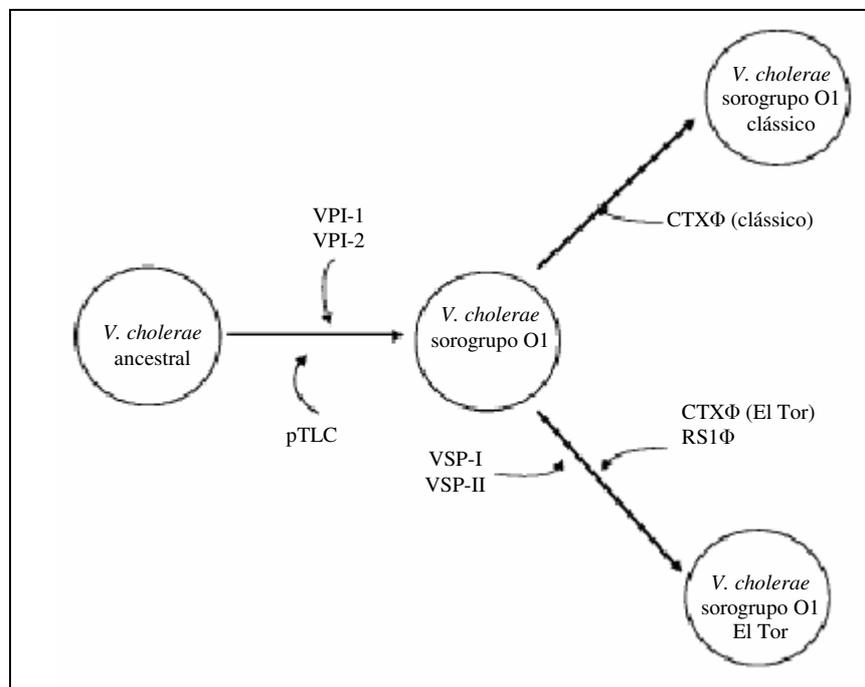
El Tor mutantes em *mshA* não têm sua capacidade de colonização afetada (THELIN e TAYLOR, 1996). Além disso, a repressão da expressão de *mshA* é essencial para a colonização intestinal, uma vez que MSHA pode se ligar a IgA secretada (S-IgA) e promover a aglutinação das bactérias, impedindo a colonização (HSIAO e cols., 2006).

Uma vez aderida às células epiteliais do intestino humano, *V. cholerae* passa a secretar a toxina colérica (CT), um complexo molecular tipo AB<sub>5</sub> (KAPER e cols., 1994). As subunidades de CT são codificadas pelos genes *ctxA/B*, que fazem parte do bacteriófago filamentosso CTXΦ, cujo receptor em *V. cholerae* é o TCP. CT se liga à membrana plasmática das células do epitélio intestinal através da subunidade B, que reconhece o gangliosídeo GM1, presente em praticamente todas as células eucarióticas. A subunidade enzimaticamente ativa da toxina (subunidade A) penetra na célula e promove a transferência de ADP-ribose da nicotinamina adenina dinucleotídeo (NAD) para uma proteína G associada à adenilato ciclase, levando a um aumento nos níveis intracelulares de AMP cíclico. Ocorre, então, nas células entéricas, uma intensa perda de água e eletrólitos que são eliminados sob a forma de vômitos e diarreia, promovendo também a eliminação das bactérias e fazendo-as voltar ao ambiente (BENNISH, 1994). O efeito tóxico dessa enzima é essencial à patogênese, mas sua função na fisiologia da bactéria, quando esta não se encontra no hospedeiro, ainda é desconhecida.

A presença de três regiões de patogenicidade adicionais nos cromossomos de cepas El Tor pode explicar a sua maior distribuição pelo mundo em relação a cepas clássicas. As ilhas de patogenicidade da sétima pandemia I e II (VSP-I e VSP-II) contêm genes cujos produtos estão envolvidos na formação de biofilme (FONG e YILDIZ, 2007). Já o bacteriófago filamentosso RS1Φ é necessário para a propagação de CTXΦ (RASKIN e cols., 2006).

A análise genotípica de cepas de *V. cholerae* sugere que o sorogrupo O1 tenha origem em cepas ambientais ancestrais de *V. cholerae* que adquiriram as ilhas de patogenicidade VPI-

1 e VPI-2 (que inclui genes que codificam uma integrase, proteínas envolvidas no metabolismo do ácido siálico, uma neuroamidase, além de outras proteínas), além do plasmídeo TLC (pTLC, plasmídeo críptico ligado à toxina), que se encontra adjacente à região que codifica CT e pode ter algum papel na biologia do CTX $\Phi$ , facilitando sua aquisição ou replicação (RUBIN e cols., 1998). As bactérias ancestrais do sorogrupo O1 deram origem aos biotipos clássico e El Tor separadamente, através da aquisição de CTX $\Phi$  em ambos os casos e de RS1 $\Phi$  somente pelo biotipo El Tor (O'SHEA e cols., 2004).



**Figura 2 – Mecanismo de evolução dos biotipos clássico e El Tor de *V. cholerae*.** Bactérias ancestrais adquiriram as ilhas de patogenicidade de *Vibrio* (VPI-1 e VPI-2) e o plasmídeo pTLC, dando origem a bactérias do sorogrupo O1. Estas bactérias deram origem a cepas clássicas, a partir da aquisição de CTX $\Phi$ , e às cepas El Tor, a partir da aquisição dos fagos CTX $\Phi$  e RS1 $\Phi$  e das ilhas de patogenicidade da sétima pandemia VSP-I e VSP-II (adaptado de O'Shea e cols., 2004).

#### 1.4. Regulação da expressão dos genes de virulência

Em laboratório, os fatores de virulência TCP e CT são induzidos em condições distintas nos diferentes biotipos do sorogrupo O1. Para as cepas clássicas, maiores níveis de TCP e CT são obtidos quando as bactérias são cultivadas em meio LB (bacto-triptona 1%,

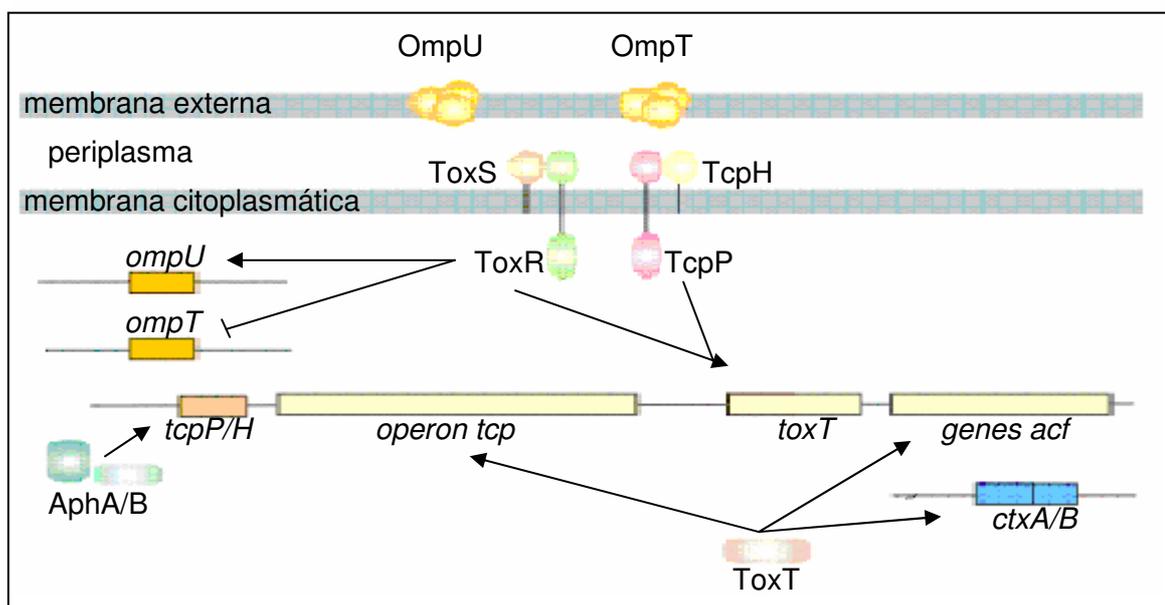
extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%) em pH 6,5 a 30°C (MILLER e cols., 1987). Ao contrário, cepas El Tor não expressam os fatores de virulência em LB. Elas requerem, preferencialmente, cultivo em meio AKI (bacto-peptona 1,5%, extrato de levedura 0,4%, NaCl 0,5%, NaHCO<sub>3</sub> 0,3%) e temperatura de 37°C, inicialmente sem aeração por algumas horas, seguido de forte aeração por mais algumas horas (IWANAGA e cols., 1986). Na ausência de NaHCO<sub>3</sub> no meio AKI, as células são capazes de produzir quantidades menores de CT desde que cultivadas com uma grande área da superfície da cultura exposta (SANCHEZ e cols., 2004). Ambas as condições (LB pH 6,5 a 30°C e AKI) diferem das encontradas pela bactéria no intestino delgado do hospedeiro em relação a pH, temperatura e osmolaridade (KAPER e cols., 1995).

A expressão dos fatores de virulência em *V. cholerae* é regulada *in vitro* por estímulos ambientais tais como pH, temperatura, aminoácidos e fonte de carbono (MILLER e MEKALANOS, 1984). No entanto, os sinais de indução dos fatores de virulência *in vivo* ainda não foram identificados. Sabe-se que a expressão dos fatores de virulência é regulada pelos produtos dos genes *tcpP*, *tcpH*, *toxR*, *toxS* e *toxT* (Figura 3). O operon *tcpP/H* codifica duas proteínas reguladoras transmembranares, TcpP e TcpH, que ativam a transcrição de *toxT* (HASE e MEKALANOS, 1998; KRUKONIS e cols., 2000). A expressão do operon *tcpP/H*, por sua vez, está sob o controle das proteínas AphA e AphB, cuja expressão sugere-se ser induzida por sinais de *quorum-sensing* (KOVACIKOVA e cols., 2004).

A ativação de *toxT* também é dependente das proteínas ToxR e ToxS (MILLER e MEKALANOS, 1984; MILLER e cols., 1989; OSORIO e KLOSE, 2000). ToxT ativa diretamente a expressão de diversos fatores de virulência, entre eles CT, TCP (CHAMPION e cols., 1997; DIRITA e cols., 1991) e fatores de colonização acessórios (codificados pelos genes *acf*). Além de ativar *toxT*, ToxR regula positivamente a expressão da porina de

membrana externa OmpU e regula negativamente a porina OmpT, como mostrado na Figura 3 ((PROVENZANO e KLOSE, 2000).

A expressão de CT pode acontecer de maneira dependente de ToxR, porém independente de ToxT, quando as células são cultivadas na presença de ácidos biliares (HUNG e MEKALANOS, 2005).



**Figura 3 – Representação da regulação da expressão dos genes de virulência em *V. cholerae*.** A produção de CT (codificada pelos genes *ctxA/B*) e TCP é regulada pelas proteínas de membrana interna TcpP/H e ToxR/S dependente e independentemente de ToxT. ToxT ainda regula a expressão de fatores de colonização acessórios, produtos de genes *acf*. As proteínas AphA/B, que parecem ser reguladas por sinais de *quorum-sensing*, participam da modulação do operon *tcpP/H*. As porinas OmpU e OmpT são reguladas de maneira divergente por ToxR. Adaptado de <http://mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/vfs.cgi?Genus=Vibrio&Keyword=Adherence>, consultado em agosto de 2006.

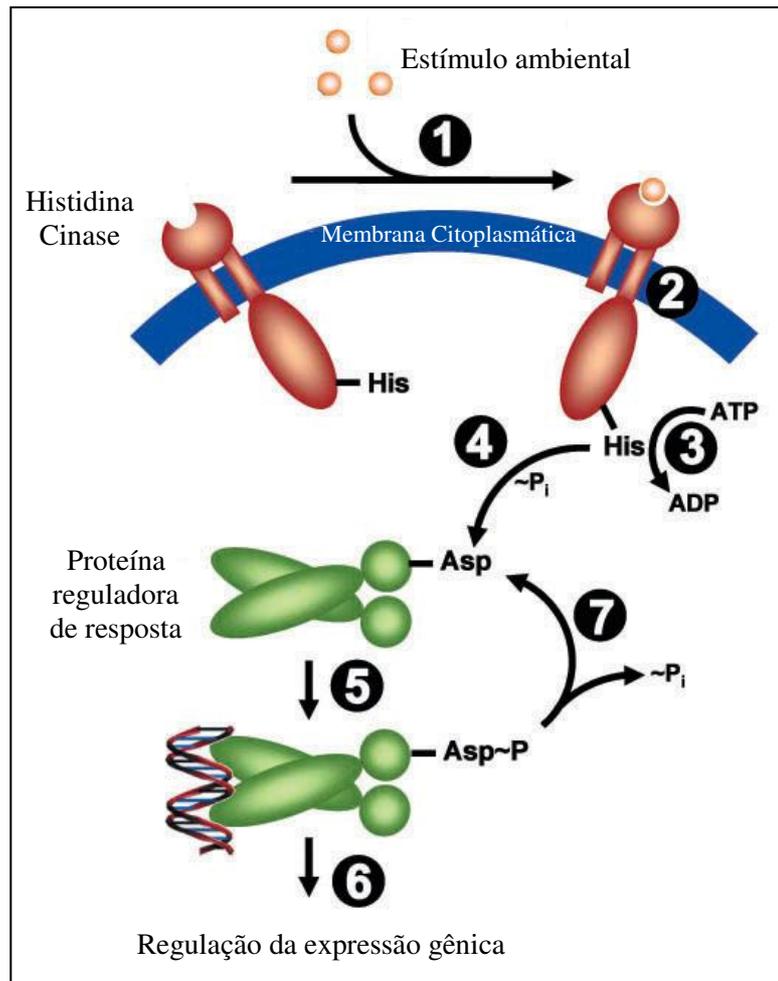
### 1.5. Sistemas de dois componentes

Para sobreviver e se multiplicar em diferentes ambientes, *V. cholerae* e outras bactérias regulam de forma coordenada a expressão de genes envolvidos em respostas adaptativas. As bactérias podem monitorar e responder a uma variedade de estímulos

ambientais através de sistemas constituídos de duas proteínas (sistema de dois componentes – SDC).

Em um SDC típico, a proteína sensora está localizada na membrana citoplasmática e possui três domínios. A porção extracitoplasmática, que capta os estímulos externos, funciona como um sensor. O sinal é transmitido através do domínio transmembranar até ao domínio transmissor, citoplasmático, que possui atividade de histidina cinase. A segunda proteína do sistema (reguladora da resposta) está localizada no citoplasma e possui um domínio amino-terminal receptor, que é fosforilado, por interação com sua proteína cinase sensora cognata na sua forma fosforilada. A região carboxi-terminal se liga ao DNA, regulando a expressão gênica, como pode ser visto na Figura 4 (GROSS e cols., 1989).

Todos os SDCs descritos possuem um mecanismo de transdução de sinal comum, que envolve a auto-fosforilação de um resíduo de histidina do módulo transmissor carboxi-terminal da proteína sensora, em resposta a um estímulo ambiental. O grupamento fosfato é então transferido para um resíduo de aspartato no módulo receptor da proteína reguladora de resposta com a concomitante ativação do seu domínio efetor. Uma vez ativada, a proteína reguladora interage com o DNA, regulando a expressão gênica, como mostrado na Figura 4 (MILLER e cols., 1989).



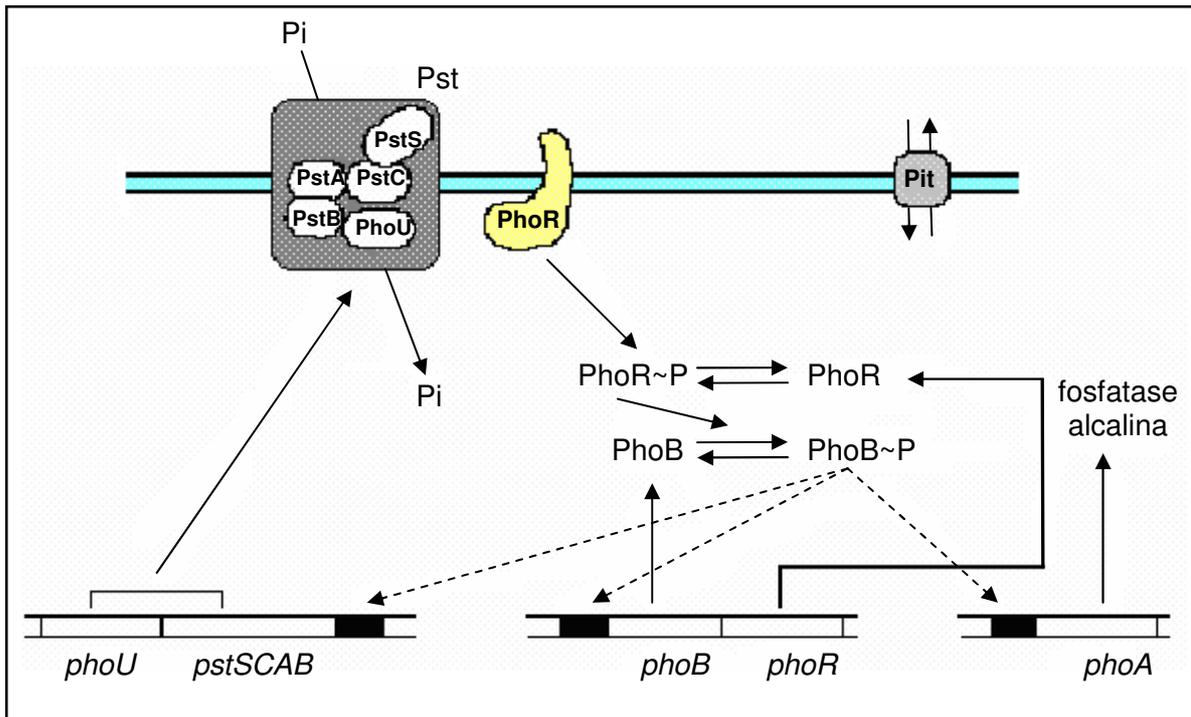
**Figura 4 – Esquema de transdução de sinais por um SDC típico.** Em resposta a um estímulo externo, a proteína sensora auto-fosforila e promove a fosforilação específica da proteína sensora, que interage com o DNA para regular a expressão gênica (adaptado de <http://wwwuser.gwdg.de/~genmibio/mascher/research1.jpg>, consultado em agosto de 2006).

### 1.6. O sistema *PhoB/R* e a resposta à limitação de fósforo

O fósforo é um componente essencial na nutrição bacteriana, fazendo parte de ácidos nucleicos, fosfolipídeos e lipopolissacarídeos, por exemplo. A assimilação de vários componentes fosforilados garante o suprimento de fósforo necessário ao metabolismo bacteriano e consiste de duas etapas: o transporte desses componentes para dentro da célula e a incorporação do fósforo na formação de ATP. A fonte de fósforo mais utilizada pelas bactérias é o fosfato inorgânico ( $P_i$ ; WANNER, 1993). A entrada de  $P_i$  nas células bacterianas ocorre através de dois sistemas de transporte: os sistemas Pit (transporte de fosfato

inorgânico) e Pst (transporte específico de fosfato). Quando Pi está em excesso no meio, ele é transportado para dentro da célula através do sistema de baixa afinidade Pit. Já em condições limitantes, Pi é transportado através do sistema de alta afinidade Pst (ROSENBERG e cols., 1977).

As condições limitantes de Pi modulam a expressão de genes *psi* (induzidos por limitação de Pi), que codificam proteínas envolvidas no transporte e metabolismo de compostos fosforilados (HULETT, 1996; MAKINO e cols., 1994). Em 1985, Makino e cols. descreveram o sistema de dois componentes PhoB/R em *E. coli*, que responde aos níveis extracelulares de fosfato inorgânico. Quando Pi está em excesso (concentrações maiores que 4 mM), o sistema está inibido. Já em condições limitantes de Pi, o sistema PhoB/R é ativado. A diminuição dos níveis de fosfato é “sentida” pela proteína de membrana sensora PhoR, que auto-fosforila e promove a fosforilação específica da reguladora da resposta PhoB (STOCK e cols., 1989). PhoB é constituída por dois domínios distintos: o domínio amino-terminal receptor e o domínio carboxi-terminal que se liga ao DNA. Essa ligação ocorre em regiões específicas conhecidas como caixas *pho*, cuja seqüência consenso em *E. coli* e outras 12 proteobactérias compreende duas repetições diretas de 5´ CTGT(C/A)A(C/T) 3´ separadas por quatro nucleotídeos com alto conteúdo de A e T (MAKINO e cols., 1985; YUAN e cols., 2006). PhoB interage com a subunidade  $\sigma^{70}$  da RNA polimerase e ativa ou reprime a transcrição dos genes do regulon Pho (KUMAR e cols., 1994). O mecanismo de regulação gênica do sistema PhoB/R de *E. coli* e alguns genes do regulon Pho estão ilustrados na Figura 5 (VERSHININA e ZNAMENSKAYA, 2002).



**Figura 5 - O sistema de dois componentes PhoB/R de *E. coli* e a regulação dos membros do regulon Pho.** O sistema Pst é composto pelas proteínas PstA/B/C/S e PhoU. A fosfatase alcalina é a enzima repórter do regulon Pho (adaptado de Van Dien e Keesling, 1998).

Em 1999, von Krüger e cols. descreveram, em *V. cholerae*, um sistema homólogo ao sistema PhoB/R de *E. coli*. A análise da seqüência gênica revelou que, assim como em *E. coli*, os genes *phoB* e *phoR* de *V. cholerae* constituem um operon que é precedido por uma seqüência Shine-Dalgarno (AGG), uma caixa Pribnow e uma seqüência similar a uma caixa *pho* (MAKINO e cols., 1986a). As seqüências de aminoácidos deduzidas para PhoB e PhoR de *V. cholerae* revelam proteínas com o mesmo número de resíduos (279 e 430, respectivamente) e com 72% e 58% de identidade em relação a PhoB e a PhoR de *E. coli*, respectivamente (MAKINO e cols., 1986a; 1986b; VON KRÜGER e cols., 1999).

Análises proteômicas empregando cepas de *V. cholerae* selvagem e mutante em *phoB/R*, cultivadas em meio limitante de  $P_i$ , demonstraram a existência de várias proteínas expressas somente pelas células selvagens, sugerindo que os genes que as codificam sejam regulados direta ou indiretamente por PhoB, e, portanto, membros do regulon Pho. A maioria

destas proteínas tem função transportadora ou de ligação a substratos fosforilados, como por exemplo a fosfatase alcalina, uma enzima periplasmática cuja atividade pode ser facilmente medida. Além disso, algumas proteínas envolvidas na virulência também foram detectadas somente na cepa mutante. Muitas proteínas expressas somente pela cepa mutante também foram identificadas, algumas das quais estão envolvidas na sobrevivência a condições nutricionais desfavoráveis (VON KRÜGER e cols., 2006)

### **1.7. Proteínas de membrana externa**

As proteínas de membrana externa (OMPs) estão diretamente envolvidas na interação de bactérias Gram-negativas com os mais variados ambientes (LIN e cols., 2002; NIKAIDO, 1999). Em *V. cholerae*, as OMPs desempenham papéis importantes na fisiologia bacteriana, contribuindo para a sobrevivência e a adaptação a diferentes ambientes *in vitro* e *in vivo* (REIDL e KLOSE, 2002).

Em *V. cholerae* já foram identificadas oito OMPs principais. OmpS é uma maltoporina induzida pelo crescimento da bactéria na presença de maltose (LANG e PALVA, 1993). OmpA é uma proteína imunogênica que confere resistência a estresses ambientais e é essencial à manutenção da estrutura celular em *E. coli* e em *V. cholerae* (WANG, 2002). OmpV é uma proteína induzida pelo calor e está aparentemente associada à parede celular (SAHU e cols., 1994; STEVENSON e cols., 1985). OmpX é uma proteína regulada por osmolaridade e não possui função conhecida (CHAKRABARTI e cols., 1996). OmpW, assim como OmpX, não é uma porina e, aparentemente, anticorpos anti-OmpW purificada induzem uma proteção moderada no hospedeiro humano contra a infecção por *V. cholerae*. Além disto, análise da transcrição de *ompW* em diversas cepas de *V. cholerae* revelou um aumento em sua expressão em resposta a várias condições de estresse dentro e fora do intestino delgado (JALAJAKUMARI e MANNING, 1990; NANDI e cols., 2005).

OmpU e OmpT, as mais bem caracterizadas entre as OMPs de *V. cholerae*, são porinas com diferentes propriedades eletrofisiológicas (CHAKRABARTI e cols., 1996). Enquanto OmpU é mais permeável a cátions, OmpT possui baixa seletividade iônica. Uma outra porina putativa, filogeneticamente relacionada à OmpT, é codificada pelo gene *vca0972* (banco de dados TIGR CMR).

A expressão de OmpT e OmpU é modulada por ToxR, de maneira independente de TcpP/H e ToxT (Figura 3). ToxR regula a expressão de *ompU* e *ompT* de maneira divergente: enquanto a transcrição de *ompU* é ativada, a de *ompT* é reprimida por ToxR (CHAKRABARTI e cols., 1996; CHAMPION e cols., 1997; CRAWFORD e cols., 1998; MILLER e MEKALANOS, 1988). OmpU, aparentemente, possui um papel na adesão bacteriana (SPERANDIO e cols., 1995), está relacionada à proteção contra peptídeos antimicrobianos e aos sais biliares (MATHUR e WALDOR, 2004) e é essencial para a montagem da resposta de tolerância a ácidos orgânicos (MERRELL e cols., 2001). Apesar disso, mutantes em *ompU* não têm a capacidade de colonização alterada, sugerindo que esta porina não é requerida *in vivo* para a infecção (OSORIO e cols., 2004; PROVENZANO e cols., 2001).

O gene *vca1008* também foi anotado como codificante de uma proteína putativa de membrana externa (banco de dados TIGR CMR). Recentemente, VCA1008 foi caracterizada como uma OMP, cuja expressão é induzida em células cultivadas em meio com baixa concentração de Pi, sugerindo que *vca1008* é um membro do regulon Pho em *V. cholerae* (VON KRÜGER e cols., 2006). Esta proteína possui baixa identidade (26,3%) com a porina PhoE de *E. coli* (PhoE<sup>Ec</sup>; VON KRÜGER e cols., 2006). Apesar disto, VCA1008 foi considerada um homólogo de PhoE<sup>Ec</sup> em *V. cholerae* (PhoE<sup>Vc</sup>) pelo fato de ser uma proteína de membrana externa induzida por deficiência de Pi, assim como PhoE<sup>Ec</sup>. Além disto, a

montante de *vca1008* foi encontrada uma seqüência com características de caixa *pho*, também presente em *E. coli* a montante de *phoE* (VON KRÜGER e cols., 2006).

A análise da habilidade de colonização de mutantes em genes de certas OMPs de *V. cholerae* mostrou que os defectivos em *vca1008* são 40 vezes menos infectivos em camundongos neo-natos do que bactérias selvagens, sugerindo que PhoE<sup>Vc</sup> seja necessária para a infecção. Mutantes-triplos em *vca0972*, *ompT* e *ompU*, entretanto, colonizam o modelo animal com a mesma eficiência da cepa selvagem, uma indicação de que seus produtos não desempenham papéis relevantes no processo da colonização intestinal. A observação de que *vca1008* é expresso durante a infecção intestinal, enfatiza o papel desta OMP na patogênese de *V. cholerae* (OSORIO e cols., 2004).

Várias OMPs desempenham papéis na patogenicidade bacteriana (RAIVIO, 2005). A proteína de membrana externa OmpS2, por exemplo, não tem função conhecida, porém parece ser essencial para a virulência de *Edwardsiella tarda* (RAO e cols., 2003). Esta bactéria causa septicemia em peixes e infecções gastrointestinais em humanos, mas mutantes no gene que codifica OmpS2 têm a sua capacidade de infecção em peixes reduzida, sugerindo um papel para esta proteína no processo, assim como foi observado para a PhoE<sup>Vc</sup> em *V. cholerae* (OSORIO e cols., 2004). Curiosamente, PhoE<sup>Vc</sup> e OmpS2 compartilham certa similaridade de seqüência (39% de similaridade e 24% de identidade).

### **1.8. A bile e os mecanismos de resistência aos sais biliares**

A bile é uma secreção digestiva encontrada no intestino delgado humano em concentrações que variam de 0,2 a 2%. Ela é constituída, principalmente, de ácidos biliares, fosfolípidos e colesterol (Tabela 3), além do pigmento biliverdina (BEGLEY e cols., 2005; GUNN, 2000). A bile funciona como um detergente biológico, emulsificando e solubilizando

lipídeos, desestabilizando a integridade das membranas celulares e possuindo, portanto, atividade antimicrobiana (revisado em BEGLEY e cols., 2005).

Os ácidos biliares representam aproximadamente metade dos compostos orgânicos da bile. Eles são sintetizados no fígado, em um processo que envolve várias enzimas e é iniciado pela quebra da cadeia lateral do colesterol. No intestino humano, os principais ácidos da bile são o deoxicólico, quenodeoxicólico, ursodeoxicólico e glicocólico (BERNSTEIN e cols., 1999). Esses ácidos são moléculas anfipáticas que penetram no citoplasma de bactérias Gram-negativas através dos canais hidrofílicos das porinas (GUNN, 2000; THANASSI e cols., 1997) ou através da membrana externa, quando não possuem carga (PLESIAT e NIKAIDO, 1992).

**Tabela 3 – Composição e propriedades da bile humana**

<b>Componente / Propriedade</b>	
Sódio (mmol/L)	145
Potássio (mmol/L)	4
Cloreto (mmol/L)	90
Ácidos biliares (mmol/L)	40
Colesterol (mmol/L)	3
Fosfolipídeos (mmol/L)	7
Peso seco (mg/mL)	20
Osmolaridade (mOsm/L)	280
pH	7,5 – 8,0

Adaptado de Begley e cols., 2005

Além de desestabilizar a membrana celular, a bile induz danos no DNA (BERNSTEIN e cols., 1999; KANDELL e BERNSTEIN, 1991), ativando enzimas de reparo (BERNSTEIN e cols., 1999), chaperonas moleculares, tais como DnaK e GroESL, além de outras enzimas de

resposta a estresses (BERNSTEIN e cols., 1999; FLAHAUT e cols., 1996a; FLAHAUT e cols., 1996b). As bactérias entéricas respondem à bile alterando a expressão de proteínas envolvidas em sistemas de transdução de sinais, em respostas a estresses ambientais (BERNSTEIN e cols., 1999; FLAHAUT e cols., 1996b; LEVERRIER e cols., 2003; SAVIJOKI e cols., 2005; VAN VELKINBURGH e GUNN, 1999) e ainda induzindo resistência à bile e a detergentes aniônicos (GANZLE e cols., 1999; GUPTA e CHOWDHURY, 1997; KRUKONIS e DIRITA, 2003; PACE e cols., 1997; PROVENZANO e KLOSE, 2000; VAN VELKINBURGH e GUNN, 1999).

É possível que proteínas sensoras de SDCs estejam envolvidas nestes processos através de ligação à componentes da bile, dando início a uma cascata de fosforilação que terminaria na regulação da expressão gênica por proteínas reguladoras de resposta cognatas (BEGLEY e cols., 2005; VAN VELKINBURGH e GUNN, 1999). Há casos de proteínas reguladoras da família AraC que podem se ligar a componentes da bile para ativar a transcrição a partir de certos promotores (GUNN, 2000). A proteína Rob de *E. coli*, por exemplo, interage com os ácidos deoxicólico e quenodeoxicólico ativando a transcrição de genes que codificam bombas de efluxo (ROSENBERG e cols., 2003). Curiosamente, a expressão de Rob em *E. coli* é induzida por limitação de Pi (KAKEDA e cols., 1995), sugerindo uma interação entre os mecanismos de resistência a bile e as vias de aquisição e metabolismo de Pi.

Além de responder diretamente à bile, a célula pode responder aos danos na membrana (CLAVEL e cols., 1996; DIGIUSEPPE e SILHAVY, 2003) e a variações no nível de super enovelamento do DNA causados pelos componentes da bile (BERNSTEIN e cols., 1999). Em muitas bactérias Gram-negativas existem mecanismos de efluxo responsáveis por bombear a bile para fora da célula (GUNN, 2000; THANASSI e cols., 1997). Além disto, estas bactérias apresentam uma tolerância intrínseca à bile conferida pela camada de LPS e

pelas porinas presentes na membrana externa (GUNN, 2000; SNYDER e MCINTOSH, 2000). O LPS funciona como uma barreira de permeabilidade devido ao empacotamento denso de suas cadeias na superfície da célula (NESPER e cols., 2002; SNYDER e MCINTOSH, 2000). O envolvimento das porinas no processo de tolerância, por outro lado, decorre da variabilidade na composição protéica da membrana externa da bactéria devido à flexibilidade da expressão de proteínas ali localizadas em função de alterações ambientais (ACHOUAK e cols., 2001). Assim sendo, em muitos casos, parte da resistência aos sais biliares em bactérias Gram-negativas pode ser atribuída à perda ou à alteração na quantidade de determinadas porinas na presença da bile (POOLE, 2002).

Em *V. cholerae*, dentre os mecanismos de tolerância à bile, já foram descritas bombas de efluxo dependentes e independentes de TolC (BINA e MEKALANOS, 2001; CHATTERJEE e cols., 2004; COLMER e cols., 1998) e proteção via LPS (NESPER e cols., 2002). Além disto, *V. cholerae* pode resistir à bile através da modulação da expressão das porinas na membrana externa (PROVENZANO e cols., 2000). Uma maior incorporação de OmpU na membrana externa de células de *V. cholerae* na presença de bile confere um aumento na resistência, não só a sais biliares, mas também a outros detergentes e antibióticos (PROVENZANO e KLOSE, 2000; PROVENZANO e cols., 2000; WIBBENMEYER e cols., 2002). Esta resistência pode ser explicada pelo fato de OmpU ser mais seletiva a cátions e menos sensível aos sais biliares aniônicos do que OmpT, uma porina de baixa seletividade iônica (DURET e DELCOUR, 2006; SIMONET e cols., 2003).

Devido ao fato de VCA1008 ser a primeira proteína de membrana externa induzida por limitação de Pi descrita em bactérias do gênero *Vibrio* e de que várias evidências sugerem que seja uma porina (VON KRÜGER e cols., 2006) essencial à colonização intestinal (OSORIO e cols., 2004), este trabalho se concentrou na sua caracterização molecular,

regulação de expressão e na análise do seu papel na resistência a sais biliares em cepas de *V. cholerae* O1, biotipos clássico e El Tor.

## **2. Objetivos**

**Objetivos gerais:**

Caracterizar molecularmente a PhoE<sup>Vc</sup> e analisar a regulação da sua expressão e seu papel na resistência a sais biliares em cepas de *V. cholerae* O1, biotipos clássico e El Tor.

**Objetivos específicos:**

1. Caracterização molecular da proteína PhoE<sup>Vc</sup>:
  - 1.1. Estudo da sequência primária da PhoE<sup>Vc</sup> para predição de peptídeo sinal, estruturas secundárias, topologia e localização de resíduos de amino ácidos que possam ser importantes para a sua função
  - 1.2. Determinação experimental da sequência N-terminal da proteína
  - 1.3. Análise das formas moleculares de PhoE<sup>Vc</sup> na célula
2. Análise da regulação da expressão de PhoE<sup>Vc</sup> nas cepas de *V. cholerae* dos biotipos clássico e El Tor
  - 2.1. Avaliação da expressão de proteínas de membrana externa em resposta aos níveis de fosfato inorgânico e deoxicolato de sódio
  - 2.2. Avaliação da atividade do promotor de *vca1008* em resposta ao deoxicolato de sódio
3. Avaliação da sensibilidade aos componentes dos sais biliares de células de *V. cholerae* expressando ou não a PhoE<sup>Vc</sup>

### **3. Material e Métodos**

### 3.1. Cepas bacterianas, plasmídeos, meios de cultura e condições de cultivo

As cepas de *V. cholerae* e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados na Tabela 4.

**Tabela 4 - Cepas bacterianas e plasmídeos utilizados neste trabalho.**

	Descrição	Referência
<b>Cepa</b>		
569BSR	<i>V. cholerae</i> . Cepa clássica Inaba derivada de 569B, Sm <sup>r</sup>	VON KRÜGER e cols., 1999
O395SR	<i>V. cholerae</i> . Cepa clássica Ogawa derivada de O395, Sm <sup>r</sup>	Estoque do laboratório
N16961SR	<i>V. cholerae</i> . Cepa El Tor derivada de N16961, Sm <sup>r</sup>	Estoque do laboratório
WK3	<i>V. cholerae</i> $\Delta phoB/R$ derivada de 569BSR, Sm <sup>r</sup> e Kan <sup>r</sup>	VON KRÜGER e cols., 1999
WK8	<i>V. cholerae</i> $\Delta phoB/R$ derivada de O395SR, Sm <sup>r</sup> e Kan <sup>r</sup>	Estoque do laboratório
WK10	<i>V. cholerae</i> $\Delta phoB/R$ derivada de N16961SR, Sm <sup>r</sup> e Kan <sup>r</sup>	Estoque do laboratório
DH5 $\alpha$	<i>E. coli</i> . F- <i>endA1 hsdR17</i> ( $r_k^-$ , $m_k^+$ ) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA</i> (Nal <sup>r</sup> ) <i>relA1</i> $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 $\Phi 80dlacZ\Delta M15$	RALEIGH e cols., 1988

---

**Plasmídeo**

pIC552	vetor plasmideal contendo <i>lacZ</i> precedido por um sítio múltiplo de clonagem para a inserção de uma região promotora, Ap <sup>R</sup>	MACIAN e cols., 1994
pICPphoB	pIC552 contendo a região promotora de <i>phoBR</i> (234 pb a montante do códon de início da transcrição putativo) fundido ao <i>lacZ</i>	FARACHE, 2003
pICPphoE	pIC552 contendo a região promotora de <i>vca1008</i> (231 pb a montante do códon de início da transcrição putativo) fundido ao <i>lacZ</i>	Este trabalho

---

Sm<sup>r</sup> – resistente à estreptomicina, Kan<sup>r</sup> – resistente à canamicina, Amp<sup>r</sup> – resistente à ampicilina.

Os meios de cultura utilizados para crescimento celular de rotina foram LB (bactotripton 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 1%) ou LB-ágar 1,5% (SAMBROOK e cols., 1989). Para o cultivo em concentrações conhecidas de fosfato inorgânico, foi utilizado um meio contendo uma mistura de sais tamponada com Tris-HCl pH 7,4, suplementado com glicose 0,04% e tiamina 0,01M (meio TG; ECHOLS e cols., 1961). O meio TG foi complementado com KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6,5mM ou 65μM para crescimento em alta (HP) ou baixa (LP) concentração de fosfato, respectivamente. Aos meios, foram adicionados deoxicolato de sódio (DOC) 0,2%, estreptomicina (Sm) 100μg/mL, canamicina (Kan) 50μg/mL e ampicilina (Amp) 100μg/mL, sempre que necessário. As bactérias foram cultivadas a 37°C e a uma agitação de 200rpm para culturas líquidas, tanto em LB quanto em TG.

### **3.2. Análise da expressão de proteínas de membrana externa**

#### **3.2.1. Extração das OMPs ligadas à parede celular (OMPs-Pg)**

As bactérias foram cultivadas inicialmente em LB até atingirem a fase exponencial de crescimento ( $DO_{600nm}$  de aproximadamente 0,5). Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação (12000g por 10 minutos a 15°C), ressuspensas em TGHP ou TGLP (no mesmo volume da cultura em LB) e cultivadas por mais 6 ou 14 horas, na ausência ou na presença de DOC 0,2%, a 37°C e agitação de 200rpm.

A extração das OMPs-Pg foi realizada tanto em bactérias cultivadas em LB na fase exponencial quanto em TG na fase estacionária, segundo o método de Rosenbusch (1974), com modificações. Um volume de células correspondente a uma  $DO_{600nm}$  de 10 (volume de células  $\times DO_{600nm} = 10$ ) foi centrifugado e o sedimento celular ressuspenso em 500 $\mu$ L de Tris-HCl 20mM pH 7,5 com PMSF 5mM. As células foram rompidas por sonicação (quatro ciclos de 20 pulsos de 1 segundo, em banho de gelo) e ao lisado foram adicionados 5 $\mu$ L de RNase 10mg/mL e 3 $\mu$ L de DNase 1mg/mL. O material foi incubado por 20 minutos a 37°C, e ultracentrifugado, em seguida, a 66000g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 500 $\mu$ L de PBS (NaCl 140mM; KCl 2,7mM;  $Na_2HPO_4$  8mM;  $KH_2PO_4$  1,5mM, pH 7,4) com N-lauril sarcosinato de sódio 1% e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente, seguido de ultracentrifugação a 66000g por 60 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 500 $\mu$ L de Tris-HCl 20mM pH 7,5 com SDS 2% e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. O material foi ultracentrifugado a 66000g por 60 minutos a 15°C, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuspenso em 500 $\mu$ L de solução de azida (NaCl 0,4M; EDTA 5mM; azida de sódio 5mM e  $\beta$ -mercaptoetanol 0,05%) e incubado por 2 horas à temperatura ambiente. O

material foi ultracentrifugado a 66000g por 2 horas a 15°C. As amostras foram preparadas para SDS-PAGE como descrito no item 3.2.3.

### **3.2.2. Purificação parcial da PhoE<sup>Vc</sup>**

As células de *V. cholerae* 569BSR foram inicialmente cultivadas em LB até a fase exponencial e então transferidas para TGLP, como descrito em 3.2.1. As proteínas de membrana externa foram extraídas a partir de 1L de cultura ( $DO_{600nm}$  total de aproximadamente 1500), basicamente também como descrito no item 3.2.1, com as modificações abaixo. Após a ultracentrifugação da suspensão no PBS contendo N-lauril sarcosinato de sódio 1%, o sedimento foi ressuspensão em 5mL de Tris-HCl 20mM pH 7,5 com SDS 1% e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. O material foi ultracentrifugado a 66000g por 1 hora a 15°C, o sedimento foi ressuspensão em 5mL de solução de azida (item 3.2.1) contendo octil-POE 0,5% e incubado por 30 minutos a 30°C. O material foi ultracentrifugado por 66000g por 1 hora a 15°C e o sobrenadante foi recolhido (GARAVITO e ROSENBUSCH, 1986). As amostras foram preparadas para SDS-PAGE como descrito no item 3.2.3.

### **3.2.3. Preparação das amostras para SDS-PAGE**

As amostras das proteínas de membrana e da PhoE<sup>Vc</sup> parcialmente purificada foram analisadas por SDS-PAGE, como descrito no item 3.2.5.1.

Nas preparações das OMPs-Pg, o sedimento da ultracentrifugação após incubação em solução de azida foi ressuspensão em 10 µL de PBS e 10 µL de tampão de amostra 2X (Tris-HCl 0,1M pH 6,8, glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%, DTT 122mM). As amostras foram incubadas a 100°C por 5 minutos, seguidos de centrifugação a 16000 g por 10 minutos.

Para análise da estabilidade das PhoE<sup>Vc</sup> parcialmente purificada em diferentes temperaturas, alíquotas das amostras foram misturadas com tampão de amostra não desnaturante 2X (glicerol 20%, azul de bromofenol 0,2%, Tris-HCl 0,1M pH 6,8) e incubadas por 10 minutos a diferentes temperaturas (25°C, 50°C, 75°C ou 100°C). As amostras foram centrifugadas a 16000g por 10 minutos.

### **3.2.4. Preparação das amostras de membrana para eletroforese bidimensional (2D)**

As bactérias foram pré-cultivadas em LB e cultivadas em TGLP por 14 horas, como descrito em 3.2.1. A cultura foi então centrifugada (12000g por 10 minutos a 15°C) e o sedimento celular foi ressuscitado em solução de lise (uréia 8M, Triton X-100 2%, anfólitos *Pharmalyte* GE Healthcare pH 3-10 0,5%) e incubado por 2 horas à temperatura ambiente, sem agitação. O lisado foi submetido a uma ultracentrifugação a 66000g por 90 minutos a 4°C. O sedimento contendo as proteínas insolúveis em solução de lise foi ressuscitado em solução de reidratação (uréia 8M, ASB-14 1%, anfólitos *Pharmalyte* GE Healthcare pH 3-10 0,5%, tiouréia 2M, DTT 50mM), seguido de uma nova ultracentrifugação a 66000g por 60 minutos a 4°C. As proteínas solúveis foram submetidas à análise por eletroforese 2D.

### **3.2.5. Análise eletroforética de proteínas**

#### **3.2.5.1. SDS-PAGE**

As amostras protéicas foram analisadas em gel de poliacrilamida (9 x 5,5cm) a 11% com SDS, em tampão Tris-glicina SDS (glicina 38mM; Tris-HCl 5mM; SDS 0,1%) a 100 V (LAEMMLI, 1970). Os géis foram corados com azul de Coomassie (etanol 30%; ácido acético glacial 0,5%; azul de Coomassie R-250 0,2%) durante a noite e descorados com uma solução de etanol 30% (SAMBROOK e cols., 1989) ou revelados com nitrato de prata (Wanda von Krüger, comunicação pessoal). Para este último método de coloração, o gel foi

incubado por 30 segundos no forno de microondas na potência máxima em solução de fixação (etanol 40%, ácido acético 10%), seguido de agitação por cinco minutos à temperatura ambiente. A seguir, a solução de fixação foi descartada e gel foi incubado como descrito anteriormente em etanol 30%. O etanol foi descartado e o gel mergulhado em solução de sensibilização (etanol 30%, acetato de sódio anidro 6,8%, tiosulfato de sódio pentahidratado 0,2%, glutaraldeído 0,125%) e incubado como descrito anteriormente. A solução de fixação foi descartada e o gel foi lavado duas vezes com água, permanecendo 30 segundos no forno de microondas na potência máxima e dois minutos sob agitação por cinco minutos à temperatura ambiente em cada lavagem. O gel foi então colocado em nitrato de prata 0,25% por 30 segundos no forno de microondas na potência máxima, seguido de agitação por cinco minutos à temperatura ambiente. A solução de prata foi descartada e o gel lavado em água por 40 segundos, com agitação à temperatura ambiente. As bandas foram reveladas em carbonato de sódio anidro 2,5%. A revelação foi interrompida pela adição de EDTA 0,05M pH 8,0.

Os géis foram digitalizados no *Image Scanner* (GE Healthcare) e as análises de densitometria e determinação de massa molecular das bandas protéicas foram realizadas utilizando o programa *ImageMaster 2D Platinum v5.0* (GE Healthcare).

### 3.2.5.2. Eletroforese 2D

Para a primeira dimensão (focalização isoeétrica), 150µg de cada amostra foram focalizadas em tiras de poliacrilamida de 7cm com intervalo de pH de 4 a 7 (*Immobiline DryStrip*, GE Healthcare). As tiras foram reidratadas com as amostras em 125µL de solução de reidratação (item 3.2.3) durante a noite, à temperatura ambiente. A focalização isoeétrica foi realizada no aparelho *Multiphor II* (GE Healthcare), a 20°C, a uma corrente de 0,5mA por tira e uma potência de 5W, adotando o seguinte programa: fase 1 - 200V por 1 minuto,

totalizando 1Vh; fase 2 - a voltagem foi aumentada gradativamente até 3500V em 90 minutos, totalizando 2,8kVh; fase 3 - 3500V por 90 minutos, totalizando 5,2kVh.

Para a segunda dimensão (SDS-PAGE), as tiras focalizadas foram tratadas por 15 minutos com solução de equilíbrio (Tris-HCl 50mM pH 8,8, uréia 6M, glicerol 30%, SDS 2%, azul de bromofenol 0,002%) contendo DTT 10mg/mL e por mais 15 minutos com solução de equilíbrio contendo iodoacetamida 25mg/mL. As tiras foram então posicionadas sobre um gel de um gradiente de poliacrilamida de 12 a 14% (ExcelGel™ Gradient XL 12-14, GE Healthcare). A segunda dimensão foi realizada no aparelho Multiphor II (GE Healthcare), utilizando o seguinte programa: fase 1 - 200V ou uma corrente de 20mA por 40 minutos; fase 2 - 800V ou 40mA por 40 minutos. A potência máxima foi ajustada para 20 e 40W, nas fases 1 e 2, respectivamente.

O gel foi corado com azul de Coomassie (etanol 30%; ácido acético glacial 0,5%; azul de Coomassie R-250 0,2%) durante a noite e descorado com uma solução de etanol 30% (SAMBROOK e cols., 1989). O gel foi digitalizado no *Image Scanner* (GE Healthcare) e para determinação do pI das proteínas utilizou-se o programa ImageMaster 2D Platinum v5.0 (GE Healthcare).

### **3.2.6. Identificação das proteínas por espectrometria de massas**

#### **3.2.6.1. Preparação das amostras**

As proteínas de interesse foram digeridas *in gel* com tripsina de acordo com Shevchenko e cols. (1996). Resumidamente, os fragmentos de gel contendo as proteínas de interesse foram lavados individualmente com 1mL de acetonitrila 50% em NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 25mM pH 8,0. Aqueles provenientes de géis corados com prata foram tratados previamente com 50µL de tiosulfato de sódio 100mM e 50µL de ferricianeto de potássio 30mM por 40

minutos. Após a lavagem com acetonitrila 50% em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25mM pH 8,0, as proteínas procedentes de géis unidimensionais (SDS-PAGE) foram tratados com solução de DTT 10mM em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25mM, por 1 hora a 56°C e, então, com iodoacetamida 55mM em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25mM por 45 minutos à temperatura ambiente no escuro. Após serem lavados novamente com 1mL de acetonitrila 50% em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25mM pH 8,0, os fragmentos foram transferidos para 25µL de acetonitrila 100%, secos em concentrador à vácuo (Speed-Vac) por 20 minutos e incubados em 25µL de tripsina (Porcine Tripsin, Promega) 10mg/mL em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25mM pH 8,0 a 37°C durante a noite. Os peptídeos trípticos foram extraídos por incubação de cada fragmento de gel com 100 µL de uma solução contendo acetonitrila 50% e ácido trifluoracético 5%, por 1 hora, à temperatura ambiente. As soluções das lavagens foram transferidas para um tubo limpo e o volume foi reduzido em concentrador à vácuo (Speed-Vac) por alguns minutos até aproximadamente 5µL.

### **3.2.6.2. Obtenção dos PMFs (*peptide mass fingerprinting*) por espectrometria de massas**

Para análise por espectrometria de massas, 1µL de cada amostra contendo os peptídeos trípticos foi misturado com 1µL de matriz ácido 4-hidroxicinâmico ( $\alpha$ -ciano, SIGMA). O espectro dos peptídeos de cada proteína (*peptide mass fingerprinting*, PMF) foi adquirido no espectrômetro de massas Voyager DE PRO Biospectrometry Workstation (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) e analisados com o programa Data Explorer v5.1. Os peptídeos derivados da autólise da tripsina de massas 842,5 e 2211,1Da e as misturas de calibração 1 ou 2 (Sequazyme Peptide Mass Standard kit, PerSeptive Biosystems, Foster City, CA, USA) foram usados como calibração interna e externa, respectivamente. Os mapas peptídicos (PMFs) foram obtidos no modo refletido com alta resolução para massas entre 800 e 4000Da.

As massas moleculares dos picos monoisotópicos foram obtidas e os PMFs foram analisados contra um banco de dados incluindo *V. cholerae* e outras espécies do gênero *Vibrio*, utilizando a interface Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/4.0.8/html/msfit.htm>). Os critérios para identificação foram: uma pontuação (MOWSE Score) de pelo menos 1000, no mínimo quatro peptídeos identificados, uma cobertura de ao menos 20% da proteína, e apenas uma proteína atendendo aos critérios mencionados.

### 3.2.6.3. Seqüenciamento dos peptídeos

Algumas proteínas resolvidas por eletroforese 2D não identificadas pelo seu PMF (ítem 3.2.5.2) tiveram alguns de seus peptídeos seqüenciados no aparelho 4700 Proteomics Analyzer TOF/TOF (Applied Biosystems). Os íons foram fragmentados utilizando N<sub>2</sub> como gás de colisão a uma pressão de  $2.8 \times 10^{-6}$  torr. Os espectros dos íons obtidos foram usados para determinar a seqüência dos peptídeos considerando a diferença de massa entre os íons “y” e “b” (JOHNSON e cols., 1988).

Os PMFs e os espectros dos íons obtidos foram usados em buscas contra um banco de dados incluindo *V. cholerae* e outras espécies do gênero *Vibrio*, utilizando a interface Mascot (<http://www.matrixscience.com>). Os critérios para identificação somente pelos PMFs foram: uma pontuação de pelo menos 55 ( $p < 0,05$ ), no mínimo quatro peptídeos identificados, uma cobertura de ao menos 25% da proteína, e apenas uma proteína atendendo aos critérios mencionados. Quando foi possível seqüenciar peptídeos com mais de cinco resíduos, não foi necessário atender a todos os critérios mencionados.

### 3.2.7. Seqüenciamento do N-terminal

As OMPs de células de *V. cholerae* 569BSR e N16961SR expressas em TGLP foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de PVDF (ImmobilonP, Millipore). A transferência foi realizada durante 60 minutos a uma corrente entre 0,11 a 0,13A

em temperatura ambiente usando CAPS 10mM pH 11 em metanol 10% como tampão de transferência (SAMBROOK e cols., 1989). A membrana foi corada com Ponceau-S (MATSUDAIRA, 1987) e a proteína de interesse foi excisada da membrana. Sua porção N-terminal foi seqüenciada por degradação de Edman (HEIRWEGH e EDMAN, 1957) no Seqüenciador Shimadzu PSQ-23A do Laboratório de Toxinologia, Fiocruz, RJ, em colaboração com os Drs. Jonas Perales e Ana Gisele Neves Ferreira.

### ***3.3. Ferramentas computacionais***

#### **3.3.1. Busca por homologia e alinhamentos**

As buscas por similaridade foram realizadas utilizando o banco de dados não redundante (nr) do NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) usando Blastp (ALTSCHUL e cols., 1990), mantendo os parâmetros padrões. Os alinhamentos múltiplos foram gerados com o programa ClustalW (THOMPSON e cols., 1994) do EBI (European Bioinformatics Institute - <http://www.ebi.ac.uk/clustalw>).

#### **3.3.2. Caracterização funcional da PhoE<sup>Vc</sup>**

Para avaliar famílias de proteínas foi utilizado o banco de dados Pfam (BATEMAN e cols., 2004). A análise de domínios conservados foi realizada usando o banco de dados COG (TATUSOV e cols., 1997; TATUSOV e cols., 2001). A presença de peptídeos sinais e a posição do sítio de clivagem foram avaliadas com SignalP Server v3.0 (BENDTSEN e cols., 2004). As hélices transmembranares foram preditas com TMHMM Server v2.0 (KROGH e cols., 2001; SONNHAMMER e cols., 1998), enquanto que a localização subcelular da proteína foi avaliada com PSORTb v2.0.4 (GARDY e cols., 2005).

### 3.3.3. Predição da estrutura secundária

A predição de estrutura de barril  $\beta$ , a localização das fitas transmembranares e a topologia das alças foram determinadas com PRED-TMBB (BAGOS e cols., 2004). A representação gráfica das estruturas de barril  $\beta$  foi feita com TMRPres2D.

### 3.3.4. Busca por caixas *pho* putativas

As buscas de caixas *pho* putativas foram realizadas em seqüências de 200 pb a montante do sítio de início da tradução putativo dos genes de interesse, utilizando os programas MEME/MAST (BAILEY e GRIBSKOV, 1998) e BLASTn (ALTSCHUL e cols., 1990) baseados no modelo Hidden Markoff. As regiões selecionadas foram comparadas a domínios conservados de caixas *pho* observados em bactérias, levedura e plantas: repetições diretas de GTCAT, GCCAT, TCCAT ou GCCAAT separadas por uma região rica em A/T (HIRANI e cols., 2001; MAKINO e cols., 1985; OGAWA e cols., 1995). As caixas *pho* putativas selecionadas pelo MAST possuem 16 nucleotídeos e foram definidas quando  $p < 0,0001$ . As buscas pelo BLASTn (ALTSCHUL e cols., 1990) foram realizadas variando a distância entre os dois domínios repetidos das caixas *pho*.

### 3.4. Avaliação da ativação transcricional dos promotores de *vca1008* e *phoB/R*

Para avaliar a atividade do promotor de *vca1008* nas cepas de *V. cholerae*, em resposta às condições de cultivo, utilizou-se a técnica de fusão de operons. A região do promotor putativo de *vca1008* foi clonada a montante do *lacZ* no plasmídeo pIC552 e sua atividade transcricional foi avaliada pela atividade do repórter,  $\beta$ -galactosidase, em células cultivadas em meio deficiente de Pi, com ou sem DOC 0,2%. Para analisar a atividade do regulon Pho nestas culturas, atividades da fosfatase alcalina (PhoA), o repórter natural do regulon Pho, foram dosadas. Além disto, as atividades transcricionais do promotor *phoB/R* foram avaliadas

pela atividade de  $\beta$ -galactosidase, em células de *V. cholerae* transformadas com pICPphoB (Tabela 4) e submetidas às condições de cultivo em TGLP, com ou sem DOC 0,2%. O procedimento experimental necessário a esta análise segue-se abaixo.

Os resultados foram avaliados estatisticamente utilizando o programa GraphPad Prism v4.00. Cada conjunto de dados foi analisado utilizando o teste t pareado com um intervalo de confiança de 95%.

### **3.4.1. Métodos genéticos**

#### **3.4.1.1. Preparação de DNA cromossomal**

Amostras de DNAs cromossomais das cepas de *V. cholerae* 569BSR, O395SR e N16961SR foram extraídas de acordo com (AUSUBEL e cols., 1995), com modificações. As células foram cultivadas em 3mL de LB, a 37°C durante a noite, coletadas por centrifugação (12000g por 10 minutos à temperatura ambiente) e os sedimentos celulares foram ressuspensos em 560 $\mu$ L de TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM pH 8,0). A cada suspensão foram adicionados 30 $\mu$ L de SDS 10%, 6 $\mu$ L de proteinase K 20mg/mL e 4 $\mu$ L de RNase 10mg/mL. As amostras foram incubadas a 65°C por 20 minutos e o DNA foi extraído três vezes com fenol:clorofórmio (1:1) equilibrado em Tris-HCl 1M pH 8,0. Para remoção de resíduos de fenol fez-se uma extração com clorofórmio:álcool isoamílico (24:1). O DNA foi precipitado com 0,6 volumes de isopropanol e 10% de acetato de sódio 3M pH 5,2, e incubado por 10 minutos à temperatura ambiente com leve agitação. O DNA foi coletado por centrifugação a 16000g por 5 minutos, lavado com 500 $\mu$ L de etanol 70% e ressuspensão em 100 $\mu$ L de TE.

#### **3.4.1.2. Amplificação do promotor putativo de *vca1008***

Os DNAs cromossomais serviram como moldes, em reações de PCR, para amplificar um fragmento de 241pb localizado a montante do códon de início da tradução putativo de

*vca1008*. Foram desenhados os pares de iniciadores PhoE<sup>Vc</sup>-*Nco*I (5'CATAGCCATGGATTTCCTCATCACTCACC3') e PhoE<sup>Vc</sup>-*Xho*I (5'ACGTCTCGAGTATTAGTTTGATTGGGC3'), com base na seqüência de *vca1008* da cepa El Tor N16961 (banco de dados TIGR CMR). Para as reações de PCR (termociclador PTC-200; MJ Research) usou-se a Taq DNA Polimerase (Promega) e o programa: (a) 1 minuto a 94°C, (b) 1 minuto a 56°C, (c) 30 segundos a 72°C, repetindo o ciclo "a-b-c" 30 vezes, seguido por uma última etapa de extensão a 72°C por 10 minutos.

Os produtos das PCRs foram analisados em gel de ágarose a 1,5% em TAE 1X (Tris – acetato 40mM, EDTA 1mM (SAMBROOK e cols., 1989) e purificados do gel com o *kit* de purificação Wizard SV (Promega) de acordo com as instruções do fabricante.

#### **3.4.1.3. Construção da fusão transcricional (promotor de *vca1008-lacZ*)**

Os fragmentos purificados foram digeridos com as enzimas de restrição *Nco* I e *Xho* I (Promega) e ligados (T4 DNA ligase, Promega) ao plasmídeo pIC552 (MACIAN e cols., 1994) digerido com as mesmas enzimas. A mistura de ligação foi utilizada para transformar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  e as colônias contendo os plasmídeos foram selecionadas por plaqueamento em LB-ágar com ampicilina 100 $\mu$ g/mL e incubação a 37°C. Alguns colônias de *E. coli* DH5 $\alpha$  resistentes à ampicilina foram inoculadas em meio de cultura líquido (LB/Amp) e, na fase estacionária do crescimento foram utilizadas para mini-preparações de plasmídeos. Dentre os plasmídeos obtidos, os recombinantes de interesse foram selecionados por análise por eletroforese em gel de ágarose 1% em TAE 1X e PCRs utilizando as condições descritas anteriormente. Os procedimentos de digestão enzimática, ligação, preparo de células competentes e seleção dos plasmídeos recombinantes de interesse foram realizados de acordo com Sambrook e cols. (1989). As fusões pIC552-promotor *vca1008-lacZ* (denominadas pICPphoE) foram confirmadas por seqüenciamento usando o *kit* ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reactions (Applied Biosystems) na

Plataforma Genômica - Sequenciamento de DNA / PDTIS-FIOCRUZ. Os plasmídeos recombinantes pICPphoB e pICPphoE (Tabela 4) foram usados para transformar cepas de *V. cholerae* competentes (VON KRÜGER e cols., 1999).

### **3.4.2. Atividades transcricionais dos promotores de *vca1008* e *phoBR*: dosagem da atividade da $\beta$ -galactosidase**

As bactérias contendo os plasmídeos pICPphoB ou pICPphoE foram cultivadas sob agitação de 200rpm a 37°C em meio LB até uma  $DO_{600nm}$  de aproximadamente 0,5. Dez mL de cada cultura foram centrifugados e o sedimento celular correspondente foi ressuspensão em 10mL de TGLP sem ou com DOC 0,2% e as culturas mantidas sob agitação de 200rpm a 37°C por 22 horas. As atividades transcricionais dos promotores de *vca1008* e *phoB/R* nas células das cepas de *V. cholerae* foram avaliadas após 6, 14 e 22 horas de incubação, pela atividade da  $\beta$ -galactosidase (MILLER, 1972), como descrito a seguir. Um volume de cultura de 300 ou 600 $\mu$ L (somente no caso de culturas em TGLP/DOC 0,2%, para o tempo de 6 horas) foi centrifugado (16000g por 10 minutos à temperatura ambiente) e o sedimento celular foi ressuspensão em 500 $\mu$ L de PBS. As células foram rompidas por sonicação (quatro ciclos de 20 pulsos de 1 segundo, em banho de gelo) e os lisados foram centrifugados a 25000g por 15 minutos a 4°C. As atividades da  $\beta$ -galactosidase foram dosadas em 50 $\mu$ L de cada sobrenadante ao qual foram adicionados 50 $\mu$ L de tampão Z (KCl 10mM; MgSO<sub>4</sub> 1mM;  $\beta$ -mercaptoetanol 50mM; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 40mM; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 60mM) e 20 $\mu$ L de o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (ONPG) 4mg/mL em tampão Z. A reação foi incubada a 30°C por 15 minutos e interrompida pela adição de 50 $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. A  $DO_{420nm}$  foi determinada em um leitor de microplacas (Versamax tunable - Molecular Devices) e a atividade específica da  $\beta$ -galactosidase foi determinada considerando a massa de proteínas no volume do sobrenadante analisado (LOWRY e cols., 1951), através do cálculo  $DO_{420nm} \times 1000 \times (\text{quantidade de proteínas em } \mu\text{g})^{-1}$ .

### 3.4.3. Atividade do regulon Pho: dosagem da atividade da fosfatase alcalina (PhoA)

As atividades da PhoA foram determinadas como descrito (VON KRÜGER e cols., 1999) nas mesmas culturas utilizadas para medida de  $\beta$ -galactosidase para avaliar as atividades transcricionais do promotores de *vca1008* e *phoB/R* (item 3.5.2). Resumidamente, 150 ou 300 $\mu$ L (somente para culturas em TGLP/DOC 0,2% após 6 horas de incubação) de cultura foram centrifugados e os sedimentos celulares ressuspensos individualmente em 250 $\mu$ L de Tris-HCl 1M pH 8,0. A cada tubo, foram adicionados 5 $\mu$ L de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) 0,5% e a mistura era agitada vigorosamente por 1 minuto e incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, para permeabilizar as células e permitir a liberação da PhoA que é periplasmática em *V. cholerae* (ROY e cols., 1982). A seguir, foram adicionados 200 $\mu$ L de Tris-HCl 1M pH 8,0 e 50 $\mu$ L de PNPP (p-nitrofenil-fosfato) 6mg/mL, cuja hidrólise pela PhoA gera um produto amarelo. A mistura foi incubada por 15 minutos a 37°C. A reação foi interrompida pela adição de 50 $\mu$ L de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M. A DO<sub>420nm</sub> de cada reação foi medida e a atividade da PhoA foi determinada considerando a concentração de proteínas determinada pelo método de Lowry (LOWRY e cols., 1951), através do cálculo  $DO_{420nm} \times 1000 \times (\text{quantidade de proteínas por } \mu\text{L da cultura de bactérias})^{-1}$ .

### 3.4.4. Dosagem de proteínas

A quantidade de proteínas nos lisados utilizados para dosagem da atividade da  $\beta$ -galactosidase foi determinada pelo método de Lowry (LOWRY e cols., 1951). À cada amostra (50 e 100 $\mu$ L de cada lisado) foi adicionado SDS 0,5% em quantidade suficiente para 200 $\mu$ L, seguida pela adição de 1mL de uma mistura 100:1:1 das soluções A (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% em NaOH 0,1N), B1 (CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 1%) e B2 (tartarato de sódio e potássio 27mg/mL), respectivamente. Após incubação de 10 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 100 $\mu$ L de reagente de Folin 1N (Merck) à cada reação. Após 30 minutos, a DO<sub>750nm</sub> foi

medida em espectrofotômetro (Pharmacia Biotech Ultrospec<sup>®</sup> 3000). A quantidade de proteínas presente em cada amostra foi determinada a partir de uma curva padrão realizada com 20, 40 e 80 µg de albumina bovina sérica (BSA).

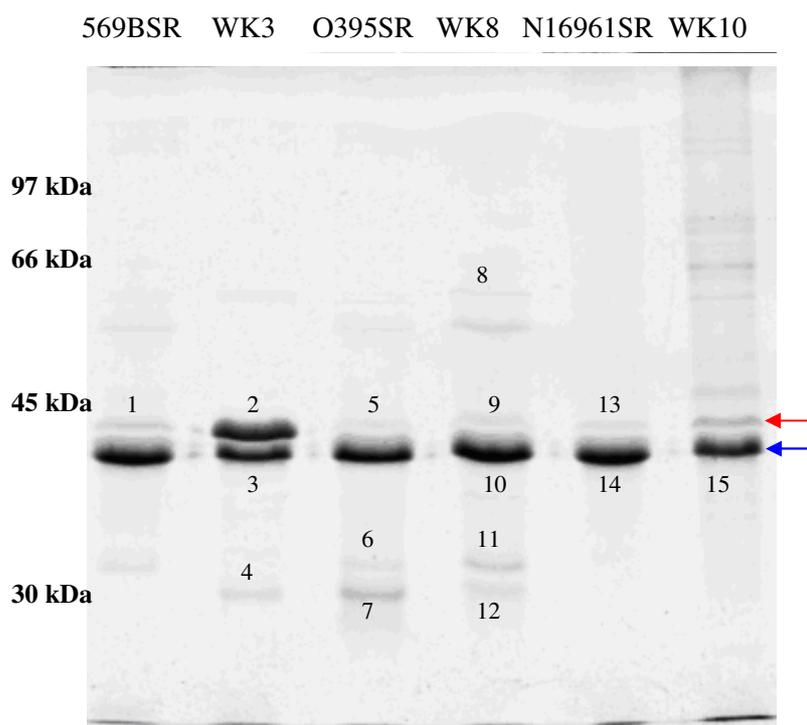
### ***3.5. Teste de sobrevivência bacteriana ao DOC***

As bactérias foram pré-cultivadas em meio LB até uma  $DO_{600nm}$  de aproximadamente 0,5. Cinco mL de cultura foram centrifugados e o sedimento celular foi ressuspensão no mesmo volume de TGHP ou TGLP, como descrito em 3.2.1. Após 12 (para O395SR e WK8SR em TGHP) ou 14 horas (para as demais condições), 550µL de cultura foram centrifugados e ressuspensos no mesmo volume de TGHP ou TGLP. Uma alíquota de 50µL foi submetida a diluições seriadas e plaqueamentos em LB-ágar 1,5% (item 3.1) para determinar o número de unidades formadoras de colônias em 1mL de cultura (tempo 0, 100%). Aos 500µL restantes, foi adicionado DOC para a concentração final de 0,2%. Após 1, 2 e 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, com agitação ocasional, alíquotas de 50µL foram submetidas a diluições e plaqueamento, como acima, para determinação da porcentagem de bactérias vivas na cultura após cada tempo de incubação em DOC 0,2%, em relação ao tempo 0 (100%).

## **4. Resultados**

#### 4.1. Expressão de proteínas de membrana externa associadas à parede celular (OMPs-Pg) por cepas de *V. cholerae* selvagens e mutantes ( $\Delta$ phoB/R) cultivadas em meio rico

Em todas as abordagens experimentais utilizadas neste trabalho, as bactérias foram previamente cultivadas em meio rico LB, até atingirem uma  $DO_{600nm}$  de aproximadamente 0,5 (fase exponencial intermediária) antes de serem transferidas para os meios definidos TGHP ou TGLP. Assim, foi feita inicialmente uma análise das OMPs-Pg expressas em LB, na fase exponencial, pelas cepas selvagens de *V. cholerae* biotipos clássico 569BSR e O395SR e El Tor N16961SR e por seus mutantes isogênicos  $\Delta$ phoB/R WK3, WK8 e WK10, respectivamente (Figura 6 e Tabela 5).



**Figura 6 - Perfis eletroforéticos das OMPs-Pg de cepas de *V. cholerae* em LB na fase exponencial intermediária (SDS-PAGE 11% corado com azul de Coomassie).** As cepas WK3, WK8 e WK10 são mutantes  $\Delta$ phoB/R isogênicos de 569BSR, O395SR e N16961SR, respectivamente. As proteínas numeradas foram identificadas por espectrometria de massas (Tabela 5). As setas indicam a posição das porinas OmpU (azul) e OmpT (vermelho).

**Tabela 5 - Proteínas (referentes ao gel da Figura 6) identificadas por MS e MS/MS.**

Banda	Proteína	Gene codificante <sup>a</sup>	Pontuação <sup>b</sup>	Cobertura (%) <sup>c</sup>	Peptídeos identificados <sup>d</sup>
1	OmpT	<i>vc1854</i>	105	21	12
2	OmpT	<i>vc1854</i>	252	48	19
3	OmpU	<i>vc0633</i>	259	32	14
4	OmpV	<i>vc1318</i>	79	19	5
5	OmpT	<i>vc1854</i>	111	23	11
6	OmpU “truncada”	<i>vc0633</i>	77	35	7
7	OmpV	<i>vc1318</i>	193	55	14
8	Receptor de vitamina B12	<i>vc0156</i>	119	18	11
9	OmpT	<i>vc1854</i>	116	40	16
10	OmpU	<i>vc0633</i>	242	42	16
11	OmpU “truncada”	<i>vc0633</i>	118	44	15
12	OmpV	<i>vc1318</i>	147	46	11
13	OmpT	<i>vc1854</i>	210	38	18
14	OmpU	<i>vc0633</i>	604	56	23
15	OmpU	<i>vc0633</i>	294	53	23

Os valores de pontuação, cobertura e peptídeos identificados referem-se somente ao MS.

<sup>a</sup> Gene que codifica a proteína na cepa N16961, cujo genoma está completamente sequenciado

<sup>b</sup> Valor de probabilidade baseado na pontuação MOWSE

<sup>c</sup> Percentual da proteína coberto pelos peptídeos identificados

<sup>d</sup> Número de peptídeos dos PMFs identificados na proteína

Nestas condições de cultura (meio LB e fase exponencial), as bactérias não têm o regulon Pho ativado, ou seja, a atividade da fosfatase alcalina, o repórter natural deste regulon, não é detectada (VERSHININA e ZNAMENSKAYA, 2002). Apesar disso, foram observadas diferenças entre as OMPs-Pg expressas pelas bactérias selvagens e seus respectivos mutantes  $\Delta phoB/R$  (Figura 6). Na Tabela 6 é mostrada a quantidade de cada OMP-Pg por amostra (totalizando 100% por amostra).

**Tabela 6 – Quantidade percentual das OMPs-Pg expressas pelas cepas de *V. cholerae* em LB na fase exponencial**

Cepa	569BR	WK3	O395SR	WK8	N16961SR	WK10
<b>Proteína</b>						
OmpT	6%	53%	4%	6%	5%	-
OmpU	90%	44%	87%	82%	94%	79%
OmpU “truncada”	-	-	2%	3%	-	-
OmpV	-	3%	5%	2%	-	-
Outras OMPs	4%	-	2%	7%	-	21%

A cepa 569BSR apresentou OmpU como OMP-Pg majoritária (cerca de 90%, Figura 6) e seu mutante isogênico WK3 apresentou quantidades equivalentes de OmpT e OmpU na membrana externa (aproximadamente 44 e 53%, respectivamente – bandas 2 e 3 da Figura 6). Além disso, outras OMPs menos abundantes foram detectadas diferencialmente nas células destas cepas em LB, tal como a proteína OmpV detectada apenas em WK3.

De modo semelhante, as cepas O395SR e WK8 também apresentaram OmpU como OMP-Pg a mais expressa, mas diferiram, principalmente, no perfil das OMPs-Pg menos abundantes. Uma destas OMPs-Pg foi identificada por MS como uma forma de OmpU de massa molecular menor, sugerindo uma degradação proteolítica ou uma isoforma com função desconhecida (bandas 6 e 11, Figura 6). OmpV (bandas 7 e 12, Figura 6) foi aparentemente mais expressa pela cepa O395SR (5%, contra 2% em WK3). A expressão de OmpV em condições consideradas atípicas, uma vez que esta proteína em *V. cholerae* é induzida pelo calor (SAHU e cols., 1994; STEVENSON e cols., 1985), sugere que ela possa ter outras funções na fisiologia da célula.

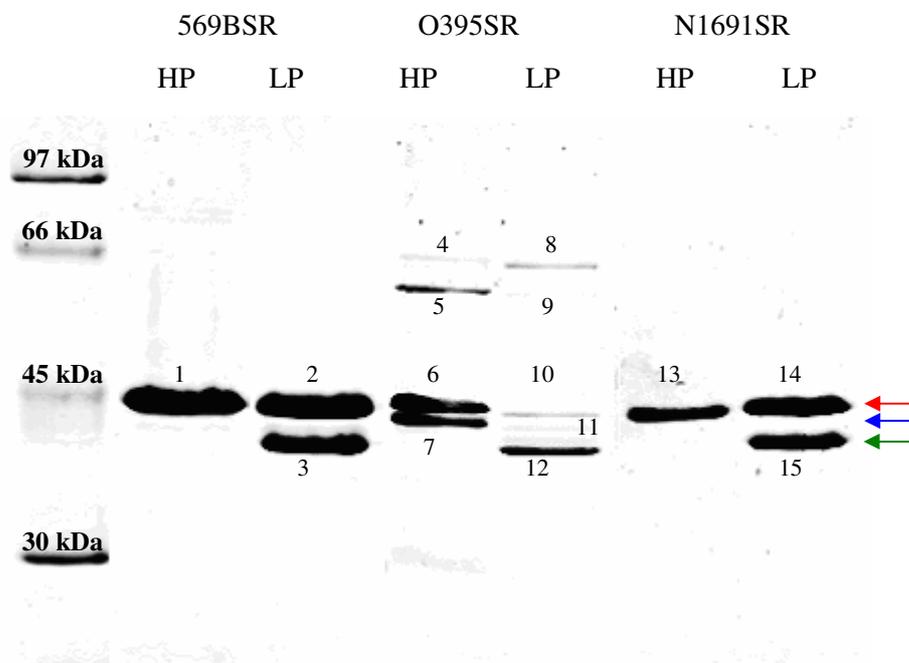
Entre a cepa El Tor N16961SR e seu o mutante  $\Delta phoB/R$  WK10 também parece haver diferenças na expressão das OMPs-Pg em células cultivadas em LB, durante a fase exponencial. A OmpU (bandas 14 e 15, Figura 6) é majoritária em ambas as cepas, porém a cepa WK10 apresentou um rastro de proteínas de massa molecular entre 60 e 100 kDa que podem ser citoplasmáticas e, por isso, para a quantificação das bandas por densitometria, estas proteínas não foram consideradas. Vale ressaltar que estas contaminações apareceram em todas as preparações de membrana externa de WK10 (Figuras 6 e 8), sugerindo um problema específico desta cepa.

Além de serem distintos entre si, os perfis das OMPs-Pg expressos pelas cepas selvagens 569BSR, O395SR e N16961SR, em LB na fase exponencial, também diferiram dos seus respectivos mutantes WK3, WK8 e WK10. Em todas as cepas, excetuando WK3, OmpU parece ser a majoritária na condição analisada (Figura 6, Tabela 6). As cepas clássicas 569BSR e O395SR, diferentemente da El Tor N16961SR, apresentaram adicionalmente OMPs-Pg menos abundantes (Figura 6, Tabela 6).

Quanto aos perfis de OMPs-Pg das cepas selvagens versus mutantes  $\Delta phoB/R$ , a maior diferença observada foi a expressão relativamente alta da OmpT por WK3 em relação à cepa parental 569BSR (Figura 6, Tabela 6).

#### 4.2. Expressão de OMPs-Pg por cepas de *V. cholerae* selvagens e mutantes ( $\Delta phoB/R$ ) cultivadas em meio definido na abundância (TGHP) e escassez (TGLP) de Pi

A análise eletroforética das OMPs-Pg também foi realizada em cepas de *V. cholerae* selvagens e mutantes  $\Delta phoB/R$  após a sua transferência do meio rico LB para os meios definidos TGHP e TGLP. Ao atingirem a fase exponencial em LB, as células foram transferidas para TGHP e TGLP e mantidas por 14 horas a 37°C, atingindo assim a fase estacionária. As OMPs-Pg foram extraídas e analisadas por SDS-PAGE (Figuras 7 e 8). As identificações das proteínas de interesse foram realizadas por MS (Tabelas 7 e 9).



**Figura 7 – Perfis eletroforéticos das OMPs-Pg de cepas de *V. cholerae* selvagens em TG (SDS-PAGE 11% corado com azul de Coomassie).** As bactérias foram cultivadas por 14 horas em TGHP ou TGLP. As proteínas numeradas foram identificadas por espectrometria de massas (Tabela 7). As setas indicam a posição das porinas OmpU (azul), OmpT (vermelho) e PhoE<sup>Vc</sup> (verde).

**Tabela 7 – Proteínas (referentes ao gel da Figura 7) identificadas por MS.**

<b>Banda</b>	<b>Proteína</b>	<b>Gene codificante<sup>a</sup></b>	<b>Pontuação MOWSE</b>	<b>Cobertura (%)<sup>b</sup></b>	<b># peptídeos identificados<sup>c</sup></b>
1	OmpT	<i>vc1854</i>	9,24E+06	45	13
2	OmpT	<i>vc1854</i>	9,25E+06	45	13
3	PhoE <sup>Vc</sup>	<i>vca1008</i>	9873	61	14
4	Proteína relacionada à hemolisina	<i>vc1888</i>	1,12E+04	17	8
5	Receptor de vitamina B12	<i>vc0156</i>	1,20E+08	49	21
6	OmpT	<i>vc1854</i>	1,32E+05	48	10
7	OmpU	<i>vc0633</i>	3,03E+07	56	13
8	Proteína relacionada à hemolisina	<i>vc1888</i>	3,44E+07	29	13
9	Receptor de vitamina B12	<i>vc0156</i>	1,28E+05	22	10
10	OmpT	<i>vc1854</i>	5,40E+06	48	13
11	OmpU	<i>vc0633</i>	3611	27	6
12	PhoE <sup>Vc</sup>	<i>vca1008</i>	9,42E+05	44	12
13	OmpT	<i>vc1854</i>	1254	23	5
14	OmpT	<i>vc1854</i>	1648	25	6
15	PhoE <sup>Vc</sup>	<i>vca1008</i>	1043	38	11

<sup>a</sup> Gene que codifica a proteína na cepa N16961, cujo genoma está completamente sequenciado

<sup>b</sup> Percentual da proteína coberto pelos peptídeos identificados

<sup>c</sup> Número de peptídeos dos PMFs identificados na proteína

A comparação entre os perfis das OMPs-Pg expressas pelas cepas selvagens em LB (Figura 6, Tabela 6) e TGHP (Figura 7, Tabela 8) mostra que a passagem das células do meio rico (LB) para o meio definido (TGHP) causou uma alteração quantitativa e qualitativa das OMPs-Pg.

**Tabela 8 – Quantidade percentual das OMPs-Pg expressas pelas cepas selvagens de *V. cholerae* em meio definido TGHP ou TGLP**

Proteína	569BR		O395SR		N16961SR	
	TGHP	TGLP	TGHP	TGLP	TGHP	TGLP
Proteína relacionada à hemolisina			4%	17%		
Receptor de vitamina B12			16%	12%		
OmpT	96%	65%	43%	13%	96%	57%
OmpU			37%	5%		
PhoE <sup>Vc</sup>		35%		54%		43%
Outras OMPs	4%				4%	

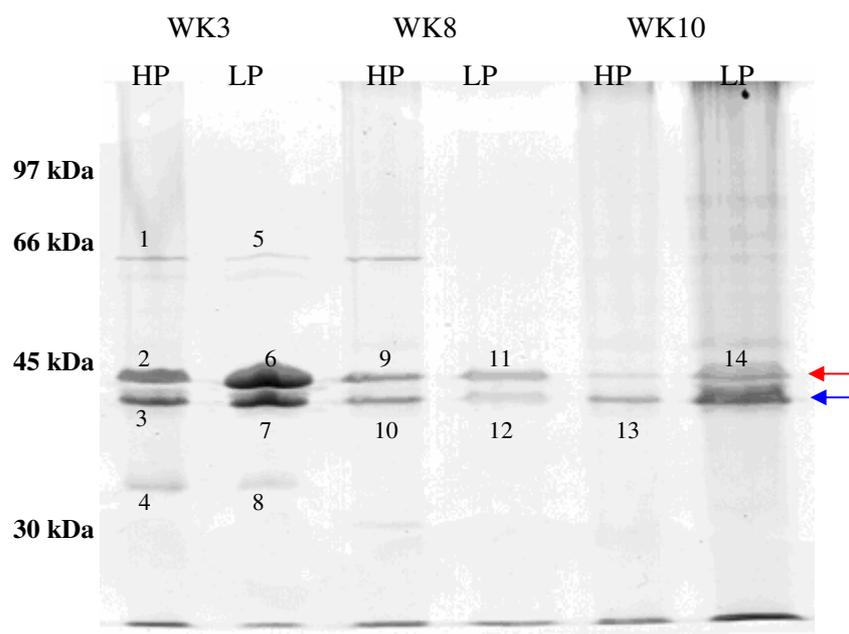
Em LB, a principal OMP-Pg da cepa 569BSR foi a OmpU (cerca de 90%; Figura 6). Em TGHP, a quantidade de OmpU foi reduzida, sendo acompanhada por um expressivo aumento de OmpT (banda 1, Figura 7). Uma alteração semelhante foi observada para a cepa El Tor N16961SR (banda 14 das Figuras 6 e 7). A outra cepa clássica analisada, O395SR, comportou-se de modo distinto. Em meio rico, OmpU era a OMP-Pg majoritária (Figura 6), mas, em TGHP, O395SR apresentou quantidades equivalentes de OmpU e OmpT na membrana (bandas 6 e 7, Figura 7). Esta cepa também expressou duas OMPs-Pg menos

abundantes em TGHP: uma proteína relacionada à hemolisina e o receptor de vitamina B12 (bandas 4 e 5, Figura 7).

Quando os perfis das OMPs-Pg das três cepas em TGHP e TGLP foram comparados, verificou-se que a redução de Pi no meio de cultivo causou uma profunda alteração no padrão das OMPs-Pg. As três cepas apresentaram, em TGLP, uma OMP-Pg não expressa nas condições anteriores (LB e TGHP) identificada como produto do gene *vca1008* (bandas 3, 12 e 15, Figura 7), a PhoE<sup>Vc</sup>.

Assim como o observado em TGHP, a expressão de OMPs-Pg pelas três cepas em TGLP também foi distinta (Figura 7, Tabela 8). Neste meio, as cepas 569BSR e N16961SR apresentaram um comportamento semelhante. Ambas expressaram, além de PhoE<sup>Vc</sup>, OmpT (bandas 2 e 14, Figura 7). A cepa O395SR, nas mesmas condições, apresentou majoritariamente PhoE<sup>Vc</sup> e apenas traços de OmpT e OmpU (bandas 10 e 11, Figura 7). Duas outras proteínas menos abundantes também foram identificadas na O395SR: uma proteína relacionada à hemolisina e o receptor da vitamina B12 (bandas 8 e 9, Figura 7).

A análise das OMPs expressas pelas cepas mutantes  $\Delta phoB/R$  em TGHP e TGLP por 14 horas (Figura 8, Tabela 9) revelou que, ao contrário das cepas selvagens, os mutantes não apresentaram PhoE<sup>Vc</sup> na membrana em TGLP, como já havia sido observado para WK3 (VON KRÜGER e cols., 1999; VON KRÜGER e cols., 2006).



**Figura 8 – Perfis eletroforéticos das OMPs-Pg de cepas de *V. cholerae* mutantes  $\Delta phoB/R$  cultivadas em TG (SDS-PAGE 11% corado com azul de Coomassie).** As bactérias foram cultivadas por 14 horas em TGHP ou TGLP. As proteínas numeradas foram identificadas por espectrometria de massas (Tabela 7). As setas indicam a posição das porinas OmpU (azul) e OmpT (vermelho).

Os perfis das OMPs-Pg dos mutantes  $\Delta phoB/R$  (WK3, WK8 e WK10) cultivados em TGHP e TGLP (Figura 8, Tabela 10) também apresentaram diferenças em relação ao que foi observado em LB (Figura 6, Tabela 6). A cepa WK3 foi a única que manteve um perfil semelhante nas três condições analisadas, ou seja, quantidades similares de OmpU e OmpT na membrana em cada condição (LB, TGHP e TGLP). Além disso, em TGHP e TGLP, diferentemente do que foi visto em LB, WK3 apresentou outras OMPs-Pg menos abundantes.

A cepa WK8, por outro lado, após ser transferida do meio rico LB para TGHP ou TGLP, passou a apresentar na membrana externa quantidades maiores de OmpT, o que foi acompanhado por uma queda relativa de OmpU na membrana externa.

**Tabela 9 - Proteínas (referentes ao gel da Figura 8) identificadas por MS.**

Banda	Proteína	Gene codificante <sup>a</sup>	Pontuação MOWSE	Cobertura (%) <sup>b</sup>	# peptídeos identificados <sup>c</sup>
1	Receptor de vitamina B12	<i>vc0156</i>	7,73E+6	24	9
2	OmpT	<i>vc1854</i>	60424	31	6
3	OmpU	<i>vc0633</i>	1,95E+9	60	16
4	OmpU “truncada”	<i>vc0633</i>	7,54E+7	51	12
5	Receptor de vitamina B12	<i>vc0156</i>	24931	20	8
6	OmpT	<i>vc1854</i>	3,31E+8	54	15
7	OmpU	<i>vc0633</i>	286615	40	12
8	OmpU “truncada”	<i>vc0633</i>	2,09E+6	37	11
9	OmpT	<i>vc1854</i>	1,29E+8	46	13
10	OmpU	<i>vc0633</i>	2,71E+7	48	11
11	OmpT	<i>vc1854</i>	1,29E+8	46	13
12	OmpU	<i>vc0633</i>	2,05E+8	54	13
13	OmpU	<i>vc0633</i>	1,38E+6	43	10
14	OmpS	<i>vca1028</i>	2,13E+7	33	11

<sup>a</sup> Gene que codifica a proteína na cepa N16961, cujo genoma está completamente seqüenciado

<sup>b</sup> Percentual da proteína coberto pelos peptídeos identificados

<sup>c</sup> Número de peptídeos dos PMFs identificados na proteína

No caso da cepa WK10, em TGHP também houve um aumento na incorporação de OmpT na membrana, em relação ao LB. Em TGLP, porém, uma OMP até então não detectada em nenhuma das condições analisadas foi identificada como OmpS (banda 14, Figura 8). A análise por eletroforese 2D de preparações de membrana externa mostrou que OmpS migra

muito próxima a OmpT, com pequenas diferenças de massa molecular e pI; além disto permitiu detectá-la também nas cepas O395SR e N16961SR em TGLP (Figura 15). Portanto, é possível que a expressão de OmpS tenha impedido a detecção de OmpT nesta condição. A expressão de OmpS, uma maltoporina induzida pelo crescimento da bactéria na presença de maltose (LANG e PALVA, 1993) em TGLP é intrigante e requer mais investigação. Assim como observado em LB, em TGLP a cepa WK10 também apresentou um rastro, provavelmente uma contaminação com proteínas citoplasmáticas. Para a quantificação das bandas por densitometria (Tabela 10), no caso de WK10 em TGLP, somente foram consideradas as bandas correspondentes a OmpU e OmpS.

**Tabela 10 – Quantidade percentual das OMPs-Pg expressas por cada cepa de *V. cholerae* mutante  $\Delta phoB/R$  em meio definido TGHP e TGLP**

Proteína	WK3		WK8		WK10	
	TGHP	TGLP	TGHP	TGLP	TGHP	TGLP
Receptor de vitamina B12	3%	2%				
OmpS						35%
OmpT	48%	58%	42%	65%	21%	?
OmpU	35%	36%	35%	34%	78%	65%
OmpU “truncada”	7%	3%				
Outras OMPs	7%		23%			

### 4.3. Caracterização da PhoE<sup>Vc</sup> da cepa de *V. cholerae* El Tor N16961

Em trabalhos anteriores foi mostrado que a proteína PhoE<sup>Vc</sup>, produto do gene *vca1008*, é expressa pela cepa clássica 569BSR de *V. cholerae* O1, mas não pelo seu mutante isogênico WK3 ( $\Delta$ *phoBR*), quando cultivados em condições limitantes de Pi, indicando uma expressão dependente de PhoB/R (VON KRÜGER e cols., 1999; VON KRÜGER e cols., 2006). Neste trabalho, estes dados foram confirmados e é mostrado pela primeira vez que a PhoE<sup>Vc</sup> é expressa pelas cepas de *V. cholerae* O395SR (clássica) e N16961SR (El Tor), também em TGLP e com a participação de PhoB/R, já que seus respectivos mutantes  $\Delta$ *phoB/R* WK8 e WK10 não produzem PhoE<sup>Vc</sup> sob estas condições (Figura 8).

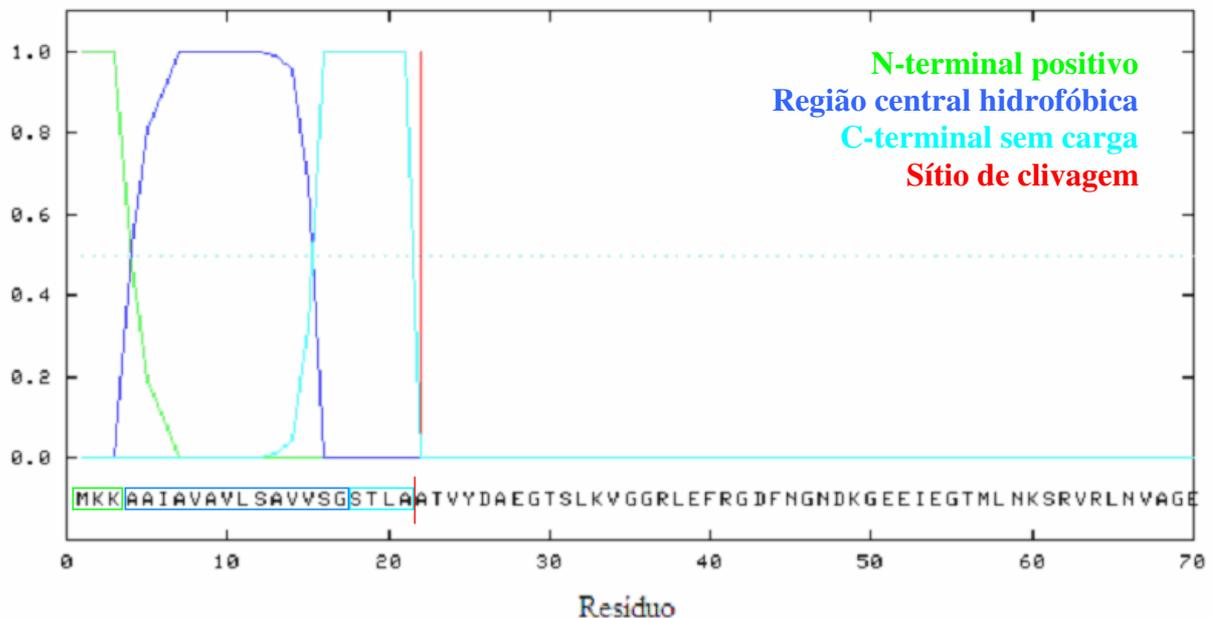
A PhoE<sup>Vc</sup> da cepa 569BSR já havia sido descrita como uma OMP ligada a componentes da parede celular, ou seja, uma OMP-Pg (VON KRÜGER e cols., 1999; VON KRÜGER e cols., 2006). Dados deste trabalho mostraram que o produto de *vca1008* induzido nas cepas O395SR e N16961SR por limitação de Pi é também uma OMP-Pg (Figura 7).

A PhoE<sup>Vc</sup> possui similaridade com a PhoE<sup>Ec</sup> (VON KRÜGER e cols., 2006) e é uma proteína ortóloga a OmpU (OSORIO e cols., 2004), o que sugere que PhoE<sup>Vc</sup> seja uma porina. Para fazer predições sobre características da PhoE<sup>Vc</sup> (topologia, similaridades estrutural e funcional, presença de resíduos de aminoácidos com envolvimento funcional), foi realizada uma análise computacional com a sequência de aminoácidos da cepa N16961, depositada no banco de dados TIGR CMR.

A localização celular da PhoE<sup>Vc</sup> na membrana externa da cepa El Tor N16961 foi confirmada pelo programa PSORTb v2.04 (GARDY e cols., 2005), corroborando os dados obtidos experimentalmente (Figura 7).

O programa SignalP 3.0 (BENDTSEN e cols., 2004) foi aplicado a sequência de aminoácidos do produto de *vca1008*, indicando a sequência de 21 aminoácidos

MKKAAIYAVAVLSAVVSGSTLA como um peptídeo sinal de bactérias Gram-negativas (Figura 9), devido a suas características, ou seja, uma região N-terminal carregada positivamente, uma região central hidrofóbica e uma região C-terminal não carregada (PAETZEL e cols., 2002). Este peptídeo sinal tem alta similaridade (90,5%) com o da PhoE<sup>Ec</sup>, apesar de que as formas maduras das duas proteínas não apresentam uma similaridade tão alta (40%). Ambos os peptídeos são gerados a partir de clivagens entre os resíduos 21 e 22, sugerindo uma via comum de clivagem e exportação dessas duas proteínas. A clivagem do peptídeo sinal em PhoE<sup>Ec</sup> ocorre através da ação de uma peptidase do tipo I e a secreção da proteína através da via geral de secreção (sistema Sec; (PAETZEL e cols., 2002). É possível que a PhoE<sup>Vc</sup> seja processada e secretada via mecanismos semelhantes, uma vez que ambos os sistemas de clivagem e secreção já foram identificados em *V. cholerae* (MARSH e TAYLOR, 1998; SANDKVIST e cols., 1997).



**Figura 9 – Predição da sequência sinal do produto de *vca1008* (PhoE<sup>Vc</sup>) de N16961 utilizando o programa SignalP 3.0 (BENDTSEN e cols., 2004).**

A análise funcional da PhoE<sup>Vc</sup> por comparação com proteínas no banco de dados COG classificou esta proteína como uma porina (COG 3203), enquanto a busca no banco dados

Pfam incluiu a PhoE<sup>Vc</sup> na superfamília de proteínas de membrana externa com estrutura de barril  $\beta$  (Clan MBB), além de sugerir que ela pode atuar como um filtro molecular para compostos hidrofílicos (domínio Porin\_1).

O programa PSI-Blast foi então utilizado para detectar relações filogenéticas com a PhoE<sup>Vc</sup>. Este programa constrói um consenso a partir do alinhamento das regiões conservadas encontradas na proteína em estudo e em similares e, a partir deste consenso, realiza uma busca no banco de dados por proteínas com maior similaridade (ALTSCHUL e cols., 1997). Esta análise mostrou que a PhoE<sup>Vc</sup> possui similaridade com porinas putativas de outras espécies do gênero *Vibrio* e com muitas fosfoporinas, incluindo PhoE<sup>Ec</sup>, de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, apresentadas na Tabela 11 em ordem alfabética.

A busca por similaridade utilizando Blast (Blastp contra o banco de dados nr), por outro lado, confirmou, entre as proteínas com maior similaridade à PhoE<sup>Vc</sup>, diversas porinas classificadas como OmpU em bactérias como *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio fischeri*, *Photobacterium sp.*, *Listonella anguillarum*, *Vibrio angustum*, *Vibrio cholerae*, entre outras.

As seqüências de aminoácidos destas proteínas (banco de dados TIGR CMR) foram submetidas a algumas das análises computacionais usadas para fazer predições sobre as características moleculares da PhoE<sup>Vc</sup> (SignalP 3.0 PSORTb v2.04) e forneceram resultados semelhantes (resultados não mostrados). Curiosamente, uma busca computacional com o programa MEME/MAST (BAILEY e GRIBSKOV, 1998) em uma seqüência de 200 pb a montante dos genes codificantes destas OMPs (banco de dados TIGR CMR) revelou a existência de caixas *pho* putativas (Tabela 12), sugerindo que estes genes podem ser regulados por níveis de Pi via PhoB/R.

**Tabela 11 – Proteínas similares a PhoE<sup>Vc</sup> determinadas pelo programa PSI-Blast.**

<b>Proteína</b>	<b>Organismo</b>	<b>Função</b>
C2383	<i>Escherichia coli</i> O6	Proteína de membrana externa
OmpF	<i>Serratia marcescens</i>	Porina, transporte de moléculas hidrofílicas de baixo peso
OmpK36	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Proteína de membrana externa
OmpK36	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Porina tipo OmpC
OmpS2	<i>Edwardsiella tarda</i>	Proteína de membrana externa
PhoE	<i>Enterobacter cloacae</i>	Porina, transporte de compostos negativamente carregados
PhoE	<i>Escherichia coli</i>	Porina, transporte de compostos negativamente carregados
PhoE	<i>Shigella sonnei</i>	Porina, transporte de compostos negativamente carregados
PhoE	<i>Shigella boydii</i>	Porina, transporte de compostos negativamente carregados
PhoE	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Porina, transporte de compostos negativamente carregados
PhoE	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Porina, transporte de compostos negativamente carregados
VV20580	<i>Vibrio vulnificus</i>	Proteína de membrana externa
VVA1129	<i>Vibrio vulnificus</i>	Proteína de membrana externa putativa
VPA0526	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	OmpU putativa

**Tabela 12 – Caixas *pho* identificadas à montante dos genes codificantes das porinas putativas de *Vibrio sp.* com maior similaridade com PhoE<sup>Vc</sup>, além daquelas sugeridas para os genes *vca1008* (PhoE<sup>Vc</sup>) e *phoB/R* e a caixa *pho* consenso de *E. coli*.**

Proteína	Similaridade (identidade) com PhoE <sup>Vc</sup>	Caixas <i>pho</i> putativas
PhoE <sup>Vc</sup>		<u>CGCCAT</u> AAAAAT <u>TCAATC</u> (-102)
VV20580	62,1% (46,3%)	<u>GGGCAT</u> GTAA <u>GCCCAT</u> (-35)
VVA1129	61,5% (46,3%)	<u>GGGCAT</u> GTAA <u>GCCCAT</u> (-35)
VPA0526	59,2% (44,1%)	<u>GGGCAA</u> GTAA <u>GCCCAT</u> (-36)
PhoB/R ( <i>V. cholerae</i> )		<u>AGGTCAC</u> AAAAT <u>TGTCAT</u> (-35)
consenso <i>E. coli</i>		<u>CTGTCAT</u> AAAT <u>CTGTCAC</u>

VV20580 e VVA1129 são OMPs putativas de *V. vulnificus* CMCP6 e YJ016, respectivamente. VPA0526 foi anotada como OmpU putativa em *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633. Entre parênteses é mostrada a posição das caixas *pho* relativa à base proximal do sítio de início da tradução putativo.

Segundo (NIKAIDO, 2003), as porinas de proteobactérias  $\gamma$  possuem alta similaridade entre si. Assim, para prever a estrutura secundária de PhoE<sup>Vc</sup>, as possíveis regiões transmembranares da PhoE<sup>Vc</sup>, PhoE<sup>Ec</sup> e OmpU foram identificadas (PRED-TMBB) e alinhadas (ClustalW), como visto na Figura 10. As regiões de folhas  $\beta$  presentes no cristal da PhoE<sup>Ec</sup> (COWAN e cols., 1992) foram utilizadas para checar a eficiência da predição.

```

PhoEVc      -----MKKAAIAVAVLSAVVS-----GSTLAATVYDAEGTSLKVGGRLEF 40
OmpU        MDNKLGLNKMNKTLIALAVSAAAVATGAYADGINQSGDKAGSTVYSAKGTSLKVGGRLEF 60
PhoEEc      -----MKKSTLALVVMGIVAS-----ASVQAAEIYNKDGKLDVYGVKVA 40
              *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *:
              .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. ..

PhoEVc      RGFNNDKGEIEGTMLNKSRLNVAAGETD IGAGMKGFGFWAEQGVKSSAGTSTEQE 100
OmpU        RLSLK-----DGKAQDNSRVRLNFLGKAEINDSLYGVGFYEGEFTNDQG--KNASN 110
PhoEEc      MHYMSDN-----ASKDGDQSYIRFGFKGETQINDQLTGYGRWAEFAGNKAESDTAQQK 94
              .. .. .. *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *:
              .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. .. ..

PhoEVc      TTFKQRYMYVGMK-GDFSLSFGRQNTAGVQISDMSDIG-TFTGDQKAFVSAGNEQINN 158
OmpU        NSLDNRYTYAGIG-GTYGEVTVGKNDGALGVITDFTDIM-SYHGNTAAEKIAVADRVNDM 168
PhoEEc      T-----RLAFAGLKYKDLGSPDYGRNLGALYDVEAWTDMFPEFGDSSAQTDNFMTKRASG 150
              . * .. *: * .. *: *: * : *: *: *: * : * : * : * : * : * :
              . * .. *: * .. *: *: * : *: *: *: * : * : * : * : * : * :

PhoEVc      IAYGYDFESFKLKASYIADDQKNADGYG--LSGIYSAPFG-----LDIGLGYAA 205
OmpU        LAYKGFQFDLGVKASYRFADRNAVDAMGNVVTETNAAKYSD----NGEDGYSLSAIYTF 223
PhoEEc      LATYRNTDFFGVIDGLNLTLOYQGKNENRDVKKQNGDGFGTSLTYDFGGSDFAISGAYTN 210
              : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
              : * : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : *

PhoEVc      NDLGTDKGS-----ADQIIAGLGYTMGDLYFGATYTTGDKDDKADTEFT----GIEV 253
OmpU        GDTGFNVGAGYADQ-DDQNEYMLAASYRMENLYFAGLFTDG--ELAKVDVDT----GYEL 276
PhoEEc      SDRTNEQNLQSRGTGKRAEAWATGLKYDANNIYLATFYSETRKMTPITGGFANKTQNFEA 270
              . * : . : : : . * : *: *: *: : : : : : : : : : : : : : *
              . * : . : : : . * : *: *: *: : : : : : : : : : : : : : *

PhoEVc      SAQYKIKTEFRLIAAYQNQEEETKN--VTKDKADDFELTGRYDFTKNFRSYLAYKANGLD 311
OmpU        AAGYKLG-----QAAFTATYNNAET--AKETSADNFAIDATYYFKPNFRSYISYQFNLLD 329
PhoEEc      VAQYQFDFGLRPSLGYVLSKGDIEIGDEDLVNYIDVGATYYFNKNMSAFVDYKINQLD 330
              * *: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : *
              * *: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : *

PhoEVc      -DKDAGYKVEDTIRLGLRYDF 331
OmpU        SDKVGKVASEELAIGLRYDF 350
PhoEEc      SDNKLNINDDIVAVGMTYQF 351
              *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *:
              *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *: *:

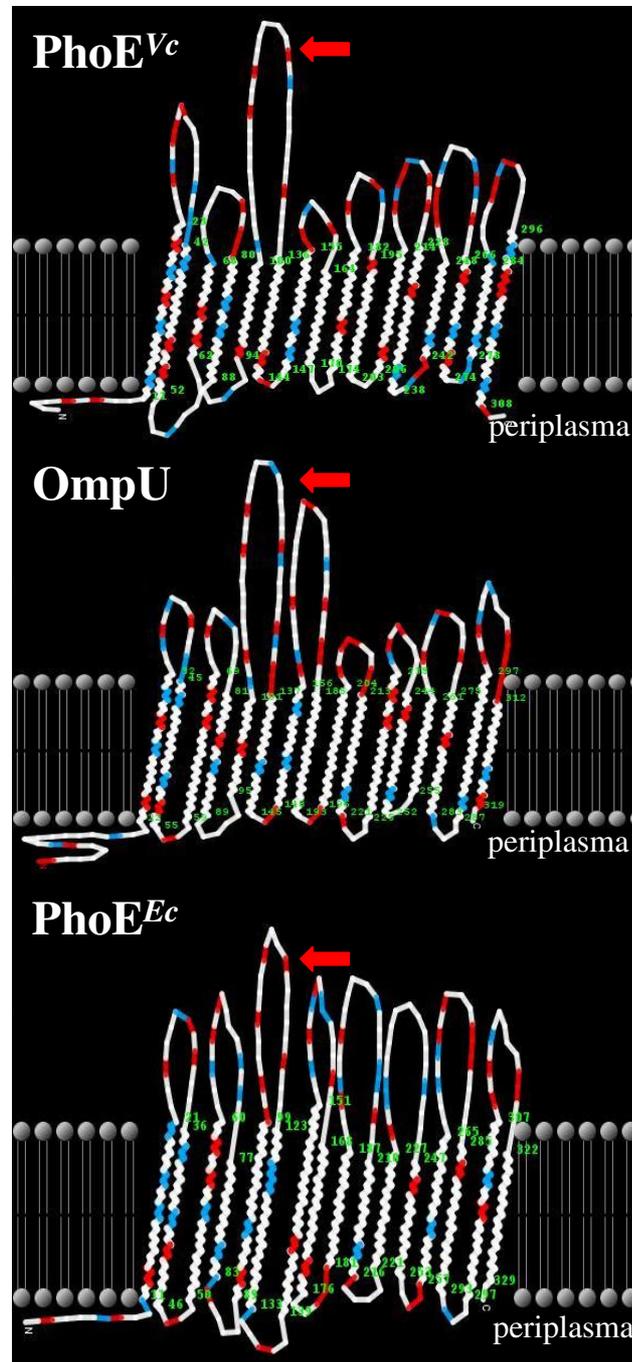
```

**Figura 10 – Alinhamento entre as seqüências de PhoE<sup>Vc</sup>, OmpU e PhoE<sup>Ec</sup>.** Os peptídeos sinal estão marcados em laranja, enquanto as folhas  $\beta$  estão assinaladas em azul. As regiões grifadas em cinza correspondem às folhas  $\beta$  na PhoE<sup>Ec</sup> cristalizada (COWAN e cols., 1992).

A comparação das regiões transmembranares previstas pelo programa PRED-TMBB e as presentes na forma cristalina de PhoE<sup>Ec</sup> (Figura 10) mostrou uma alta coincidência, sugerindo que a previsão teórica pode ser utilizada com confiança.

As seqüências N-terminais e C-terminais de PhoE<sup>Vc</sup>, PhoE<sup>Ec</sup> e OmpU se mostraram bastante conservadas. É importante ressaltar que as três proteínas possuem em suas extremidades C-terminais um resíduo de fenilalanina, que é encontrado em muitas porinas (Nikaido, 2003). O número de folhas  $\beta$  observadas nas três proteínas foi igual (16; Figuras 10

e 11) e em regiões semelhantes, sugerindo que a PhoE<sup>Vc</sup> se organiza na forma de um barril  $\beta$ , assim como as porinas clássicas (NIKAIDO, 2003).



**Figura 11 – Representação gráfica das estruturas de barril  $\beta$  em PhoE<sup>Vc</sup>, OmpU e PhoE<sup>Ec</sup> feita pelo programa TMRPres2D. Em azul, estão marcados os aminoácidos positivamente carregados, enquanto em vermelho estão os que possuem carga negativa. As setas indicam a L3 nas três proteínas.**

As análises das seqüências primárias da PhoE<sup>Vc</sup>, PhoE<sup>Ec</sup> e OmpU ainda permitiram prever a existência de alças extramembranares nas proteínas (uma representação está ilustrada na Figura 11). Nas três proteínas analisadas foram observadas pequenas voltas na porção das proteínas virada para o espaço periplasmático (*turns*, T 1-7) e grandes alças externas (*loops*, L 1-8). Uma alça especialmente grande (L3) foi detectada nas três proteínas (Figura 11). Esta alça maior é extremamente conservada nas porinas clássicas (COWAN e cols., 1992). O motivo de seis aminoácidos PEFGGD, uma característica da L3 de porinas clássicas (COWAN e cols., 1992), é encontrado na PhoE<sup>Ec</sup> e em porinas de outras enterobactérias. Este motivo também foi encontrado na L3 de PhoE<sup>Vc</sup>, porém com algumas alterações: GTFTGD (Figura 12).

Os resíduos de aminoácidos responsáveis por determinar a seletividade iônica em porinas tais como OmpF, OmpC e PhoE<sup>Ec</sup> em *E. coli*, e OprR em *Pseudomonas aeruginosa* estão localizados nas porções N-terminais destas proteínas (NIKAIDO, 2003; SUKHAN e HANCOCK, 1996). PhoE<sup>Ec</sup> é uma proteína aniônica cuja seletividade está relacionada a um grupo de resíduos positivamente carregados (lisinas) nas posições 18, 29, 64, e 125 (K<sup>18</sup>, K<sup>29</sup>, K<sup>64</sup>, e K<sup>125</sup>) a partir da extremidade N-terminal da proteína madura, ou seja, após processamento e clivagem do peptídeo sinal (BAUER e cols., 1989). Estes resíduos se encontram na primeira região transmembrana e nas alças L1, L2 e L3, respectivamente. Os resíduos K<sup>18</sup>, K<sup>29</sup>, K<sup>64</sup>, e K<sup>125</sup> foram encontrados também em outras fosfoporinas das enterobactérias *Salmonella choleraesuis* (Q57ST4), *Salmonella typhi* (Q56119, P30705), *Shigella boydii* (Q325P5), *Shigella flexneri* (Q7UDL4), *Shigella sonnei* (Q3Z596), *Klebsiella oxytoca* (CAA48163), *Klebsiella pneumoniae* (AAL71890) e *Klebsiella granulomatis* (AAD21519) cujas seqüências gênicas estão depositadas no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).



Figura 12 – Sequência primária da PhoE<sup>Vc</sup> com as indicações das 16 regiões transmembranares (Tm 1-16, em vermelho), sete voltas periplasmáticas (T 1-7, em verde) e oito alças externas (L 1-8, em azul). As lisinas supostamente envolvidas no funcionamento da proteína estão sombreadas em amarelo. O resíduo E<sup>18</sup> está marcado em cinza. O motivo GTFTGD está assinalado na L3.

A busca de resíduos de lisina na seqüência de aminoácidos da PhoE<sup>Vc</sup> deduzida a partir de *vca1008* sem o peptídeo sinal predito pelo SignalP (PhoE<sup>Vc</sup> madura, Figura 9) trouxe resultados semelhantes. Enquanto PhoE<sup>Ec</sup> e seus homólogos mencionados anteriormente possuem 14 resíduos de lisina (de um total de 23) em suas porções N-terminais, PhoE<sup>Vc</sup> possui apenas 9 (de um total de 22). A busca dos resíduos de lisina nas posições 18, 29, 64 e 125 ou em suas proximidades levou aos seguintes resultados: nenhum resíduo de lisina foi encontrado na posição 18 ou na primeira região transmembranar da PhoE<sup>Vc</sup>, sendo a posição 18 ocupada por um aminoácido carregado negativamente (ácido glutâmico – E<sup>18</sup>). K<sup>29</sup> também não foi encontrado, porém há uma lisina próxima (K<sup>28</sup>), localizada na L1. Na posição 64, encontra-se uma alanina (A<sup>64</sup>), sendo o resíduo de lisina mais próxima o K<sup>69</sup>, também presente na L2. Ao invés da K<sup>125</sup> da PhoE<sup>Ec</sup>, foi encontrado um resíduo de lisina próximo (K<sup>124</sup>), localizado na L3. As lisinas possivelmente importantes para o funcionamento de PhoE<sup>Vc</sup> e suas localizações na proteína estão ilustradas na Figura 12.

A análise das seqüências das porinas putativas de *Vibrio sp.* com maior similaridade à PhoE<sup>Vc</sup> pelo programa TMRPres2D mostrou uma topologia semelhante à da PhoE<sup>Vc</sup>, ou seja 16 folhas  $\beta$  transmembranares, com 7 voltas periplasmáticas e oito alças externas, sendo a L3 especialmente grande (ver Anexo). A busca pela presença de resíduos de aminoácidos determinantes da seletividade iônica dos canais, nestas seqüências, revelou que alguns destes resíduos encontrados na PhoE<sup>Vc</sup>, são conservados nestas proteínas de *Vibrio* (Tabelas 12 e 13). Por exemplo, todas as OMPs de *Vibrio sp.* analisadas possuem um E<sup>18</sup>, um aminoácido não-polar (alanina ou glicina) na posição 29 e um aminoácido sem carga na posição 64 (alanina, glutamina ou valina). Além disto, resíduos de lisina nas vizinhanças das posições 29, 64 e 125 também foram encontrados nestas proteínas, em regiões equivalentes às da PhoE<sup>Vc</sup>, como predito pelo programa TMRPres2D (Tabela 13).

**Tabela 13 –Resíduos de aminoácidos possivelmente envolvidos na seletividade iônica de PhoE<sup>Ec</sup>, PhoE<sup>Vc</sup> e outras porinas de *Vibrio sp.***

OMP	Aminoácido <sup>posição</sup>									
PhoE <sup>Ec</sup>	K <sup>18</sup>	K <sup>28</sup>	K <sup>29</sup>	K <sup>64</sup>						K <sup>125</sup>
PhoE <sup>Vc</sup>	E <sup>18</sup>	K <sup>28</sup>				K <sup>69</sup>				K <sup>124</sup>
VVA1129	E <sup>18</sup>	K <sup>28</sup>				K <sup>67</sup>		K <sup>74</sup>		K <sup>123</sup>
VV20580	E <sup>18</sup>	K <sup>28</sup>				K <sup>67</sup>		K <sup>74</sup>		K <sup>123</sup>
VPA0526	E <sup>18</sup>				K <sup>66</sup>	K <sup>69</sup>	K <sup>73</sup>			K <sup>122</sup>

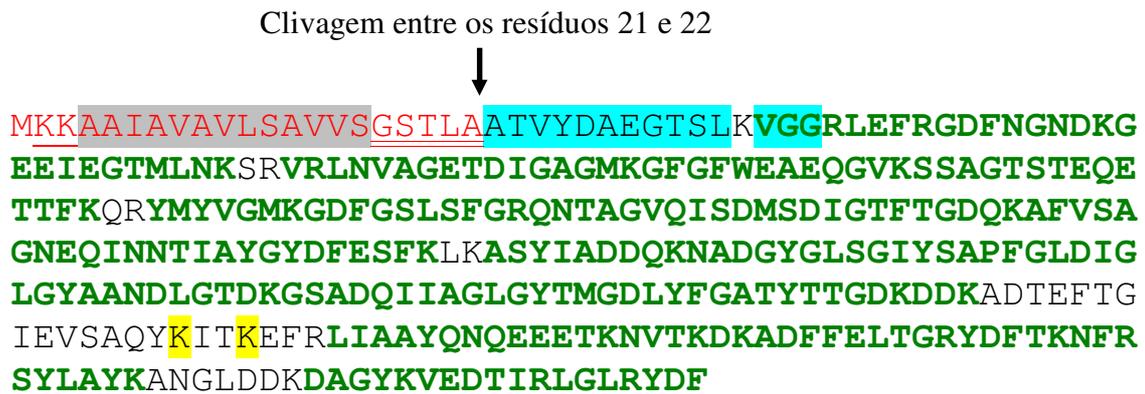
Os resíduos de lisina que desempenham papel na seletividade iônica do poro de PhoE<sup>Ec</sup> estão marcados em vermelho. VV20580 e VVA1129 são OMPs putativas de *V. vulnificus* CMCP6 e YJ016, respectivamente. VPA0526 foi anotada como OmpU putativa em *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633. Os resíduos sombreados estão localizados na Tm1 (amarelo), L1 (azul), L2 (lilás) e L3 (cinza).

#### 4.4. Caracterização da PhoE<sup>Vc</sup> da cepa de *V. cholerae* clássica 569BSR

O genoma da cepa de *V. cholerae* 569B, ao contrário da cepa N16961, ainda não foi seqüenciado. Assim, a estrutura primária de PhoE<sup>Vc</sup> da cepa 569BSR foi inferida a partir da digestão da proteína intacta com tripsina e análise das massas dos peptídeos obtidos através de MS (Figura 13). Esta análise mostrou um alto grau de identidade entre a PhoE<sup>Vc</sup> das duas cepas. Os peptídeos da PhoE<sup>Vc</sup> da cepa N16961 que não foram identificados na proteína da 569BSR foram, em sua maioria, aqueles que apresentam baixa massa (di e tripeptídeos, por exemplo) porque, nas condições da análise por MS, peptídeos menores que 800 Da (cerca de 6 resíduos) não foram considerados.

##### 4.4.1. Seqüenciamento N-terminal da PhoE<sup>Vc</sup>

Para determinar o N-terminal das proteínas maduras nas células das cepas N16961SR e 569BSR, proteínas em preparações de membrana externa foram separadas por SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de PVDF. As bandas identificadas por MS como PhoE<sup>Vc</sup>, das duas cepas (Figura 7), foram cortadas da membrana e suas seqüências N-terminais foram determinadas por degradação de Edman (Figura 13). Em ambas as cepas, a forma madura de PhoE<sup>Vc</sup> apresentou no seu N-terminal a seqüência ATVYDAEGTSLXVGG, compatível com a uma perda de um peptídeo de 21 resíduos de aminoácidos em relação a proteína intacta, deduzida a partir da seqüência de *vca1008*, como previsto pela análise com o Signal P 3.0 (BENDTSEN e cols., 2004).



**Figura 13 – Sequência da PhoE<sup>Vc</sup> da cepa N16961 (disponível no banco de dados TIGR CMR).** Na seqüência sinal (em vermelho) determinada pelo programa SignalP 3.0 (BENDTSEN e cols., 2004), os resíduos positivos estão marcados com sublinhado simples, a seqüência hidrofóbica está grifada em cinza e a região C-terminal não carregada está assinalada com sublinhado duplo. Em azul, estão assinalados os aminoácidos seqüenciados por degradação de Edman. Em amarelo, estão marcados outros sítios de clivagem da tripsina. As massas dos peptídeos em verde foram observadas na PhoE<sup>Vc</sup> expressa pela cepa 569BSR analisada por MS.

#### 4.4.2. Purificação parcial da PhoE<sup>Vc</sup>

As porinas clássicas normalmente se associam fortemente ao envelope celular bacteriano, onde estão arranjadas como trímeros (KOEJNIK e cols., 2000; NIKAIDO, 2003). Assim sendo, as porinas não são solubilizadas com Triton X-100, SDS 2% ou cloreto de guanidina 5M a 70°C (NIKAIIDO, 2003). Nas primeiras tentativas de purificar as principais OMPs de *V. cholerae*, o método de Chakrabarti e cols. (1996) foi utilizado. Nele, as amostras eram incubadas em tampão contendo SDS 2% por 30 minutos a 30°C. Este processo não foi suficiente para solubilizar as OMPs satisfatoriamente. Em uma segunda tentativa, utilizou-se o detergente não iônico n-octilpolioxietileno (octil-POE), que é miscível em soluções aquosas, tem alta concentração micelar crítica (IMC) e forma micelas bem definidas. Este detergente foi especialmente sintetizado para a solubilização de OMPs (GARAVITO e ROSENBUSCH, 1986).

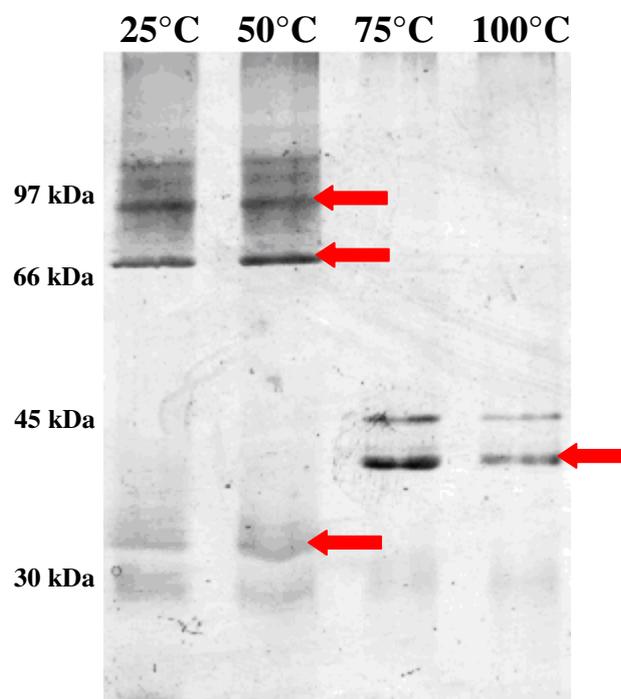
O tratamento de preparações de membrana externa com octil-POE mostrou que as três principais OMPs de *V. cholerae* são solubilizadas em concentrações distintas deste detergente. Enquanto a porina OmpT e PhoE<sup>Vc</sup> foram solubilizadas com 0,5% de octil-POE, para OmpU foi preciso utilizar octil-POE 3% (dados não mostrados). Assim, a PhoE<sup>Vc</sup> expressa pela cepa 569BSR foi parcialmente purificada com octil-POE 0,5%, já que esta cepa expressa na membrana externa, principalmente, OmpT e PhoE<sup>Vc</sup> em TGLP. Resultados mais recentes sugerem que a PhoE<sup>Vc</sup> pode ser solubilizada em concentrações menores de octil-POE (0,3%), o que poderia facilitar a sua purificação. Idealmente, a O395SR seria a cepa a ser utilizada para purificar a PhoE<sup>Vc</sup>, uma vez que em TGLP ela expressa como OMPs majoritárias PhoE<sup>Vc</sup> e OmpU, proteínas que poderiam ser facilmente separadas pela solubilização diferencial com octil-POE. Entretanto, a sequência do genoma desta cepa ainda não foi publicada e não se pode garantir que a PhoE<sup>Vc</sup> expressas por estas três cepas estudadas tenham a mesma sequência primária.

As proteínas solubilizadas em octil-POE 0,5% foram analisadas por SDS-PAGE e o gel foi revelado com nitrato de prata. As proteínas nas bandas majoritárias foram excisadas do gel e identificadas por MS; além de PhoE<sup>Vc</sup> (identificada po MS com uma pontuação MOWSE de 111712, uma cobertura de 36% e 10 peptídeos identificados), uma outra proteína, provavelmente OmpT, também foi detectada na preparação (Figura 14, pista “100°C”). Entretanto, a amostra não continha contaminações de fosfolipídeos nem de LPS, que são corados pelo tratamento com nitrato de prata e seriam vistos como bandas ao longo de toda a pista (GARAVITO e ROSENBUSCH, 1986).

#### **4.4.3. Formação de oligômeros e estabilidade térmica da PhoE<sup>Vc</sup>**

Porinas clássicas, como OmpU e OmpT de *V. cholerae* e PhoE<sup>Ec</sup> se arranjam na membrana externa das células como trímeros, formas bastante estáveis a tratamento com

detergentes e calor (NIKAIDO, 2003). Para verificar a habilidade de PhoE<sup>Vc</sup> de se organizar e para determinar a estabilidade de possíveis oligômeros, a proteína de células de 569BSR cultivada em TGLP foi parcialmente purificada e ressuspenso em tampão de amostra não desnaturante, ou seja, sem SDS nem DTT, sendo incubada por 10 minutos a diferentes temperaturas: 25°C, 50°C, 75°C e 100°C. As amostras foram então submetidas à análise eletroforética em SDS-PAGE (Figura 14).



**Figura 14 – Perfil eletroforético da PhoE<sup>Vc</sup> de 569BSR parcialmente purificada e submetida a diferentes tratamentos térmicos (SDS-PAGE 11% revelado com prata).** As amostras foram incubadas por 10 minutos a 25°C, 50°C, 75°C ou 100°C em tampão de amostra não-desnaturante. O gel foi revelado com nitrato de prata. As bandas assinaladas com as setas vermelhas foram identificadas como PhoE<sup>Vc</sup>.

As bandas protéicas foram retiradas do gel, submetidas à digestão com tripsina e as proteínas correspondentes foram identificadas por MS, a partir da comparação de seus espectros com a lista de massas previstas a partir da digestão teórica do produto de *vca1008* (codificante da PhoE<sup>Vc</sup>). As bandas correspondentes à PhoE<sup>Vc</sup> desnaturada (40kDa) nas

amostras aquecidas a 75°C e 100°C foram identificadas como produto de *vca1008*. Nas amostras tratadas a 25°C e 50°C, devido à quantidade relativamente baixa de material nas bandas (lembrando que o gel foi revelado com nitrato de prata), a identificação do produto de *vca1008* foi baseada nos picos mais intensos dos PMFs.

Nas amostras aquecidas a 75°C ou a 100°C, PhoE<sup>Vc</sup> migrou como uma banda única de 40kDa, correspondente ao monômero desnaturado. Nas amostras incubadas a 25°C ou a 50°C, três formas distintas da PhoE<sup>Vc</sup>, que migraram como proteínas de 33, 67 e 91kDa, foram observadas. A banda de menor peso molecular deve corresponder ao monômero nativo. As formas de maior peso, provavelmente, correspondem à forma trimérica de PhoE<sup>Vc</sup>, só detectadas nas amostras incubadas às temperaturas mais baixas (25°C e 50°C), como já foi observado para outras porinas (CHAKRABARTI e cols., 1996; JANSEN e cols., 2000).

#### 4.4.4. Análise por eletroforese 2D das OMPs de *V. cholerae*

As OMPs das cepas de *V. cholerae* 569BSR, O395SR e N16961SR foram analisadas por eletroforese 2D. Para isto, células cultivadas em TGLP foram lisadas em tampão contendo Triton X-100 2% e uréia 8M. As proteínas insolúveis nesta condição foram separadas por ultracentrifugação e solubilizadas em solução de reidratação contendo o detergente ASB-14 1% (item 3.2.4, Material e Métodos). Este detergente tem sido utilizado com eficácia para a solubilização de OMPs. Após terem sido focalizadas em tiras de 7 cm, com intervalo de pH de 4 a 7, as proteínas foram submetidas a SDS-PAGE e coradas com azul de Coomassie

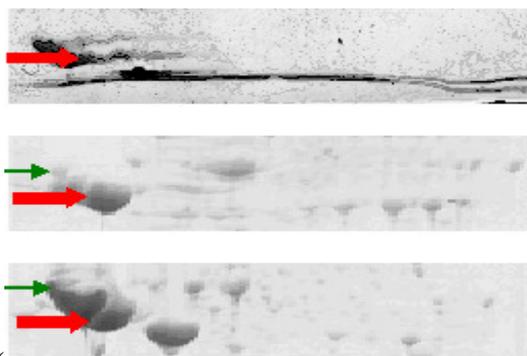
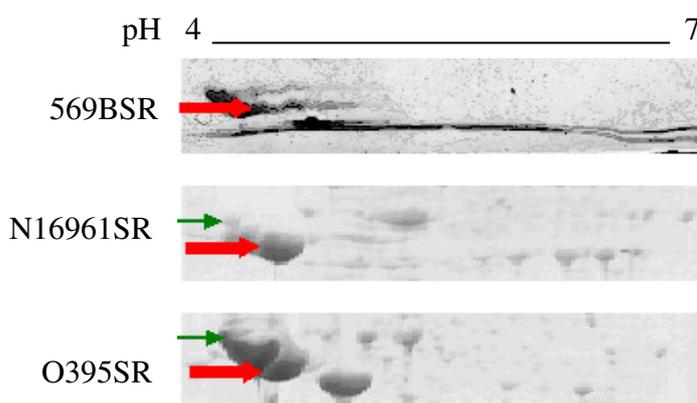


Figura 15). As bandas majoritárias foram identificadas por MS ou MS/MS, por seqüenciamento dos três peptídeos trípticos de maior intensidade.

O pI predito para a PhoE<sup>Vc</sup> (considerando a seqüência da cepa N16961 no banco de dados TIGR CMR) em sua forma madura, ou seja, sem o peptídeo sinal, é 4,4 ([http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)). O pI experimental, calculado a partir da PhoE<sup>Vc</sup> resolvida por eletroforese 2D também foi de 4,4 para as três cepas (Figura 15).

A observação de que a PhoE<sup>Vc</sup> das três cepas em estudo possuem valores iguais de massa molecular e pI, somada à identidade entre os peptídeos trípticos da proteína expressa pelas cepas N16961SR e 569BSR, sugere que o produto de *vca1008* seja o mesmo nas três cepas (569BSR, 0395SR e N16961SR), entretanto, estes dados necessitam confirmação. Para isto, fragmentos genômicos das três cepas contendo o gene *vca1008* estão sendo sequenciados.



**Figura 15 – Análise por eletroforese 2D das proteínas de membrana externa de bactérias cultivadas em TGLP.** As setas vermelhas indicam a PhoE<sup>Vc</sup>, enquanto as setas verdes mostram a OmpS. As proteínas foram identificadas por MS/MS. O gel foi corado com azul de Coomassie.

#### 4.5. Papel da PhoE<sup>Vc</sup> na resistência ao deoxicolato de sódio (DOC)

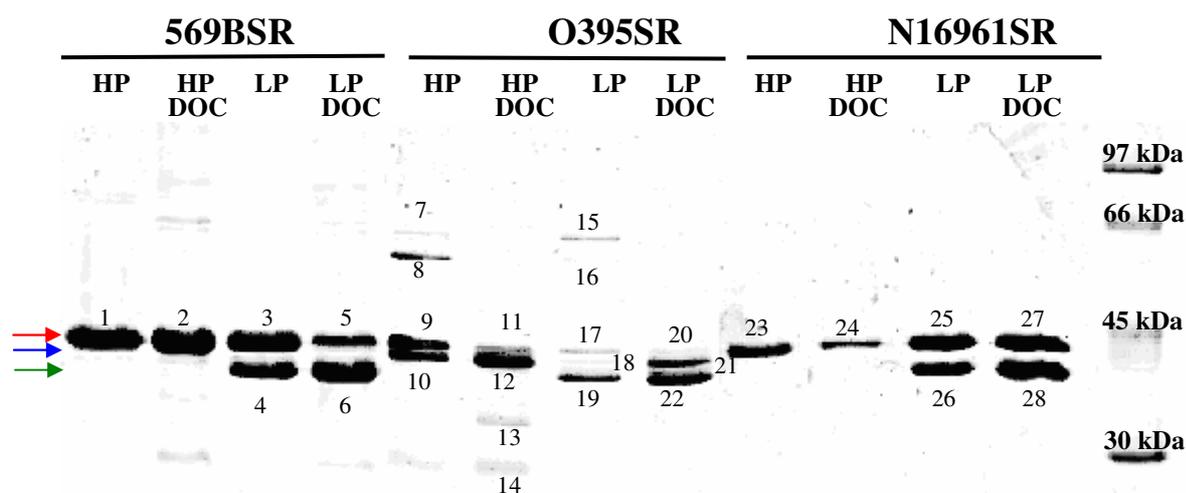
##### 4.5.1. Expressão de OMPs em células cultivadas na presença de DOC

As observações de que o produto de *vca1008* é expresso *in vivo* e essencial na colonização intestinal (OSORIO e cols., 2004) e de que mutações em *vc0633* (que codifica a OmpU) não afetam a colonização de modelos animais (OSORIO e cols., 2004), levou-nos a questionar um papel para o produto de *vca1008* (PhoE<sup>Vc</sup>) na resistência aos sais biliares *in vivo* e *in vitro*.

Para fins de comparação, a expressão das OMPs das três cepas de *V. cholerae* (569BSR, O395SR e N16961SR) foi analisada em células cultivadas em TGHP e TGLP, na ausência e na presença de DOC 0,2%, aproximadamente a mesma concentração em que ele se encontra na bile no trato gastrointestinal (BEGLEY e cols., 2005). As preparações das OMPs das três cepas cultivadas nas quatro condições foram analisadas por SDS-PAGE (Figura 16). As bandas protéicas foram excisadas do gel, digeridas com tripsina e identificadas com base nos seus PMFs no banco de *V. cholerae* (Figura 16, Tabela 14).

As OMPs majoritárias foram OmpU, OmpT e PhoE<sup>Vc</sup>, mas OMPs minoritárias diferencialmente expressas foram detectadas nas amostras das cepas O395SR e 569BSR. Novamente, a forma truncada de OmpU foi observada (banda 14, Figura 16), desta vez em células de O395SR cultivadas em TGHP na presença de DOC 0,2%.

Curiosamente, a presença de DOC 0,2% em TGHP afetou de modo distinto os perfis das OMPs nas três cepas (Figura 16). Para O395SR, o DOC 0,2% causou uma redução nos níveis de OmpT e um aparente aumento nos níveis de OmpU, de acordo com os dados na literatura sobre a importância de OmpU para a sobrevivência de *V. cholerae* aos sais biliares (PROVENZANO e KLOSE, 2000).



**Figura 16 – Perfis eletroforéticos das OMPs-Pg de cepas de *V. cholerae* cultivadas por 14 horas em TGHP ou TGLP na ausência e na presença de DOC 0,2% (SDS-PAGE 11% corado com azul de Coomassie).** As proteínas numeradas foram identificadas por MS (Tabela 14). As setas indicam a posição da OmpU (azul), OmpT (vermelho) e PhoE<sup>Vc</sup> (verde).

No caso das cepas 569BSR e N16961SR, o efeito do DOC 0,2% na expressão das OMPs em TGHP não é muito claro. Nesta condição, ambas expressaram majoritariamente OmpT, ao contrário da cepa O395SR e de dados em diversas publicações sobre a maior proteção aos sais biliares garantida pela OmpU (DURET e DELCOUR, 2006; PROVENZANO e KLOSE, 2000; PROVENZANO e cols., 2000). Esta divergência provavelmente se deve ao fato de que estes pesquisadores utilizaram células de O395 cultivadas em meio rico na presença de bile; estas condições foram reproduzidas em nosso laboratório e os resultados foram confirmados para esta cepa (dados não mostrados). Neste trabalho, além da O395SR, foram testadas outras cepas de *V. cholerae*, que foram cultivadas em meio definido (TG) e DOC, ao invés de LB e bile, uma vez que o objetivo era manter a concentração do Pi sob controle.

Em TGLP, a presença de DOC 0,2% promoveu um aumento nas quantidades de PhoE<sup>Vc</sup> na membrana externa nas três cepas analisadas e, aparentemente, uma queda nos

níveis relativos de OmpT. Apenas em O395SR ocorreu também um aumento nos níveis de OmpU na presença do detergente.

**Tabela 14 – Proteínas (referentes ao gel da Figura 16) identificadas por MS.**

Banda	Proteína	Gene codificante <sup>a</sup>	Pontuação MOWSE	Cobertura (%) <sup>b</sup>	# peptídeos identificados <sup>c</sup>
1	OmpT	<i>vc1854</i>	9,24E+06	45	13
2	OmpT	<i>vc1854</i>	1,27E+06	39	12
3	OmpT	<i>vc1854</i>	9,25E+06	45	13
4	PhoE <sup>Vc</sup>	<i>vca1008</i>	9873	61	14
5	OmpT	<i>vc1854</i>	4,21E+05	40	11
6	PhoE <sup>Vc</sup>	<i>vca1008</i>	1,98E+04	50	14
7	Proteína relacionada à hemolisina	<i>vc1888</i>	1,12E+04	17	6
8	Receptor de vitamina B12	<i>vc0156</i>	1,20E+08	49	21
9	OmpT	<i>vc1854</i>	1,32E+05	48	10
10	OmpU	<i>vc0633</i>	3,03E+07	56	13
11	OmpT	<i>vc1854</i>	6,02E+05	43	11
12	OmpU	<i>vc0633</i>	9,51E+05	47	11
13	OmpU “truncada”	<i>vc0633</i>	1,03E+04	29	8
14	OmpV	<i>vc1318</i>	1,40E+04	49	8
15	Proteína relacionada à hemolisina	<i>vc1888</i>	3,44E+07	29	13
16	Receptor de vitamina B12	<i>vc0156</i>	1,28E+05	22	10

17	OmpT	<i>vc1854</i>	5,40E+06	48	13
18	OmpU	<i>vc0633</i>	3611	27	6
19	PhoE <sup>Vc</sup>	<i>vca1008</i>	9,42E+05	44	12
20	OmpT	<i>vc1854</i>	7,00E+05	44	10
21	OmpU	<i>vc0633</i>	5,54E+07	49	11
22	PhoE <sup>Vc</sup>	<i>vca1008</i>	2,24E+06	45	13
23	OmpT	<i>vc1854</i>	1254	23	5
24	OmpT	<i>vc1854</i>	2576	25	6
25	OmpT	<i>vc1854</i>	1648	25	6
26	PhoE <sup>Vc</sup>	<i>vca1008</i>	1043	38	11
27	OmpT	<i>vc1854</i>	1772	37	8
28	PhoE <sup>Vc</sup>	<i>vca1008</i>	5424	35	10

<sup>a</sup> Gene que codifica a proteína na cepa N16961, cujo genoma está completamente sequenciado

<sup>b</sup> Percentual da proteína coberto pelos peptídeos identificados

<sup>c</sup> Número de peptídeos dos PMFs identificados na proteína

As OMPs principais (OmpU, OmpT e PhoE<sup>Vc</sup>) presentes em cada amostra foram quantificadas por densitometria (Tabelas 15 e 16).

**Tabela 15 – Volume relativo das principais OMPs expressas por cepas de *V. cholerae* selvagens em TGHP na ausência (-) e na presença (+) de DOC 0,2%.**

Proteína \ Cepa	569BSR		O395SR		N16961SR	
	-	+	-	+	-	+
OmpT	96%	85%	43%	11%	96%	85%
OmpU	-	-	37%	75%	-	-

**Tabela 16 - Volume relativo das principais OMPs expressas por cepas de *V. cholerae* selvagens em TGLP na ausência (-) e na presença (+) de DOC 0,2%**

Cepa \ Proteína	569BSR		O395SR		N16961SR	
	-	+	-	+	-	+
OmpT	65%	24%	13%	5%	57%	37%
OmpU	-	-	5%	18%	-	-
PhoE <sup>Vc</sup>	35%	76%	54%	69%	43%	63%

#### 4.5.2. Análise da expressão de componentes do regulon Pho em resposta ao DOC

Para avaliar a expressão de *vca1008* em resposta a alterações nas condições de cultivo, seqüências de 241 pb da região promotora putativa deste gene nas cepas N16961SR, O395SR e 569BSR foram amplificadas por PCR e clonados no vetor de expressão pIC552 a montante do gene da  $\beta$ -galactosidase (*lacZ*). Os clones recombinantes contendo o fragmento de 241 pb foram identificados por PCR utilizando os mesmos oligonucleotídeos da reação de amplificação original (item 3.4.1 – Material e Métodos) e submetidos a reações de seqüenciamento, que revelaram que a seqüência de 241 pb a montante de *vca1008* nas das três cepas de *V. cholerae* é idêntica (Figura 17). O plasmídeo recombinante resultante pICPphoE foi utilizado para transformar cepas de *V. cholerae* selvagens (569BSR, O395SR e N16961SR) e o mutante  $\Delta$ *phoB/R* WK3, derivado de 569BSR. As mesmas cepas foram transformadas também com a construção pICPphoB, contendo a montante do gene *lacZ* uma seqüência de 234 pb do promotor putativo do operon *phoB/R* de *V. cholerae* (FARACHE, 2003), que codifica as proteínas do SDC PhoB/R. Esta seqüência é idêntica nas cepas 569BSR, O395SR e N16961SR (VON KRÜGER e cols., 1999); Simone Queiroga, comunicação pessoal). Todas as cepas transformadas com pICPphoE e pICPphoB foram

cultivadas em TGLP, na ausência e presença de DOC 0,2%, para analisar o efeito deste detergente na expressão do regulon Pho, através das atividades da fosfatase alcalina, e na atividade dos promotores de *vca1008* e *phoB/R*, através de medidas da atividade da  $\beta$ -galactosidase (Figura 18).

```

O395SR      GATTCCTCATCACTCACCACGGCGAAGCGCTTTTTTCACTCTAGAGAGCATACTTGAAAG 60
N16961SR   GATTCCTCATCACTCACCACGGCGAAGCGCTTTTTTCACTCTAGAGAGCATACTTGAAAG 60
569BSR     GATTCCTCATCACTCACCACGGCGAAGCGCTTTTTTCACTCTAGAGAGCATACTTGAAAG 60
*****

O395SR      CTCAACAGGAGGTACGTGCTCCGCCGTGTGATTAAGGCCTGTCATCATTTCCTTATCT 120
N16961SR   CTCAACAGGAGGTACGTGCTCCGCCGTGTGATTAAGGCCTGTCATCATTTCCTTATCT 120
569BSR     CTCAACAGGAGGTACGTGCTCCGCCGTGTGATTAAGGCCTGTCATCATTTCCTTATCT 120
*****

O395SR      CTGCCATCCCCGCGCCATAAAAATTCAATCAAAACGTCACCAAATAGAAACGCATTATTC 180
N16961SR   CTGCCATCCCCGCGCCATAAAAATTCAATCAAAACGTCACCAAATAGAAACGCATTATTC 180
569BSR     CTGCCATCCCCGCGCCATAAAAATTCAATCAAAACGTCACCAAATAGAAACGCATTATTC 180
*****

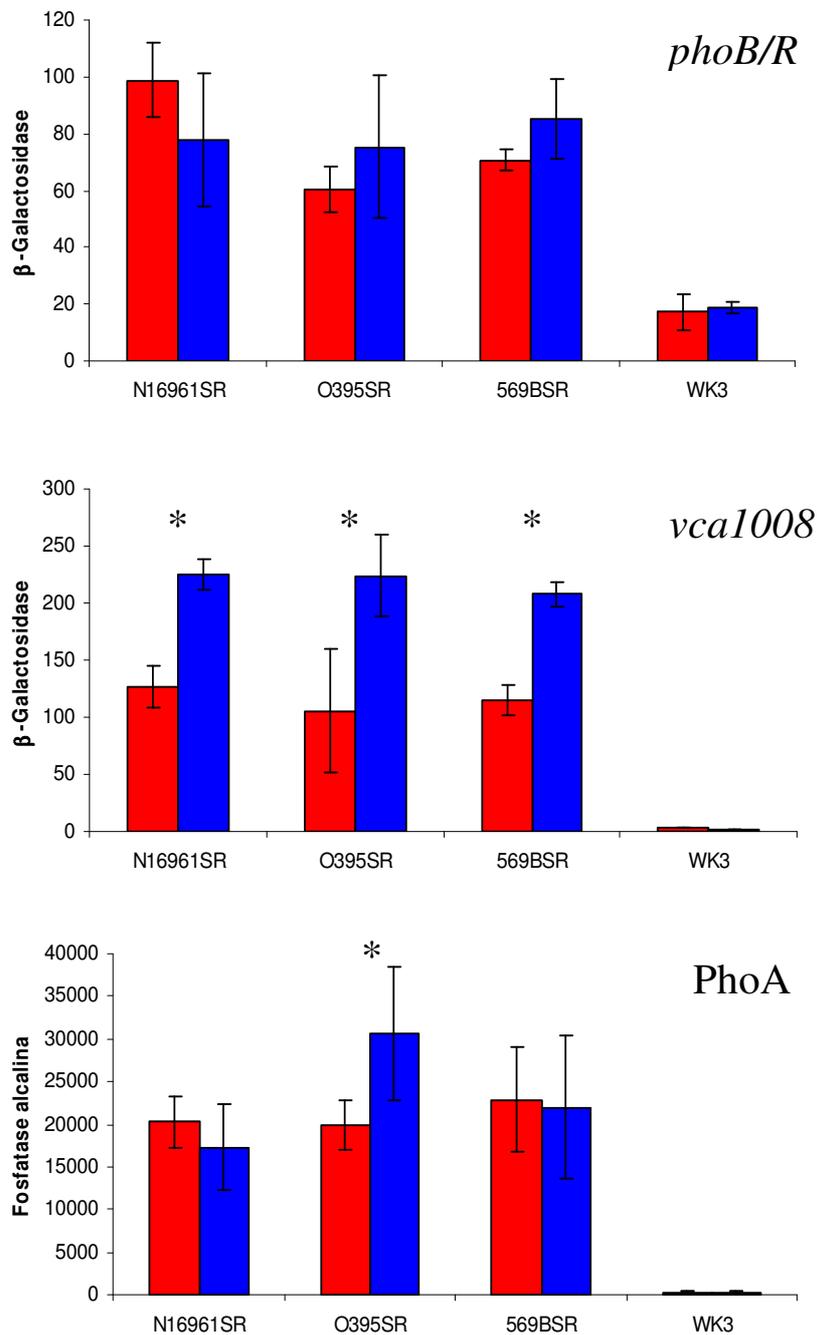
O395SR      ATTTTCAATCAGTACCTTAGCGGCATCACAAGTCGGGCAGTAAAGCCCAATCAAAC TAAT 240
N16961SR   ATTTTCAATCAGTACCTTAGCGGCATCACAAGTCGGGCAGTAAAGCCCAATCAAAC TAAT 240
569BSR     ATTTTCAATCAGTACCTTAGCGGCATCACAAGTCGGGCAGTAAAGCCCAATCAAAC TAAT 240
*****

O395SR      A 241
N16961SR   A 241
569BSR     A 241
*

```

**Figura 17 – Alinhamento das seqüências das regiões promotoras putativas de *vca1008* das cepas O395SR, N16961SR e 569BSR de *V. cholerae* O1. Os nucleotídeos assinalados foram sugeridos como uma caixa *pho* putativa (VON KRÜGER e cols., 2006).**

Confirmando dados anteriores (Krüger e cols., 1999; von Krüger e cols., 2006), o promotor do operon *phoB/R* mostrou atividade relativamente baixa no mutante WK3 em comparação à cepa parental 569BSR (cerca de 25% da atividade) e às cepas O395SR e N16961SR (Figura 18). Estes dados sugerem alguma transcrição do operon independente de PhoB/PhoR. O promotor *phoB/R*, no entanto, não se mostrou igualmente ativo nas três cepas selvagens: nas cepas clássicas O395SR e 569BSR sua atividade foi, respectivamente, cerca de 60 e 70% da observada para a cepa El Tor N16961SR (Figura 18).



**Figura 18 – Atividades dos promotores *phoB/R* e *vca1008* e do regulon Pho em células transformadas com os plasmídeos pICPphoB ou pICPphoE cultivadas por 14 horas em TGLP (barras vermelhas) ou TGLP / DOC 0,2% (barras azuis). A atividade da PhoA foi medida nas mesmas células utilizadas para as dosagens de atividade da  $\beta$ -galactosidase. As barras representam a média de três ( $\beta$ -galactosidase) ou seis (PhoA) experimentos independentes com o desvio padrão. Os asteriscos indicam as condições em que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os pares.**

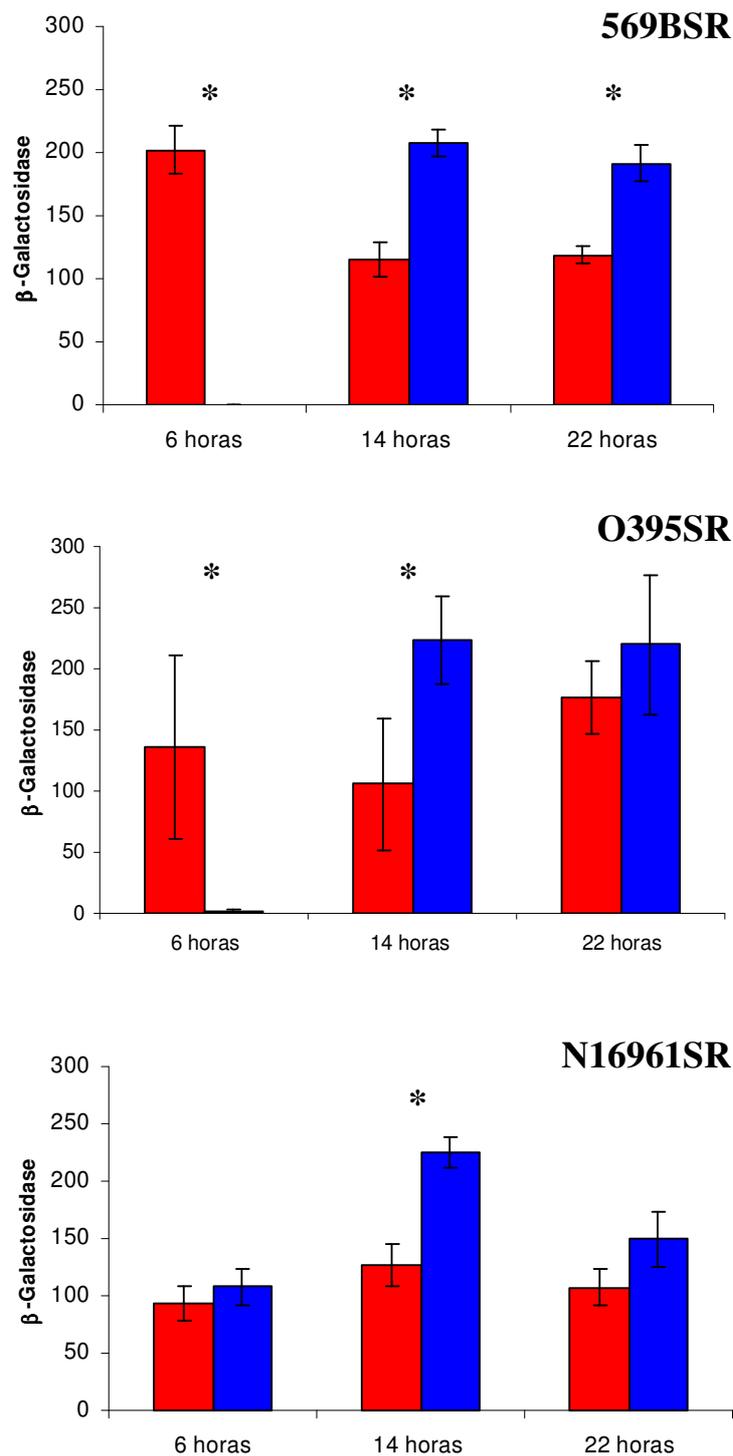
A expressão do regulon Pho, medida pela atividade da PhoA, foi semelhante nas cepas 569BSR, O395SR e N16961SR cultivadas em TGLP sem DOC 0,2%, mas não foi observada no mutante  $\Delta phoB/R$  WK3 (Figura 18).

A atividade do promotor putativo de *vca1008* nas três cepas selvagens, também foi aproximadamente igual e praticamente nula em WK3, evidenciando sua dependência de PhoB para a ativação e em acordo com dados de expressão do regulon Pho (Figura 18).

A adição de DOC 0,2% ao TGLP causou uma alteração significativa na expressão do regulon Pho das três cepas selvagens, principalmente em O395SR, onde houve um aumento de cerca de 50% na atividade da PhoA. Em relação à atividade do promotor *phoB/phoR* observada na ausência ou na presença de DOC 0,2% não há diferença significativa entre as duas condições para nenhuma cepas (Figura 18).

O promotor *vca1008* putativo, por outro lado, teve sua atividade aumentada 2,5 vezes nas três cepas selvagens, indicando uma atuação do DOC sobre a expressão de *vca1008* por uma via distinta de PhoB/R. A indução da atividade do promotor *vca1008* pelo DOC tem uma relação direta com os dados da Figura 16 e da Tabela 16, onde se pode ver um aumento na incorporação da PhoE<sup>Vc</sup> na membrana externa das três cepas selvagens na presença de DOC.

Para as cepas selvagens, foi feita também uma análise temporal da atividade do promotor putativo de *vca1008* em bactérias cultivadas em TGLP e TGLP/DOC 0,2% (Figura 19). As células de 569BSR, O395SR e N16961SR transformadas com pICPphoE foram cultivadas em LB até DO<sub>600nm</sub> de aproximadamente 0,5 e então transferidas para TGLP e TGLP/DOC 0,2% e a atividade do promotor putativo de *vca1008* foi medida após 6, 14 e 22 horas.

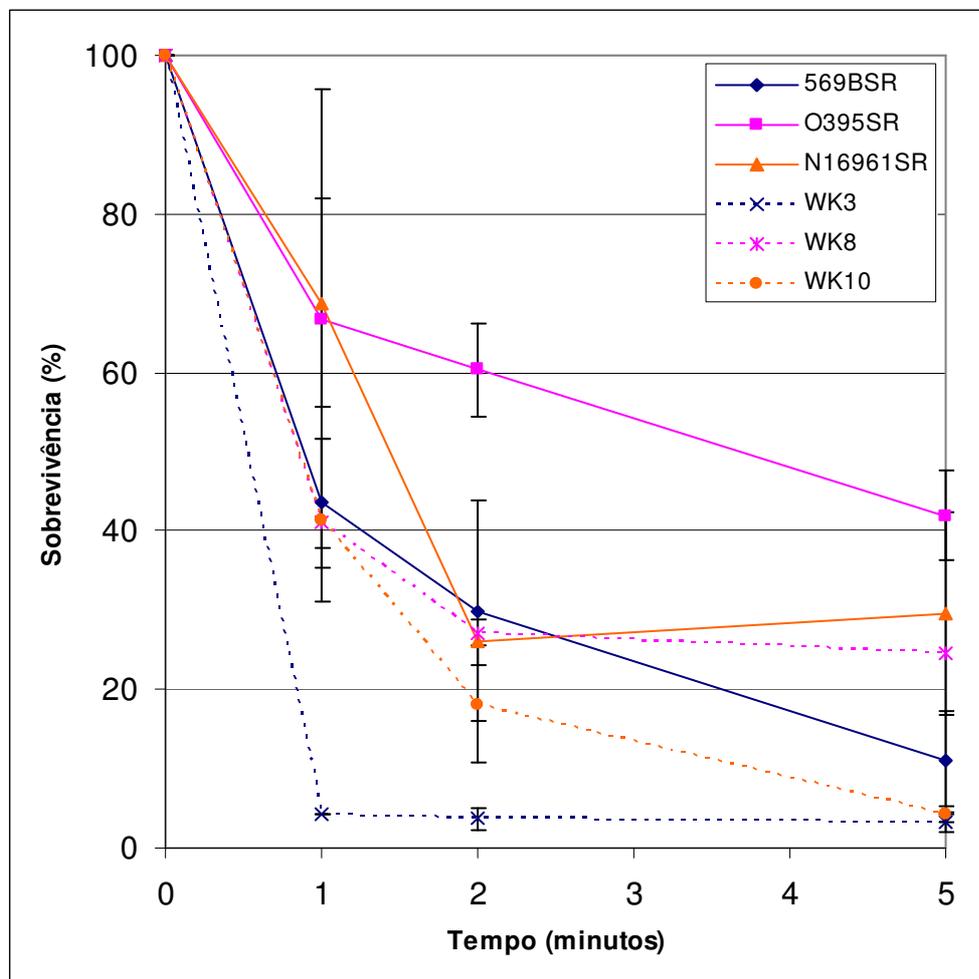


**Figura 19 – Atividades do promotor putativo de *vca1008* em células transformadas com o plasmídeo pICPphoE cultivadas por diferentes tempos em TGLP (barras vermelhas) ou TGLP / DOC 0,2% (barras azuis).** As barras representam a média de três experimentos independentes com o desvio padrão. Os asteriscos indicam as condições em que há diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os pares.

As cepas clássicas O395SR e 569BSR apresentaram padrões semelhantes de ativação do promotor nas condições testadas e diferentes do observado para N16961SR (Figura 19). Após 6 horas em TGLP, as cepas clássicas apresentaram atividades relativamente maiores para o promotor *vca1008* do que N16961SR. A adição de DOC 0,2% ao meio retardou a ativação do promotor nas cepas clássicas, mas, na cepa El Tor N16961, o detergente, causou indução na atividade transcricional do promotor, neste período. A atividade máxima do promotor *vca1008* nas três cepas em TGLP/DOC 0,2% foi observada em 14 horas, tempo em que sua atividade em 569BSR foi cerca de 70% maior e, em O395SR e N16961SR 100% maior do que a observada em TGLP. Após 22 horas, a atividade do promotor *vca1008* nas cepas clássicas, em TGLP/DOC 0,2%, se manteve nos níveis observados em 14 horas, mas na cepa N16961SR ela foi cerca de 30% menor.

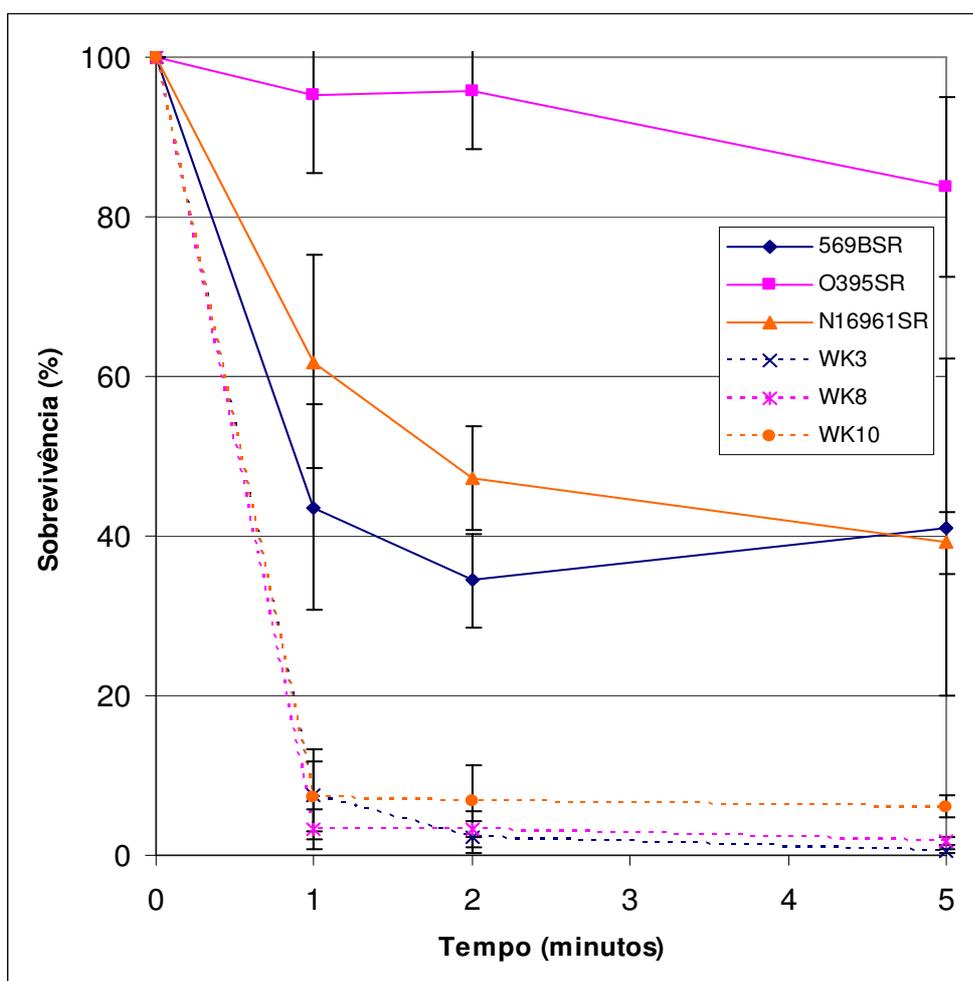
#### 4.5.3. Avaliação da sobrevivência ao DOC

O fato do DOC 0,2% ter induzido um aumento na incorporação da PhoE<sup>Vc</sup> na membrana externa das cepas de *V. cholerae* (Figura 16), levou-nos a analisar a sensibilidade ao DOC das células expressando PhoE<sup>Vc</sup> ou não. Para isso, células selvagens e mutantes  $\Delta phoB/R$  foram cultivadas em TGHP ou TGLP e submetidas ao choque com DOC 0,2% (Figuras 20 e 21, respectivamente).



**Figura 20 – Sobrevivência de bactérias selvagens (linhas cheias) e mutantes  $\Delta phoB/R$  (linhas tracejadas), pré-cultivadas em TGHP, ao DOC 0,2%. As células foram cultivadas por 12 (O395SR e WK8) ou 14 horas (demais cepas) em TGHP antes do choque com DOC 0,2% por alguns minutos. A sobrevivência foi determinada por plaqueamento em LB-ágar 1,5%, como descrito no item 3.5 (Material e Métodos).**

Para as cepas O395SR e seu mutante  $\Delta phoB/R$  WK8, não foi possível trabalhar com as células após 14 horas em TGHP. Após esse tempo de cultivo, as bactérias não eram mais viáveis, uma vez que não formaram colônias em placas de LB-ágar, mesmo antes da adição de DOC e nem se replicaram quando transferidas para meio LB líquido e incubadas a 37°C durante a noite com agitação. Assim, para estas cepas em TGHP, o tempo de cultivo de 12 horas foi adotado.



**Figura 21 – Sobrevivência de bactérias selvagens (linhas cheias) e mutantes  $\Delta phoB/R$  (linhas tracejadas), pré-cultivadas em TGLP, ao DOC 0,2%. As cepas, inclusive O395SR e WK8, foram cultivadas por 14 horas em TGLP antes do choque com DOC 0,2% por alguns minutos. A sobrevivência foi determinada por plaqueamento em LB-ágar 1,5%, como descrito no item 3.5 (Material e Métodos).**

Os resultados nas Figuras 20 e 21 mostram que as cepas selvagens foram mais resistentes ao DOC 0,2% do que seus respectivos mutantes  $\Delta phoB/R$ , após os pré-cultivos em

TGHP ou TGLP. A cepa O395SR foi, dentre todas, a que mais resistiu ao DOC 0,2% após pré-cultivos em ambos os meios. Quanto à 569BSR e N16961SR em THGP, no primeiro minuto no DOC 0,2%, a sobrevivência da 569BSR caiu para cerca de 40% e a de N16961SR para aproximadamente 70%. Após 5 minutos, no entanto, a cepa N16961SR, após ter sua sobrevivência reduzida a 25% em 2 min, apresentou uma recuperação, chegando a 30% de sobrevivência. A cepa 569BSR, por outro lado, se mostrou incapaz de recuperação, atingindo uma taxa de sobrevivência de 10% em 5 min.

As cepas selvagens, que expressam PhoE<sup>Vc</sup> na membrana externa, ou seja, as pré-cultivadas em TGLP, se mostraram, em geral, mais resistentes ao DOC 0,2% do que as proveninetes da cultura em TGHP, que não expressam esta proteína. (Figuras 20 e 21). Dentre estas, O395SR se destacou como a de maior resistência ao detergente, nesta condição, apresentando uma queda mínima de sobrevivência nos primeiros 2 minutos e chegando uma mortalidade de apenas de 15% após 5 minutos no DOC 0,2%. Quanto às cepas 569BSR e N16961SR pré-cultivadas em TGLP, a última foi, dentre as duas, a que apresentou menor sensibilidade ao detergente ao longo dos 5 minutos. Curiosamente, a cepa 569BSR proveninete de TGLP, no primeiro minuto, sofreu uma queda de sobrevivência semelhante à observada para as células pré-cultivadas em TGHP. Entretanto, após 5 minutos, as primeiras mostraram uma capacidade de recuperação (sobrevivência de 40%) não observada nas pré-cultivadas em TGHP (sobrevivência de cerca de 10%).

Quanto aos mutantes  $\Delta phoB/R$  WK8 e WK10, o pré-cultivo em TGHP, lhes garantiu maior sobrevivência em DOC 0,2%, ao contrário do verificado para suas cepas parentais (Figuras 20 e 21). WK3, independentemente das condições de pré-cultivo, foi a cepa que apresentou maior sensibilidade ao DOC 0,2%, em acordo com o observado para a sua cepa parental 569SBR, que dentre as cepas selvagens de *V. cholerae* testadas foi também a mais sensível ao DOC 0,2% (Figuras 20 e 21).

## **5. Discussão**

### 5.1. Plasticidade da membrana externa de *V. cholerae*

A membrana externa de bactérias Gram-negativas constitui uma eficiente barreira adaptativa que protege as células contra agentes tóxicos do meio extracelular. Ela é assimétrica em composição, possuindo uma camada interna de fosfolipídios e uma externa, quase exclusivamente formada por lipopolissacarídeos (LPS), que funcionam como um filtro molecular para substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas (NIKAIDO, 2003). Nesta estrutura, encontram-se ainda moléculas protéicas (OMPs), que constituem cerca de 50% da massa da membrana externa, e podem ser integrais ou ancoradas a lipídeos, as lipoproteínas. Muitas delas estão envolvidas no transporte de íons e nutrientes para o periplasma. As OMPs estão diretamente envolvidas na sobrevivência e adaptação de bactérias Gram-negativas aos mais variados ambientes. Portanto, sua expressão é freqüentemente regulada por sinais ambientais e, dependendo da classe da OMP e da espécie bacteriana, estas proteínas podem atingir cerca de  $10^4 - 10^6$  cópias por célula (LIN e cols., 2002; NIKAIDO, 1999). Assim sendo, a membrana externa é uma estrutura cuja composição protéica é altamente dinâmica, podendo variar em termos de qualidade e/ou quantidade de proteínas individuais, embora, de acordo com observações anteriores, as células tendam a manter aproximadamente constante o número total de OMPs (RAO e TORRIANI, 1990; VILAIN e cols., 2002). A importância das OMPs, principalmente OmpU e OmpT, na fisiologia e virulência of *V. cholerae* já foi demonstrada por vários pesquisadores (PROVENZANO e KLOSE, 2000; SIMONET e cols., 2003; WIBBENMEYER e cols., 2002). Neste trabalho, esta versatilidade de composição protéica da membrana externa de cepas de *V. cholerae* O1 foi mais uma vez observada pela passagem de células de um meio complexo (LB) para um meio definido (TG). Células de três cepas de *V. cholerae*, duas do biotipo clássico (569BSR e O395SR) e uma El Tor (N16961SR) tiveram seus perfis de OMPs alterados profundamente ao serem transferidas do meio LB para o TGHP. Em LB, a OMP majoritária nas três cepas foi identificada como

OmpU (cerca de 90% das OMPs expressas), uma porina catiônica de *V. cholerae* (Chakrabarti, *et al.*, 1996). Em TGHP, entretanto, O395SR apresentou uma redução nos níveis de OmpU e passou a apresentar na membrana externa níveis equivalentes de OmpT (aproximadamente 40% de cada), uma porina de baixa seletividade iônica. As cepas 569BSR e N16961SR, por outro lado, apresentaram uma alteração mais drástica na composição da OM, com a substituição de toda OmpU por OmpT (representando 96% das OMPs). Esta substituição total ou parcial de uma porina de maior para uma de menor seletividade iônica é, aparentemente, uma estratégia de sobrevivência em um meio pobre, onde os nutrientes são qualitativa e quantitativamente reduzidos e a baixa seletividade das porinas, neste caso, seria uma vantagem adaptativa que facilitaria a sobrevivência.

Dentre os mutantes  $\Delta phoB/R$ , chamou a atenção a composição de OMPs de WK3 em LB (cerca de 50% OmpU e OmpT), bem distinta da de sua cepa parental, 569BSR (que possui 96% de OmpU), sugerindo a possibilidade de que a deleção de *phoB/R*, direta ou indiretamente, tenha afetado a expressão destas porinas, embora não haja dados na literatura relacionando um papel para o SDC PhoB/R na regulação da expressão de OmpT e OmpU. A passagem de WK3 de LB para TGHP não causou alterações drásticas na composição da membrana externa. Por outro lado, os mutantes WK8 e WK10, que em LB apresentaram perfis de OMP semelhantes aos de suas cepas parentais, quando transferidos para TGHP, passaram a apresentar na membrana externa OmpT em níveis que variaram com a cepa. Esta expressão diferencial de porinas entre as cepas O395SR e N16961SR e seus mutantes  $\Delta phoB/R$  em uma mesma condição pode ser um efeito direto ou indireto da mutação. Embora a expressão de OmpU e OmpT esteja sob regulação de ToxR/S (CHAKRABARTI e cols., 1996; CHAMPION e cols., 1997; CRAWFORD e cols., 1998; MILLER e MEKALANOS, 1988) e não haja informações sobre o envolvimento do PhoB/R no processo, os resultados

deste trabalho sugerem que uma interação entre os dois sistemas em *V. cholerae* O1 não deva ser descartada e que, portanto, seja investigada futuramente.

De qualquer modo, os resultados apresentados mostraram que a deleção de *phoB/R* afetou diferencialmente as cepas selvagens analisadas, aumentando a lista das distinções entre cepas de biotipos diferentes (clássico e El Tor) e, principalmente, entre cepas do mesmo biotipo, no caso, entre as clássicas, 569BSR e O395SR.

A passagem das células de LB para TGLP evidenciou novamente esta plasticidade da membrana externa das bactérias Gram-negativas. Neste trabalho, é mostrado que além da cepa 569BSR, como já havia sido demonstrado (VON KRÜGER e cols., 1999; VON KRÜGER e cols., 2006), outras cepas do biotipo clássico (O395SR) e El Tor (N16961SR) também incorporaram uma nova OMP (PhoE<sup>Vc</sup>), identificada como produto de *vca1008*, em condições de escassez de Pi. Isso sugere que esta estratégia possa ser utilizada por outros membros da família *Vibrionaceae* para captar nutrientes (principalmente fosfato) presentes em concentrações muito baixas (μmolar), quando a difusão passiva pelas porinas pré-existentes não é eficiente. De maneira semelhante, quando se encontra em meio deficiente de Pi, *E. coli* expressa a PhoE<sup>Ec</sup>, uma porina com similaridade a PhoE<sup>Vc</sup>, que transporta preferencialmente ânions, apesar de não apresentar especificidade por Pi (NIKAIDO, 2003). A dependência de PhoB/R para expressão de *vca1008* nas cepas de *V. cholerae* analisadas ficou demonstrada pelo fato de que os mutantes *phoB/R* não apresentaram PhoE<sup>Vc</sup> na membrana externa em TGLP. Estes mutantes, apesar de expressarem duas porinas, OmpU e OmpT (OmpS, no caso de WK10), sobrevivem mal em TGLP (VON KRÜGER e cols., 1999) enfatizando a importância de uma OMP com características de fosfoporina para captação do Pi do meio, quando este se encontra em concentrações muito baixas. Naturalmente, a deficiência de outros sistemas de captação e metabolismo de Pi (codificados por membros do

regulon Pho, tais como a fosfatase alcalina e PstS, entre outros) também dificulta a sobrevivência dos mutantes  $\Delta phoB/R$  de *V. cholerae* em TGLP.

### 5.2. A proteína PhoE<sup>Vc</sup>: uma (fosfo)porina?

O produto de *vca1008* (PhoE<sup>Vc</sup>) identificado em cepas de *V. cholerae* dos biotipos clássico e El Tor é uma proteína de membrana externa, induzida por limitação de Pi com expressão dependente de PhoB/R. Análises preliminares demonstraram que a PhoE<sup>Vc</sup> apresenta 26,3% de identidade e 59,7% de similaridade com a fosfoporina PhoE<sup>Ec</sup>, além de similaridade também com outras porinas, incluindo OmpU de *V. cholerae* O1. A PhoE<sup>Vc</sup> foi recentemente descrita como essencial a colonização intestinal de modelos animais (OSORIO e cols., 2004) e, por esta razão, foi iniciada uma caracterização molecular detalhada da proteína, que aparentemente é um fator de virulência de *V. cholerae* regulado por PhoB/R, o que pode explicar, pelo menos em parte, a incapacidade de colonização de mutantes  $\Delta phoB/R$  (VON KRÜGER e cols., 1999).

Algumas ferramentas de bioinformática foram utilizadas para predição de características da molécula, algumas das quais foram confirmadas experimentalmente. Estas análises indicaram que o produto de *vca1008* é uma proteína secretada, que durante o processo de exportação perde um peptídeo sinal de 21 resíduos de aminoácidos, inserindo-se na membrana externa das células de *V. cholerae* O1. A predição funcional e de similaridade colocou a proteína entre os membros da superfamília das OMPs capazes de formar estruturas tipo barril com 16 folhas  $\beta$ , com potencial de atuar como filtro para compostos hidrofílicos, ou seja, com características de uma porina clássica (NIKAIDO, 2003). Outras propriedades das porinas clássicas, tais como formação de trímeros na sua forma funcional, e resistência a tratamentos térmicos e a detergentes (NIKAIDO, 2003), também foram comprovados experimentalmente para PhoE<sup>Vc</sup>. Assim sendo, nossa proposta é que a PhoE<sup>Vc</sup> se comporte

como uma fosfoporina em cepas de *V. cholerae*, permitindo, sob limitação de Pi no meio, uma captação mais eficiente deste íon.

A busca por resíduos de lisina importantes ao funcionamento e à característica aniônica da PhoE<sup>Ec</sup> (K<sup>18</sup>, K<sup>29</sup>, K<sup>64</sup> e K<sup>125</sup>) na seqüência da PhoE<sup>Vc</sup> sugere diferenças no caráter iônico dos poros destas proteínas. Isto pode ser exemplificado por um resíduo ácido na posição 18 (E<sup>18</sup>) ao invés de K<sup>18</sup>, importante na atração de ânions pela PhoE<sup>Ec</sup> (BAUER e cols., 1989). Quanto aos demais resíduos de lisina (29, 64 e 124), estes foram encontrados um pouco deslocados na estrutura primária de PhoE<sup>Vc</sup> em comparação a PhoE<sup>Ec</sup>, porém nas mesmas regiões de ambas as proteínas, ou seja, nas alças L1, L2 e L3, respectivamente, de acordo com predições da topologia da proteína. Curiosamente, todas as porinas putativas do gênero *Vibrio* que apresentam similaridade com PhoE<sup>Vc</sup>, também apresentam um resíduo ácido na posição 18 (E<sup>18</sup>), além dos três outros resíduos de K, em posições que poderiam ser funcionalmente equivalentes aos de PhoE<sup>Vc</sup>. Além disto, a montante dos genes de algumas destas proteínas de outras espécies do gênero *Vibrio*, foram identificadas caixa *pho* putativas, sugerindo uma regulação por Pi, com a participação de PhoB/R. Estes dados, embora necessitem de confirmações experimentais, sugerem que fosfoporinas da família *Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae* constituem dois grupos distintos.

### 5.3. Um papel para PhoE<sup>Vc</sup> na resistência à bile

A análise das seqüências primárias de OmpU e PhoE<sup>Vc</sup>, mostrou que essas proteínas compartilham 33% identidade e 62% de similaridade, o que a primeira vista, sugere proteínas com funções distintas. Entretanto, deve-se levar em conta que estas proteínas apresentam, entre as folhas  $\beta$  transmembranares, alças externas que interagem com elementos do meio exterior, e que, portanto, estão sujeitas a mutações freqüentes (NIKAIDO, 2003). Portanto, o mais importante antes de comparar proteínas da membrana externa é identificar as seqüências que formam folhas  $\beta$  transmembranares e então procurar similaridades. Assim, no caso de

porinas, uma alta identidade de seqüência primária, não supõe similaridade funcional; a porina catiônica OmpF e a aniônica PhoE<sup>Ec</sup>, por exemplo, ambas de *E. coli*, possuem 72% de identidade nas suas seqüências primárias e, no entanto, desempenham funções muito distintas na célula (NIKAIDO, 2003).

Testes de sensibilidade ao DOC, um dos componentes majoritários dos sais biliares, foram realizados com cepas selvagens e mutantes  $\Delta phoB/R$  de *V. cholerae* O1. Independente da condição de pré-cultivo, os mutantes  $\Delta phoB/R$  das cepas 569BSR, O395SR e N16961SR, mostraram sensibilidade ao DOC muito maior que seus respectivos isogênicos parentais, embora, todos eles, no momento de transferência para o meio com DOC, apresentassem OmpU nas suas membranas externas. WK10, por exemplo, pré-cultivada em TGHP, apresentou como OMP majoritária OmpU, uma porina de alta seletividade catiônica (SIMONET e cols., 2003) e, no entanto, sua sensibilidade ao DOC foi muito maior que a de que sua cepa parental N16961SR, que nas mesmas condições, apresentava na sua membrana externa praticamente apenas OmpT, sabidamente de menor seletividade que OmpU (SIMONET e cols., 2003). O mesmo raciocínio se aplica aos pares 569BSR/WK3 e O395SR/WK8 pré-cultivados em TGHP. No primeiro caso, a cepa 569BSR, com expressão majoritária de OmpT, mostrou-se mais resistente ao DOC que WK3 com quantidades semelhantes de OmpT e OmpU na membrana externa. No segundo exemplo, O395SR e WK8, nas condições mencionadas, possuem cada uma, quantidades equivalentes de OmpU e OmpT nas suas membranas externas, entretanto a sensibilidade ao DOC da cepa selvagem foi significativamente maior. Estes resultados somam-se a dados anteriores (VON KRÜGER e cols., 2006) que sugerem outras funções celulares para o sistema PhoB/R de *V. cholerae* além daquelas envolvidas no transporte e metabolismo de Pi, ou seja, também em meio abundante de Pi. Além disto, chamam atenção para o fato de que a super-expressão de OmpU não garante maior resistência ao DOC. Esta observação vem de encontro com os dados de Osorio

e cols. (2004) que mostraram que OmpU não é essencial a colonização de modelos animais por *V. cholerae*.

As células selvagens pré-cultivadas em TGLP, por outro lado apresentaram uma resistência ao DOC visivelmente maior que as pré-cultivadas em TGHP. Uma grande diferença entre elas foi a presença de PhoE<sup>Vc</sup> na membrana externa das pré-cultivadas em TGLP. Curiosamente, a cepa com maior percentual de PhoE<sup>Vc</sup> na membrana externa, ou seja O395SR, foi também a mais resistente ao DOC, seguida na ordem pela N16961SR e 569BSR, que possuem percentuais menores de PhoE<sup>Vc</sup>. Interessante também foi o fato da resistência ao DOC, aparentemente, não depender da presença de OmpU, que foi detectada apenas na membrana externa da cepa O395SR, em percentuais muito baixos.

A maior incorporação de PhoE<sup>Vc</sup> na membrana externa das cepas selvagens em TGLP/DOC é, aparentemente, resultado de uma ativação da transcrição de *vca1008* induzida pelo detergente no meio, como observado nos experimentos de fusão de operons. O aumento da expressão de *vca1008* e a incorporação de PhoE<sup>Vc</sup> na membrana externa parecem estar relacionados a uma maior resistência das células ao DOC. Portanto, estes dados são fortes indicadores do envolvimento de PhoE<sup>Vc</sup> na resistência aos sais biliares *in vitro*. Se considerarmos que *vca1008* é essencial à colonização e é expresso *in vivo*, como observado por Osorio e cols. (2004), podemos postular que OmpU pode não ter, *in vivo*, o mesmo papel que lhe é conferido *in vitro* na resistência à bile e que este papel pode ser exercido por sua ortóloga PhoE<sup>Vc</sup>. O intestino delgado é um meio rico em Pi, portanto, aparentemente inadequado para a expressão de um gene do regulon Pho. Entretanto, há inúmeras evidências (VON KRÜGER e cols., 2006), e neste trabalho apontamos e discutimos mais algumas, que sugerem que PhoB/R possam ter funções na fisiologia da bactéria além das já descritas e independentes do baixo nível extracelular de Pi. Alternativamente, pode-se supor que

membros individuais do regulon Pho, possam ter sua expressão regulada por outros sinais ambientais além de Pi, de forma dependente ou não de PhoB/R.

## **6. Conclusões**

- ✘ A membrana externa de *V. cholerae* O1 dos biotipos clássico e El Tor é uma estrutura dinâmica cuja composição varia qualitativa e quantitativamente em função do meio de cultura.
- ✘ O SDC PhoB/R está envolvido (direta ou indiretamente) na regulação da expressão de OMPs e, portanto, na plasticidade da membrana externa de *V. cholerae* O1.
- ✘ Sob limitação de Pi, de maneira dependente de PhoB/R, os biotipos clássico e El Tor de *V. cholerae* O1 incorporam PhoE<sup>Vc</sup> na membrana, o que é acompanhado por uma redução percentual de outras OMPs majoritárias.
- ✘ PhoE<sup>Vc</sup> tem características moleculares de uma (fosfo)porina:
  - 1- é uma OMP associada à parede celular que durante o processo de exportação perde um peptídeo sinal de 21 resíduos de aminoácidos
  - 2- possui similaridade com diversas porinas, entre elas a fosfoprina PhoE<sup>Ec</sup>, e a estrutura secundária predita para o monômero é um barril  $\beta$  composto de 16 cadeias  $\beta$  transmembranares.
  - 3- forma trímeros na membrana externa de *V. cholerae* O1 e é uma proteína resistente a tratamentos com detergentes e calor.
  - 4- possui três dos quatro resíduos de lisina importantes para a seletividade aniônica da porina PhoE<sup>Ec</sup>, em posições equivalentes na estrutura secundária predita para o monômero.
  - 5- tem similaridade com porinas putativas de outras espécies do gênero *Vibrio*, que também apresentam o resíduo E<sup>18</sup> e as três lisinas encontrados em PhoE<sup>Vc</sup>, em posições equivalentes nas estruturas secundárias preditas para seus monômeros.
- ✘ PhoE<sup>Vc</sup> parece desempenhar um papel na resistência de *V. cholerae* O1 aos sais biliares:
  - 1- células cultivadas na presença de DOC têm a expressão de PhoE<sup>Vc</sup> aumentada

- 2- o aumento da expressão de PhoE<sup>Vc</sup> em presença do DOC está relacionado à maior ativação do promotor *vca1008*.
- 3- células expressando PhoE<sup>Vc</sup> são mais resistente ao DOC.
- 4- a maior expressão de OmpU em *V. cholerae* O1 não determina, necessariamente, uma maior resistência ao DOC.



- ACHOUAK, W, HEULIN, T e PAGES, JM (2001).** Multiple facets of bacterial porins. *FEMS Microbiol Lett* **199**, 1-7.
- ALTSCHUL, SF, GISH, W, MILLER, W, MYERS, EW e LIPMAN, DJ (1990).** Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* **215**, 403-410.
- ALTSCHUL, SF, MADDEN, TL, SCHAFFER, AA, ZHANG, J, ZHANG, Z, MILLER, W e LIPMAN, DJ (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* **25**, 3389-3402.
- AUSUBEL, FM, BRENT, R, KINGSTON, RE, MOORE, DD, SEIDMAN, JG, SMITH, JA e STRUHL, K (1995).** *Short Protocols in Molecular Biology*: John Wiley & Sons, Inc.
- BAGOS, PG, LIAKOPOULOS, TD, SPYROPOULOS, IC e HAMODRAKAS, SJ (2004).** PRED-TMBB: a web server for predicting the topology of beta-barrel outer membrane proteins. *Nucleic acids research* **32**, W400-404.
- BAILEY, TL e GRIBSKOV, M (1998).** Methods and statistics for combining motif match scores. *Journal of Computational Biology* **5**, 211-221.
- BARUA, D (1992).** History of cholera. In *Cholera*, pp. 1-36. Edited by D. Baruae W. Greenough III. New York: Plenum Medical Book Co.
- BATEMAN, A, COIN, L, DURBIN, R, FINN, RD, HOLLICH, V, GRIFFITHS-JONES, S, KHANNA, A, MARSHALL, M, MOXON, S, SONNHAMMER, EL, STUDHOLME, DJ, YEATS, C e EDDY, SR (2004).** The Pfam protein families database. *Nucleic acids research* **32**, D138-141.
- BAUER, K, STRUYVE, M, BOSCH, D, BENZ, R e TOMMASSEN, J (1989).** One single lysine residue is responsible for the special interaction between polyphosphate and the outer membrane porin PhoE of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* **264**, 16393-16398.
- BEGLEY, M, GAHAN, CG e HILL, C (2005).** The interaction between bacteria and bile. *FEMS microbiology reviews* **29**, 625-651.
- BENDTSEN, JD, NIELSEN, H, VON HEIJNE, G e BRUNAK, S (2004).** Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *Journal of molecular biology* **340**, 783-795.
- BENNISH, ML (1994).** Cholera: pathophysiology, clinical features, and treatment. In *Vibrio cholerae and Cholera: Molecular to Global Perspectives*, pp. 229-255. Edited by I. K. Wachsmuth, P. A. Blakee O. Olsvik. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- BENTIVOGLIO, M e PACINI, P (1995).** Filippo Pacini: a determined observer. *Brain research bulletin* **38**, 161-165.

- BERNSTEIN, C, BERNSTEIN, H, PAYNE, CM, BEARD, SE e SCHNEIDER, J (1999).** Bile salt activation of stress response promoters in *Escherichia coli*. *Current Microbiology* **39**, 68-72.
- BINA, JE e MEKALANOS, JJ (2001).** *Vibrio cholerae tolC* is required for bile resistance and colonization. *Infection and immunity* **69**, 4681-4685.
- CHAKRABARTI, SR, CHAUDHURI, K, SEN, K e DAS, J (1996).** Porins of *Vibrio cholerae*: purification and characterization of OmpU. *Journal of Bacteriology* **178**, 524-530.
- CHAMPION, GA, NEELY, MN, BRENNAN, MA e DIRITA, VJ (1997).** A branch in the ToxR regulatory cascade of *Vibrio cholerae* revealed by characterization of *toxT* mutant strains. *Mol Microbiol* **23**, 323-331.
- CHATTERJEE, A, CHAUDHURI, S, SAHA, G, GUPTA, S e CHOWDHURY, R (2004).** Effect of bile on the cell surface permeability barrier and efflux system of *Vibrio cholerae*. *Journal of bacteriology* **186**, 6809-6814.
- CLAVEL, T, LAZZARONI, JC, VIANNEY, A e PORTALIER, R (1996).** Expression of the *tolQRA* genes of *Escherichia coli* K-12 is controlled by the RcsC sensor protein involved in capsule synthesis. *Molecular Microbiology* **19**, 19-25.
- COLMER, JA, FRALICK, JA e HAMOOD, AN (1998).** Isolation and characterization of a putative multidrug resistance pump from *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **27**, 63-72.
- COLWELL, RR e SPIRA, WM (1992).** The ecology of *Vibrio cholerae*. In *Cholera*, pp. 107-127. Edited by D. Barua e W. B. Greenough. New York: Plenum Medical Book Company.
- COLWELL, RR e HUQ, A (1994).** *Vibrios* in environment: viable but nonculturable *Vibrio cholerae*. In *Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives*, pp. 117-133. Edited by I. K. Wachsmuth, P. A. Blakee O. Olsvik. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- COWAN, SW, SCHIRMER, T, RUMMEL, G, STEIERT, M, GHOSH, R, PAUPTIT, RA, JANSONIUS, JN e ROSENBUSCH, JP (1992).** Crystal structures explain functional properties of two *E. coli* porins. *Nature* **358**, 727-733.
- CRAWFORD, JA, KAPER, JB e DIRITA, VJ (1998).** Analysis of ToxR-dependent transcription activation of *ompU*, the gene encoding a major envelope protein in *Vibrio cholerae*. *Mol Microbiol* **29**, 235-246.
- DIGIUSEPPE, PA e SILHAVY, TJ (2003).** Signal detection and target gene induction by the CpxRA two-component system. *Journal of Bacteriology* **185**, 2432-2440.
- DIRITA, VJ, PARSOT, C, JANDER, G e MEKALANOS, JJ (1991).** Regulatory cascade controls virulence in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **88**, 5403-5407.

- DURET, G e DELCOUR, AH (2006).** Deoxycholic acid blocks *Vibrio cholerae* OmpT but not OmpU porin. *The Journal of biological chemistry* **281**, 19899-19905.
- ECHOLS, H, GAREN, A, GAREN, S e TORRIANI, A (1961).** Genetic control of repression of alkaline phosphatase in *E. coli*. *Journal of molecular biology* **3**, 425-438.
- FARACHE, J (2003).** Avaliação da atividade transcricional do operon *phoB/phoR* de *Vibrio cholerae*. Rio de Janeiro: IMPPG, UFRJ.
- FARUQUE, SM e MEKALANOS, JJ (2003).** Pathogenicity islands and phages in *Vibrio cholerae* evolution. *Trends in microbiology* **11**, 505-510.
- FINKELSTEIN, RA (1996).** Cholera, *Vibrio cholerae* O1 and O139, and other pathogenic *Vibrios*. In *Medical Microbiology*. Edited by S. Byron: The University of Texas Medical Branch at Galveston.
- FLAHAUT, S, FRERE, J, BOUTIBONNES, P e AUFFRAY, Y (1996a).** Comparison of the bile salts and sodium dodecyl sulfate stress responses in *Enterococcus faecalis*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 2416-2420.
- FLAHAUT, S, HARTKE, A, GIARD, JC, BENACHOUR, A, BOUTIBONNES, P e AUFFRAY, Y (1996b).** Relationship between stress response toward bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol Lett* **138**, 49-54.
- FONG, JC e YILDIZ, FH (2007).** The *rbmBCDEF* gene cluster modulates development of rugose colony morphology and biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology*.
- GANZLE, MG, HERTEL, C, VAN DER VOSSSEN, JMBM e HAMMES, WP (1999).** Effect of bacteriocin-producing lactobacilli on the survival of *Escherichia coli* and *Listeria* in a dynamic model of the stomach and the small intestine. *International Journal of Food Microbiology* **48**, 21-35.
- GARAVITO, RM e ROSENBUSCH, JP (1986).** Isolation and Crystallization of Bacterial Porin. *Methods in Enzymology* **125**, 309-328.
- GARDY, JL, LAIRD, MR, CHEN, F, REY, S, WALSH, CJ, ESTER, M e BRINKMAN, FS (2005).** PSORTb v.2.0: expanded prediction of bacterial protein subcellular localization and insights gained from comparative proteome analysis. *Bioinformatics (Oxford, England)* **21**, 617-623.
- GROSS, R, ARICO, B e RAPPUOLI, R (1989).** Families of bacterial signal-transducing proteins. *Mol Microbiol* **3**, 1661-1667.
- GUNN, JS (2000).** Mechanisms of bacterial resistance and response to bile. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **2**, 907-913.
- GUPTA, S e CHOWDHURY, R (1997).** Bile affects production of virulence factors and motility of *Vibrio cholerae*. *Infection and immunity* **65**, 1131-1134.

- HASE, CC e MEKALANOS, JJ (1998).** TcpP protein is a positive regulator of virulence gene expression in *Vibrio cholerae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 730-734.
- HEIRWEGH, K e EDMAN, P (1957).** Purification and N-terminal determination of crystalline pepsin. *Biochim Biophys Acta* **24**, 219-220.
- HIRANI, TA, SUZUKI, I, MURATA, N, HAYASHI, H e EATON-RYE, JJ (2001).** Characterization of a two-component signal transduction system involved in the induction of alkaline phosphatase under phosphate-limiting conditions in *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant molecular biology* **45**, 133-144.
- HOLMGREN, J, CLEMENS, J, SACK, DA e SVENNERHOLM, AM (1989).** New cholera vaccines. *Vaccine* **7**, 94-96.
- HSIAO, A, LIU, Z, JOELSSON, A e ZHU, J (2006).** *Vibrio cholerae* virulence regulator-coordinated evasion of host immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 14542-14547.
- HULETT, FM (1996).** The signal-transduction network for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **19**, 933-939.
- HUNG, DT e MEKALANOS, JJ (2005).** Bile acids induce cholera toxin expression in *Vibrio cholerae* in a ToxT-independent manner. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 3028-3033.
- IWANAGA, M, YAMAMOTO, K, HIGA, N, ICHINOSE, Y, NAKASONE, N e TANABE, M (1986).** Culture conditions for stimulating cholera toxin production by *Vibrio cholerae* O1 El Tor. *Microbiology and immunology* **30**, 1075-1083.
- JALAJAKUMARI, MB e MANNING, PA (1990).** Nucleotide sequence of the gene, *ompW*, encoding a 22kDa immunogenic outer membrane protein of *Vibrio cholerae*. *Nucleic acids research* **18**, 2180.
- JANSEN, C, HEUTINK, M, TOMMASSEN, J e DE COCK, H (2000).** The assembly pathway of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli*. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**, 3792-3800.
- JOHNSON, RS, MARTIN, SA e BIEMANN, K (1988).** Ion Processes *Int J Mass Spectrom* **86**, 137-154.
- KAKEDA, M, UEGUCHI, C, YAMADA, H e MIZUNO, T (1995).** An *Escherichia coli* curved DNA-binding protein whose expression is affected by the stationary-phase specific sigma-Factor Sigma(S). *Molecular & General Genetics* **248**, 629-634.
- KANDELL, RL e BERNSTEIN, C (1991).** Bile salt/acid induction of DNA damage in bacterial and mammalian cells: implications for colon cancer. *Nutrition and cancer* **16**, 227-238.

- KAPER, JB, FASANO, A e TRUCKSIS, M (1994).** Toxins of *Vibrio cholerae*. In *Vibrio cholerae and cholera: Molecular to global perspectives*, pp. 145-176. Edited by I. K. Wachsmuth, P. A. Blakee O. Olsvik. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- KAPER, JB, MORRIS, JG, JR. e LEVINE, MM (1995).** Cholera. *Clinical microbiology reviews* **8**, 48-86.
- KAY, BA, BOPP, CA e WELLS, JG (1994).** Isolation and Identification of *Vibrio cholerae* O1 from Fecal Specimens. In *Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives*, pp. 3-25. Edited by I. K. Wachsmuth, P. A. Blakee O. Olsvik. Washington, DC: American /society for Microbiology.
- KOEBNIK, R, LOCHER, KP e VAN GELDER, P (2000).** Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* **37**, 239-253.
- KOVACIKOVA, G, LIN, W e SKORUPSKI, K (2004).** *Vibrio cholerae* AphA uses a novel mechanism for virulence gene activation that involves interaction with the LysR-type regulator AphB at the *tcpPH* promoter. *Molecular Microbiology* **53**, 129-142.
- KROGH, A, LARSSON, B, VON HEIJNE, G e SONNHAMMER, EL (2001).** Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *Journal of molecular biology* **305**, 567-580.
- KRUKONIS, ES, YU, RR e DIRITA, VJ (2000).** The *Vibrio cholerae* ToxR/TcpP/ToxT virulence cascade: distinct roles for two membrane-localized transcriptional activators on a single promoter. *Molecular Microbiology* **38**, 67-84.
- KRUKONIS, ES e DIRITA, VJ (2003).** From motility to virulence: sensing and responding to environmental signals in *Vibrio cholerae*. *Current Opinion in Microbiology* **6**, 186-190.
- KUMAR, A, GRIMES, B, FUJITA, N, MAKINO, K, MALLOCH, RA, HAYWARD, RS e ISHIHAMA, A (1994).** Role of the sigma 70 subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase in transcription activation. *Journal of molecular biology* **235**, 405-413.
- LAEMMLI, UK (1970).** Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* **227**, 680-&.
- LANG, H e PALVA, ET (1993).** The *ompS* gene of *Vibrio cholerae* encodes a growth-phase-dependent maltoporin. *Mol Microbiol* **10**, 891-901.
- LEVERRIER, P, DIMOVA, D, PICHEREAU, V, AUFRAY, Y, BOYAVAL, P e JAN, GL (2003).** Susceptibility and adaptive response to bile salts in *Propionibacterium freudenreichii*: Physiological and proteomic analysis. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 3809-3818.
- LIN, J, HUANG, S e ZHANG, Q (2002).** Outer membrane proteins: key players for bacterial adaptation in host niches. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **4**, 325-331.

- LOWRY, OH, ROSEBROUGH, NJ, FARR, AL e RANDALL, RJ (1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* **193**, 265-275.
- MACIAN, F, PEREZ-ROGER, I e ARMENGOD, ME (1994).** An improved vector system for constructing transcriptional lacZ fusions: analysis of regulation of the *dnaA*, *dnaN*, *recF* and *gyrB* genes of *Escherichia coli*. *Gene* **145**, 17-24.
- MAKINO, K, SHINAGAWA, H e NAKATA, A (1985).** Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12: regulation and role of the regulatory gene *phoR*. *Journal of molecular biology* **184**, 231-240.
- MAKINO, K, SHINAGAWA, H, AMEMURA, M e NAKATA, A (1986a).** Nucleotide sequence of the *phoB* gene, the positive regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12. *Journal of molecular biology* **190**, 37-44.
- MAKINO, K, SHINAGAWA, H, AMEMURA, M e NAKATA, A (1986b).** Nucleotide sequence of the *phoR* gene, a regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli*. *Journal of molecular biology* **192**, 549-556.
- MAKINO, K, AMEMURA, H, AMEMURA, M e NAKATA, A (1994).** Mechanism of transcriptional activation of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. In *Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology*, pp. 5-12. Edited by A. Torriani-Gorini, E. Yagile S. Silver. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- MARSH, JW e TAYLOR, RK (1998).** Identification of the *Vibrio cholerae* type 4 prepilin peptidase required for cholera toxin secretion and pilus formation. *Mol Microbiol* **29**, 1481-1492.
- MATHUR, J e WALDOR, MK (2004).** The *Vibrio cholerae* ToxR-regulated porin OmpU confers resistance to antimicrobial peptides. *Infection and immunity* **72**, 3577-3583.
- MATSUDAIRA, P (1987).** Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *The Journal of biological chemistry* **262**, 10035-10038.
- MERRELL, DS, BAILEY, C, KAPER, JB e CAMILLI, A (2001).** The ToxR-mediated organic acid tolerance response of *Vibrio cholerae* requires OmpU. *Journal of Bacteriology* **183**, 2746-2754.
- MILLER, AD e MEKALANOS, JJ (1984).** Synthesis of cholera toxin is positively regulated at the transcriptional level by ToxR. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 3471-3475.
- MILLER, JF, MEKALANOS, JJ e FALKOW, S (1989).** Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science* **243**, 916-922.
- MILLER, JH (1972).** *A Short Course in Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

- MILLER, VL, TAYLOR, RK e MEKALANOS, JJ (1987).** Cholera toxin transcriptional activator *toxR* is a transmembrane DNA binding protein. *Cell* **48**, 271-279.
- MILLER, VL e MEKALANOS, JJ (1988).** A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations - osmoregulation of outer-membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires ToxR. *Journal of Bacteriology* **170**, 2575-2583.
- MORRIS, JG, JR. (1994).** Non-O Group 1 *Vibrio cholerae* strains not associated with epidemic disease. In *Vibrio cholerae and cholera: molecular to global perspectives*, pp. 103-115. Edited by I. K. Wachsmuth, P. A. Blakee O. Olsvik. Washington, D.C.: American Society for Microbiology.
- NANDI, B, NANDY, RK, SARKAR, A e GHOSE, AC (2005).** Structural features, properties and regulation of the outer-membrane protein W (OmpW) of *Vibrio cholerae*. *Microbiology (Reading, England)* **151**, 2975-2986.
- NESPER, J, SCHILD, S, LAURIANO, CM, KRAISS, A, KLOSE, KE e REIDL, J (2002).** Role of *Vibrio cholerae* O139 surface polysaccharides in intestinal colonization. *Infection and immunity* **70**, 5990-5996.
- NIKAIDO, H (1999).** Microdermatology: cell surface in the interaction of microbes with the external world. *Journal of Bacteriology* **181**, 4-8.
- NIKAIDO, H (2003).** Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **67**, 593-656.
- O'SHEA, YA, REEN, FJ, QUIRKE, AM e BOYD, EF (2004).** Evolutionary genetic analysis of the emergence of epidemic *Vibrio cholerae* isolates on the basis of comparative nucleotide sequence analysis and multilocus virulence gene profiles. *Journal of Clinical Microbiology* **42**, 4657-4671.
- OGAWA, N, SAITOH, H, MIURA, K, MAGBANUA, JP, BUN-YA, M, HARASHIMA, S e OSHIMA, Y (1995).** Structure and distribution of specific cis-elements for transcriptional regulation of PHO84 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **249**, 406-416.
- OSORIO, CG, MARTINEZ-WILSON, H e CAMILLI, A (2004).** The ompU Paralogue vca1008 is required for virulence of *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology* **186**, 5167-5171.
- OSORIO, CR e KLOSE, KE (2000).** A region of the transmembrane regulatory protein ToxR that tethers the transcriptional activation domain to the cytoplasmic membrane displays wide divergence among *Vibrio* species. *Journal of Bacteriology* **182**, 526-528.
- PACE, JL, CHAI, TJ, ROSSI, HA e JIANG, XP (1997).** Effect of bile on *Vibrio parahaemolyticus*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 2372-2377.
- PAETZEL, M, KARLA, A, STRYNADKA, NC e DALBEY, RE (2002).** Signal peptidases. *Chemical reviews* **102**, 4549-4580.

- PEDROSA, SA e XIMENES, RA (2003).** Validação do critério diagnóstico clínico-epidemiológico para confirmação da cólera *Rev Saúde Pública* **37(3)**, 292-296.
- PLESIAT, P e NIKAIDO, H (1992).** Outer membranes of Gram-negative bacteria are permeable to steroid probes. *Molecular Microbiology* **6**, 1323-1333.
- POOLE, K (2002).** Outer membranes and efflux: the path to multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Current pharmaceutical biotechnology* **3**, 77-98.
- PROVENZANO, D e KLOSE, KE (2000).** Altered expression of the ToxR-regulated porins OmpU and OmpT diminishes *Vibrio cholerae* bile resistance, virulence factor expression, and intestinal colonization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 10220-10224.
- PROVENZANO, D, SCHUHMACHER, DA, BARKER, JL e KLOSE, KE (2000).** The virulence regulatory protein ToxR mediates enhanced bile resistance in *Vibrio cholerae* and other pathogenic *Vibrio* species. *Infection and immunity* **68**, 1491-1497.
- PROVENZANO, D, LAURIANO, CM e KLOSE, KE (2001).** Characterization of the role of the ToxR-modulated outer membrane porins OmpU and OmpT in *Vibrio cholerae* virulence. *Journal of Bacteriology* **183 (12)**, 3652-3662.
- RAIVIO, TL (2005)** Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Molecular Microbiology* **56**, 1119-1128
- RALEIGH, EA, MURRAY, NE, REVEL, H, BLUMENTHAL, RM, WESTAWAY, D, REITH, AD, RIGBY, PWJ, ELHAL, J e HANAHAN, D (1988).** McrA and McrB restriction phenotypes of some *Escherichia coli* strains and implications for gene cloning. *Nucleic acids research* **16**, 1563-1575.
- RAO, NN e TORRIANI, A (1990).** Molecular aspects of phosphate-transport in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **4**, 1083-1090.
- RAO, PSS, LIM, TM e LEUNG, KY (2003).** Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis. *Infection and immunity* **71**, 1343-1351.
- RASKIN, DM, SESHADRI, R, PUKATZKI, SU e MEKALANOS, JJ (2006).** Bacterial genomics and pathogen evolution. *Cell* **124**, 703-714.
- REIDL, J e KLOSE, KE (2002).** *Vibrio cholerae* and cholera: out of the water and into the host. *FEMS microbiology reviews* **26**, 125-139.
- ROSENBERG, EY, BERTENTHAL, D, NILLES, ML, BERTRAND, KP e NIKAIDO, H (2003).** Bile salts and fatty acids induce the expression of *Escherichia coli* AcrAB multidrug efflux pump through their interaction with Rob regulatory protein. *Mol Microbiol* **48**, 1609-1619.

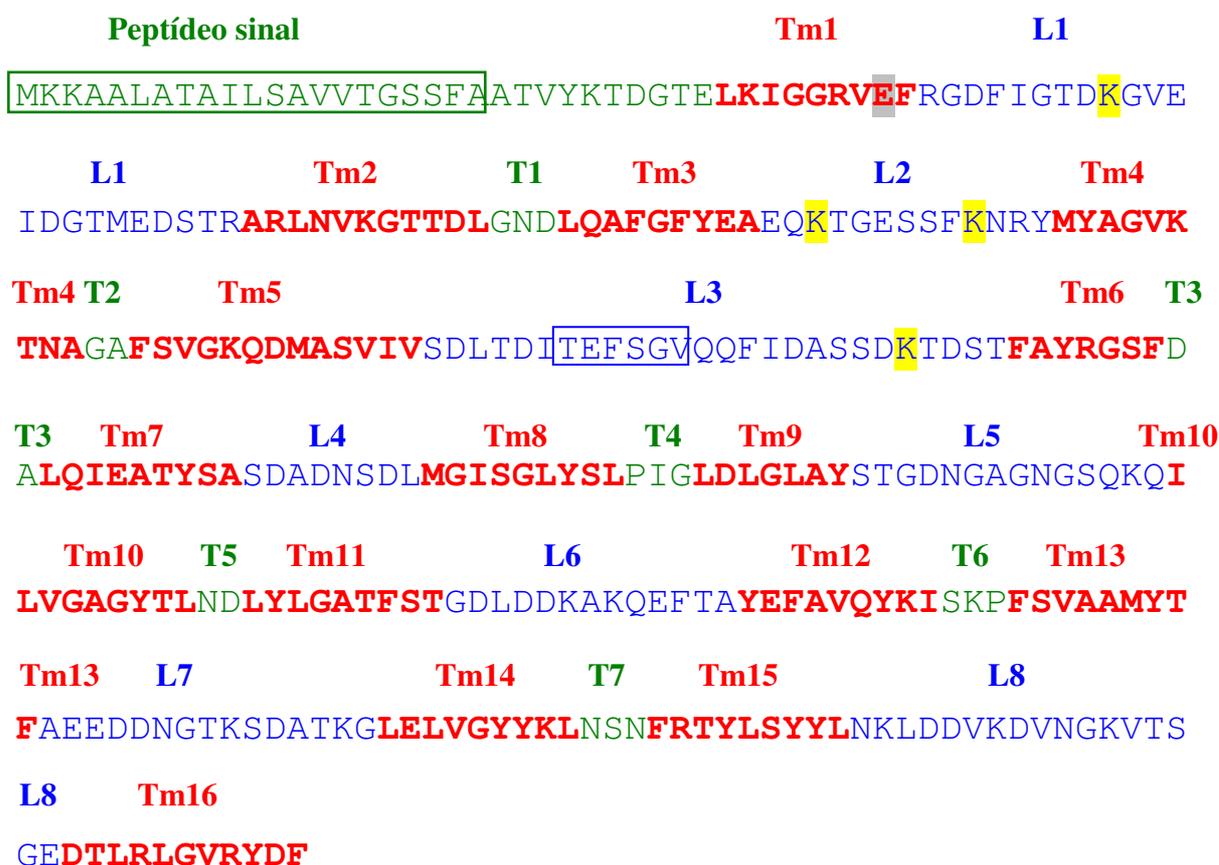
- ROSENBERG, H, GERDES, RG e CHEGWIDDEN, K (1977).** Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **131**, 505-511.
- ROSENBUSCH, JP (1974).** Characterization of the major envelope protein from *Escherichia coli*. Regular arrangement on the peptidoglycan and unusual dodecyl sulfate binding. *The Journal of biological chemistry* **249**, 8019-8029.
- ROY, NK, GHOSH, RK e DAS, J (1982).** Repression of the alkaline phosphatase of *Vibrio cholerae*. *J Gen Microbiol* **128**, 349-353.
- RUBIN, EJ, LIN, W, MEKALANOS, JJ e WALDOR, MK (1998).** Replication and integration of a *Vibrio cholerae* cryptic plasmid linked to the CTX prophage. *Mol Microbiol* **28**, 1247-1254.
- SACK, DA, SACK, RB, NAIR, GB e SIDDIQUE, AK (2004).** Cholera. *Lancet* **363**, 223-233.
- SAHU, GK, CHOWDHURY, R e DAS, J (1994).** Heat shock response and heat shock protein antigens of *Vibrio cholerae*. *Infection and immunity* **62**, 5624-5631.
- SAMBROOK, J, FRITSCH, EF e MANIATIS, T (1989).** *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- SANCHEZ, J, MEDINA, G, BUHSE, T, HOLMGREN, J e SOBERON-CHAVEZ, G (2004).** Expression of cholera toxin under non-AKI conditions in *Vibrio cholerae* El Tor induced by increasing the exposed surface of cultures. *Journal of Bacteriology* **186**, 1355-1361.
- SANDKVIST, M, MICHEL, LO, HOUGH, LP, MORALES, VM, BAGDASARIAN, M, KOOMEY, M, DIRITA, VJ e BAGDASARIAN, M (1997).** General secretion pathway (*eps*) genes required for toxin secretion and outer membrane biogenesis in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology* **179**, 6994-7003.
- SAVIJOKI, K, SUOKKO, A, PALVA, A, VALMU, L, KALKKINEN, N e VARMANEN, P (2005).** Effect of heat-shock and bile salts on protein synthesis of *Bifidobacterium longum* revealed by [S-35]methionine labelling and two-dimensional gel electrophoresis. *Fems Microbiology Letters* **248**, 207-215.
- SHEVCHENKO, A, WILM, M, VORM, O e MANN, M (1996).** Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Analytical chemistry* **68**, 850-858.
- SIMONET, VC, BASLE, A, KLOSE, KE e DELCOUR, AH (2003).** The *Vibrio cholerae* porins OmpU and OmpT have distinct channel properties. *The Journal of biological chemistry* **278**, 17539-17545.
- SNYDER, DS e MCINTOSH, TJ (2000).** The lipopolysaccharide barrier: correlation of antibiotic susceptibility with antibiotic permeability and fluorescent probe binding kinetics. *Biochemistry* **39**, 11777-11787.

- SONNHAMMER, EL, VON HEIJNE, G e KROGH, A (1998).** A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proceedings / International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology ; ISMB 6*, 175-182.
- SPERANDIO, V, GIRON, JA, SILVEIRA, WD e KAPER, JB (1995).** The OmpU outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae*. *Infection and immunity* **63**, 4433-4438.
- STEVENSON, G, LEAVESLEY, DI, LAGNADO, CA, HEUZENROEDER, MW e MANNING, PA (1985).** Purification of the 25-kDa *Vibrio cholerae* major outer-membrane protein and the molecular cloning of its gene: *ompV*. *European journal of biochemistry / FEBS* **148**, 385-390.
- STOCK, JB, NINFA, AJ e STOCK, AM (1989).** Protein-phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiological Reviews* **53**, 450-490.
- SUKHAN, A e HANCOCK, RE (1996).** The role of specific lysine residues in the passage of anions through the *Pseudomonas aeruginosa* porin OprP. *The Journal of biological chemistry* **271**, 21239-21242.
- TATUSOV, RL, KOONIN, EV e LIPMAN, DJ (1997).** A genomic perspective on protein families. *Science* **278**, 631-637.
- TATUSOV, RL, NATALE, DA, GARKAVTSEV, IV, TATUSOVA, TA, SHANKAVARAM, UT, RAO, BS, KIRYUTIN, B, GALPERIN, MY, FEDOROVA, ND e KOONIN, EV (2001).** The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic acids research* **29**, 22-28.
- TAYLOR, DN, SANCHEZ, JL, CASTRO, JM, LEBRON, C, PARRADO, CM, JOHNSON, DE, TACKET, CO, LOSONSKY, GA, WASSERMAN, SS, LEVINE, MM e CRYZ, SJ (1999).** Expanded safety and immunogenicity of a bivalent, oral, attenuated cholera vaccine, CVD 103-HgR plus CVD 111, in United States military personnel stationed in Panama. *Infection and immunity* **67**, 2030-2034.
- THANASSI, DG, CHENG, LW e NIKAIDO, H (1997).** Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **179**, 2512-2518.
- THELIN, KH e TAYLOR, RK (1996).** Toxin-coregulated pilus, but not mannose-sensitive hemagglutinin, is required for colonization by *Vibrio cholerae* O1 El Tor biotype and O139 strains. *Infection and immunity* **64**, 2853-2856.
- THOMPSON, JD, HIGGINS, DG e GIBSON, TJ (1994).** CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research* **22**, 4673-4680.

- TRACH, DD, CAM, PD, KE, NT, RAO, MR, DINH, D, HANG, PV, HUNG, NV, CANH, DG, THIEM, VD, NAFICY, A, IVANOFF, B, SVENNERHOLM, AM, HOLMGREN, J e CLEMENS, JD (2002).** Investigations into the safety and immunogenicity of a killed oral cholera vaccine developed in Viet Nam. *Bulletin of the World Health Organization* **80**, 2-8.
- VAN DIEN, SJ e KEASLING, JD (1998).** A dynamic model of the *Escherichia coli* phosphate-starvation response. *Journal of theoretical biology* **190**, 37-49.
- VAN VELKINBURGH, JC e GUNN, JS (1999).** PhoP-PhoQ-regulated loci are required for enhanced bile resistance in *Salmonella* spp. *Infection and immunity* **67**, 1614-1622.
- VERSHININA, OA e ZNAMENSKAYA, LV (2002).** The Pho regulons of bacteria. *Microbiology (Reading, England)* **71**, 497-511.
- VILAIN, S, COSETTE, P, JUNTER, GA e JOUENNE, T (2002).** Phosphate deprivation is associated with high resistance to latamoxef of gel-entrapped, sessile-like *Escherichia coli* cells. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49**, 315-320.
- VON KRÜGER, WM, HUMPHREYS, S e KETLEY, JM (1999).** A role for the PhoBR regulatory system homologue in the *Vibrio cholerae* phosphate-limitation response and intestinal colonization. *Microbiology (Reading, England)* **145 ( Pt 9)**, 2463-2475.
- VON KRÜGER, WM, LERY, LM, SOARES, MR, DE NEVES-MANTA, FS, BATISTA E SILVA, CM, NEVES-FERREIRA, AG, PERALES, J e BISCH, PM (2006).** The phosphate-starvation response in *Vibrio cholerae* O1 and *phoB* mutant under proteomic analysis: disclosing functions involved in adaptation, survival and virulence. *Proteomics* **6**, 1495-1511.
- WANG, Y (2002).** The function of OmpA in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* **292**, 396-401.
- WANNER, BL (1993).** Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J Cell Biochem* **51**, 47-54.
- WHO (2006).** Cholera 2005. In *Weekly Epidemiological Record*, pp. 297-308.
- WIBBENMEYER, JA, PROVENZANO, D, LANDRY, CF, KLOSE, KE e DELCOUR, AH (2002).** *Vibrio cholerae* OmpU and OmpT porins are differentially affected by bile. *Infection and immunity* **70**, 121-126.
- YUAN, ZC, ZAHEER, R e FINAN, TM (2006).** Regulation and properties of PstSCAB, a high-affinity, high-velocity phosphate transport system of *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology* **188**, 1089-1102.



Seqüência primária da VVA1129, uma OMP putativa de *V. vulnificus* YJ016, com as indicações das 16 regiões transmembranares (Tm 1-16, em vermelho), sete voltas perioplasmáticas (T 1-7, em verde) e oito alças externas (L 1-8, em azul). As lisinas supostamente envolvidas no funcionamento da proteína estão sombreadas em amarelo. O resíduo E<sup>18</sup> está marcado em cinza. O motivo TEFSGV está assinalado na L3.



Seqüência primária da VV20580, uma OMP putativa de *V. vulnificus* CMCP6, com as indicações das 16 regiões transmembranares (Tm 1-16, em vermelho), sete voltas perioplasmáticas (T 1-7, em verde) e oito alças externas (L 1-8, em azul). As lisinas supostamente envolvidas no funcionamento da proteína estão sombreadas em amarelo. O resíduo E<sup>18</sup> está marcado em cinza. O motivo TEFSGV está assinalado na L3.

Peptídeo Sinal Tm1 L1 Tm2  
MVTGSSFAATVYKTDGTE**LKIGGRVEF**RGDFIGTD**K**GVEIDGTMEDSTR**ARLN**

Tm2 T1 Tm3 L2 Tm4 T2 Tm5  
**VKGTTDL**GN**D**L**QAFGFYEA**E**Q****K**TGESS**F****K**NR**Y**MYAGVKT**NAGAF**SVG**KQDMAS**

Tm5 L3 Tm6 T3 Tm7 L4  
**VIV**SDLTDI**TEFSGV**Q**Q**FIDASS**D****K**TDST**FAYRGSF**DAL**QIEATYSAS**SDADNS

L4 Tm8 T4 Tm9 L5 Tm10 T5 Tm11  
DL**MGISGLYSLP**IG**LDLGLAY**STGDNGAGNGSQ**NQ**IL**VGAGYTL**ND**L**Y**L**GAT**F**

Tm11 L6 Tm12 T6 Tm13 L7 Tm14  
**STGDLDDKAKQEFTA****YEIAVQYKI**SK**P****F**S**V**A**A**MY**TF**AEEDDNGTKSDAT**KGLE**

Tm14 T7 Tm15 L8 Tm16  
**LVGYYKL**NS**N****F**RTYLS**YYL**NK**L**DDV**K**DVNG**K**VT**S**G**E**DT**L**RL**G**VRY**DF**

Seqüência primária da VPA0526, uma OmpU putativa de *V. parahaemolyticus* RIMD 2210633, com as indicações das 16 regiões transmembranares (Tm 1-16, em vermelho), sete voltas periplasmáticas (T 1-7, em verde) e oito alças externas (L 1-8, em azul). As lisinas supostamente envolvidas no funcionamento da proteína estão sombreadas em amarelo. O resíduo E<sup>18</sup> está marcado em cinza. O motivo TEFSGV está assinalado na L3.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)