

MARIA EDUARDA CAMPOS CASTRO DOS REIS

REGULAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À AQUISIÇÃO DO FOSFATO
NA CIANOACTÉRIA *RAPHIDIOPSIS RACIBORSKII*: LIGAÇÃO DO
ATIVADOR TRANSCRICIONAL AO DNA



Monografia apresentada ao Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como pré-requisito para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2024

Trabalho realizado no Laboratório de Física Biológica, do Programa de Biologia Molecular e Estrutural, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, sob a orientação da professora Ana Beatriz Furlanetto Pacheco.

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

C375r Campos Castro dos Reis, Maria Eduarda
Regulação de genes relacionados à aquisição do fosfato na cianobactéria *Raphidiopsis raciborskii*: ligação do ativador transcricional ao DNA / Maria Eduarda Campos Castro dos Reis. -- Rio de Janeiro, 2024.
52 f.

Orientadora: Ana Beatriz Furlanetto Pacheco.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2024.

1. Regulação transcricional. 2. Expressão gênica.
3. *Raphidiopsis raciborskii*. I. Furlanetto Pacheco, Ana Beatriz, orient. II. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA

ALUNO(A): MARIA EDUARDA CAMPOS CASTRO DOS REIS

DRE: 121075401

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Marcia Giambiagi de Marval (Presidente da Banca)
 Prof. Walter Martin Roland Oelemann
 Prof. Carolina Neumann Keim
 Prof. Marinella Silva Laport (Suplente)

Título da Monografia: "Regulação de genes relacionados à aquisição do fosfato na cianobactéria *Raphidiopsis raciborskii*: Ligação do ativador transcricional ao DNA"

Local: Sala D-27, no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ.

Data e hora de início: 10 de dezembro de 2024 às 09:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 9,7 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 10 de dezembro de 2024.

NOTA:

Banca Examinadora:

10

Marcia Giambiagi de Marval

Prof. Marcia Giambiagi de Marval (Presidente da Banca)

9,5

Walter Martin Roland Oelemann

Prof. Walter Martin Roland Oelemann

9,5

Carolina Neumann Keim

Prof. Carolina Neumann Keim

Prof. Marinella Silva Laport (Suplente)

Maria Eduarda Campos Castro dos Reis

Aluno(a):

Maria Eduarda Campos Castro dos Reis

**Orientador(a)
(e coorientador):**

Ana Beatriz F. Pacheco

Ana Beatriz Furlanetto Pacheco

**Coordenadora de
TCC:**

Marinella Silva Laport

Prof. Marinella Silva Laport

AGRADECIMENTOS

A realização deste Trabalho de Conclusão de Curso é resultado de uma jornada de aprendizado, superação e crescimento, que não teria sido possível sem o apoio, o incentivo e a colaboração de pessoas especiais ao longo do caminho.

Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pela força, pela saúde e pelas oportunidades que me permitiram chegar até aqui.

À minha mãe, Kleta Campos Castro, dedico um agradecimento especial. Seu amor, dedicação e sacrifícios foram fundamentais para que eu pudesse trilhar este caminho. Você foi meu porto seguro em todas as dificuldades e minha maior incentivadora em cada conquista. Sem seu exemplo de força e resiliência, nada disso seria possível. Este trabalho é, antes de tudo, uma forma de honrar tudo o que você representa para mim.

Aos meus pais e familiares, Abílio Neto, Guilherme Campos, Alda Mattos, Regina Coeli, Flávio Guimarães, e demais, que sempre me apoiaram incondicionalmente, agradeço pelo carinho, compreensão e incentivo nos momentos mais desafiadores. Suas palavras e gestos me deram coragem para seguir em frente e nunca desistir.

À minha orientadora, Ana Beatriz Furlanetto, expressei minha gratidão por sua paciência, dedicação e ensinamentos ao longo de todo o processo. Seus conselhos e didática foram essenciais para a construção deste trabalho e para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Agradeço ao CNPq e ao programa PIBIC pelo suporte financeiro e pela oportunidade de desenvolvimento acadêmico proporcionada ao longo desta jornada. O incentivo à pesquisa científica e o investimento no progresso educacional foram fundamentais para a realização deste trabalho. O apoio recebido não apenas viabilizou as condições necessárias para a conclusão deste estudo, mas também contribuiu significativamente para meu crescimento como pesquisadora.

Aos professores que tive durante toda a minha formação, agradeço por transmitirem não apenas conhecimento, mas também valores e inspiração para continuar aprendendo.

Aos colegas de curso, com quem compartilhei desafios e conquistas, sou grata pelas trocas de ideias e pelo apoio mútuo ao longo desta jornada.

Aos amigos e namorado, pela amizade, companheirismo, compreensão e incentivo, especialmente nos momentos em que precisei me dedicar mais intensamente aos estudos, e aos conhecidos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste projeto, meu muito obrigada.

Por fim, a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, participaram desta etapa tão importante da minha vida, expressei minha mais profunda gratidão. Este trabalho é uma conquista coletiva, e cada um de vocês ocupa um lugar especial nesta realização.

RESUMO

MARIA EDUARDA CAMPOS CASTRO DOS REIS

REGULAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À AQUISIÇÃO DO FOSFATO NA
CIANOBACTÉRIA *RAPHIDIOPSIS RACIBORSKII*: LIGAÇÃO DO ATIVADOR
TRANSCRICIONAL AO DNA

Orientador: Ana Beatriz Furlanetto Pacheco

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Cianobactérias são microrganismos aeróbios, fotoautotróficos, comuns em ambientes aquáticos. A eutrofização artificial vem aumentando a concentração de nitrogênio e fósforo (N e P) nos corpos d'água, induzindo seu crescimento que, em excesso, gera florações com alta densidade de células planctônicas. *Raphidiopsis raciborskii* é uma espécie de cianobactéria de distribuição mundial que possui diversas vantagens adaptativas, entre elas o armazenamento de fósforo (P). Como é capaz de fixar N, P torna-se o principal elemento limitante para seu crescimento. Bactérias sentem a concentração de P no ambiente por meio de proteínas receptoras de membrana (tipicamente PhoR) que transmitem sinal para proteínas efetoras citoplasmáticas (tipicamente PhoB) que regulam a transcrição gênica. Esse sistema de regulação chama-se regulon Pho e os genes envolvidos se relacionam com o metabolismo de fosfato, ex., o transportador de fosfato inorgânico PstS, além de outros que garantem aquisição, aproveitamento e estoque de P. O objetivo do trabalho é investigar a ligação do regulador transcricional PhoB de *R. raciborskii* a regiões regulatórias de genes envolvidos com o metabolismo de fosfato. Inicialmente, buscamos obter a proteína PhoB em sistema recombinante. Os métodos envolveram extração de DNA genômico de uma linhagem de *R. raciborskii* (ITEP), desenho de primers, amplificação do gene *phoB* por PCR, clonagem em vetor de expressão (pET28a), transformação de *E. coli* BL21DE3, indução da expressão e purificação de PhoB. Regiões regulatórias foram obtidas por amplificação de regiões a montante do operon *phoBR* e *pstSCAB*, ligação dos insertos em vetor (pGEMTeasy), transformação de *E. coli* DH5 α e obtenção dos fragmentos marcados de DNA por PCR. Testes de interação proteína (PhoB) e DNA (regiões regulatórias de *phoBR* e *pstSCAB*) *in vitro* foram realizados por retardo de mobilidade eletroforética (*Gel shift*) e proteção da digestão por DNase (*DNase footprint*). Como resultados, expressamos e purificamos a proteína PhoB recombinante e clonamos as regiões regulatórias permitindo obter os fragmentos de DNA marcados para os testes de interação. Através de *gel shift* foi possível observar a interação da proteína PhoB às regiões intergênicas. Ensaios de *DNase footprint* também indicaram a interação mas precisam ser otimizados. O avanço deste estudo irá permitir o mapeamento do sítio de ligação de PhoB aos genes regulados permitindo a busca futura de novos genes do regulon deste ativador transcricional.

Palavras chave: regulação transcricional; fósforo, cianobactérias

ABSTRACT

MARIA EDUARDA CAMPOS CASTRO DOS REIS

REGULATION OF PHOSPHATE ACQUISITION GENES IN THE
CYANOBACTERIUM *RAPHIDIOPSIS RACIBORSKII*: BINDING OF THE
TRANSCRIPTIONAL ACTIVATOR TO DNA

Orientador: Ana Beatriz Furlanetto Pacheco

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Cyanobacteria are aerobic, photoautotrophic microorganisms commonly found in aquatic environments. Artificial eutrophication has been increasing the concentration of nitrogen and phosphorus (N and P) in water bodies, promoting their growth which, in excess, leads to blooms with high densities of planktonic cells. *Raphidiopsis raciborskii* is a globally distributed cyanobacterial species with various adaptive advantages, including phosphorus (P) storage. Since it can fix nitrogen, phosphorus becomes the main limiting element for its growth. Bacteria sense environmental phosphorus concentrations through membrane receptor proteins (typically PhoR), which transmit signals to cytoplasmic effector proteins (typically PhoB) that regulate gene transcription. This regulatory system is known as the Pho regulon, and the associated genes are involved in phosphate metabolism, such as the inorganic phosphate transporter PstS, as well as others that ensure phosphate acquisition, utilization, and storage. The objective of this work was to investigate the interaction of the transcriptional regulator PhoB of *R. raciborskii* to regulatory regions of genes involved with the metabolism of phosphate. First, we obtained the PhoB protein in a recombinant system. The methods involved the extraction of genomic DNA from an *R. raciborskii* strain (ITEP), primer design, amplification of the *phoB* gene by PCR, cloning into an expression vector (pET28a), transformation into *E. coli* BL21DE3, PhoB protein expression and purification. Regulatory regions were obtained by amplifying upstream regions of the *phoBR* and *pstSCAB* operons. ligating the inserts into a vector (pGEMTeasy), transforming *E. coli* DH5 α and obtaining DNA labeled fragments by PCR. *In vitro* interaction assays with PhoB protein and DNA (regulatory regions of *phoBR* and *pstSCAB*) were performed through electrophoretic mobility shift assays (EMSA) and DNase footprinting. As results, we expressed and purified the recombinant PhoB protein and cloned the regulatory regions to obtain DNA labeled fragments for interaction assays. Gel shift results showed the binding of the PhoB protein to intergenic regions. *DNase footprint* also indicated these interactions, but need optimization. The advancement of this study will enable mapping of PhoB interaction sites upstream of regulated genes and the future research for new genes of the transcriptional activator regulon.

Keywords: transcriptional regulation; phosphorus; cyanobacteria

RESUMO PARA PESSOAS LEIGAS**MARIA EDUARDA CAMPOS CASTRO DOS REIS****COMO AS CIANOBACTÉRIAS SE ADAPTAM À FALTA DE FÓSFORO E SUAS
IMPLICAÇÕES NO AMBIENTE AQUÁTICO****Orientador: Ana Beatriz Furlanetto Pacheco**

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Cianobactérias são organismos microscópicos comuns em lagos, rios e outros ambientes aquáticos. Quando há muito fósforo e nitrogênio na água, como ocorre com a poluição, elas podem crescer exageradamente, formando o que chamamos de florações. Essas florações podem causar problemas ambientais, como a falta de oxigênio na água, prejudicando peixes e outros seres vivos. Neste projeto estudamos uma espécie chamada *Raphidiopsis raciborskii* que consegue sobreviver mesmo com poucos nutrientes na água porque armazena fósforo e fixa nitrogênio. Para se adaptar ao ambiente, ela usa um sistema que "sente" a quantidade de fósforo na água, ativando genes específicos que ajudam na captação e uso eficiente desse elemento. Nosso estudo investiga como *Raphidiopsis raciborskii* responde à falta de fósforo. Para isso, trabalhamos com uma proteína chamada PhoB, que regula os genes responsáveis por lidar com o fósforo. A partir da cianobactéria, retiramos o gene da proteína reguladora PhoB e produzimos a proteína em laboratório. Depois, testamos como a PhoB interage com certas regiões de DNA que controlam esses genes. Descobrimos que a PhoB se liga a regiões específicas do DNA, mostrando como essa bactéria pode ligar e desligar genes e ajustar seu metabolismo para competir com outros organismos. Esses resultados podem ajudar a entender melhor como evitar o crescimento descontrolado dessa espécie e minimizar seus impactos no ambiente.

Palavras chave: cianobactéria; fósforo; regulação de genes

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morfologia e distribuição de <i>Raphidiopsis raciborskii</i>	14
Figura 2 - Esquema de ativação do regulon <i>pho</i> por níveis de fosfato (Pi) e transporte de Pi	17
Figura 3 - Aspectos da estrutura da proteína PhoB	18
Figura 4 - Mapa do plasmídeo pET28a	21
Figura 5 - Esquema da indução da expressão da proteína PhoB recombinante e análise em SDS-PAGE	23
Figura 6 - Esquema da Purificação da proteína PhoB recombinante na fração solúvel e na fração insolúvel. 25	
Figura 7 - Localização dos operons <i>phoBR</i> e <i>pstSCAB</i> no genoma da linhagem de <i>R. raciborskii</i> Cr2010 ...	26
Figura 8 - Regiões intergênicas a montante do operon <i>phoBR</i> e do gene <i>pstS</i>	27
Figura 9 - Localização dos primers desenhados para amplificar as regiões intergênicas	28
Figura 10 - Vetor pGEM Teasy	29
Figura 11 - Esquema de transformação de <i>E. coli</i>	30
Figura 12 - Esquema das etapas necessárias para a realização do ensaio de <i>gel shift</i>	33
Figura 13 - Esquema das etapas necessárias para a realização do ensaio de <i>DNase footprint</i>	35
Figura 14 - SDS-PAGE 15%, mostrando os perfis de proteínas de <i>E. coli</i> DE3 após indução em diferentes condições para expressão da proteína recombinante PhoB	36
Figura 15 - SDS-PAGE 15%, com as amostras de frações de purificação da proteína recombinante PhoB em coluna de Ni-NTA	37
Figura 16 - Alinhamento das regiões intergênicas a montante de (A) <i>phoBR</i> (B) <i>pstS</i> nos genomas das linhagens ITEP-A1 e Cr2010 , genoma de referência [CP065936.1]	38
Figura 17 - Resultado da transformação de células <i>E. coli</i> DH5 α para obter as regiões intergênicas de interesse clonadas em pGEM	39
Figura 18 - Seleção de <i>E. coli</i> DH5 α contendo pGEM com as regiões intergênicas de interesse clonadas ..	39
Figura 19 - Alinhamento de sequência clonada em pGEMTeasy e região intergênica a montante de <i>phoBR</i> . 40	
Figura 20 - Alinhamento de sequência clonada em pGEMTeasy e região intergênica a montante de <i>pstS</i> ...	40
Figura 21 - Características dos clones obtidos	41
Figura 22 - Gel shift da ligação de PhoB em regiões regulatórias dos operons <i>pstSCAB</i> e <i>phoBR</i>	42
Figura 23 - Padrão de fragmentos de DNA gerados no ensaio de DNase footprint com região <i>phoBR</i>	43
Figura 24 - Padrão de fragmentos de DNA gerados no ensaio de DNase footprint com região <i>pstS</i>	44
Figura 25 - Possível localização de regiões reguladoras do operon <i>phoBR</i> e do gene <i>pstS</i>	45
Figura 26 - Busca por caixas <i>pho</i> nas regiões reguladoras do operon <i>phoBR</i> (A) e do gene <i>pstS</i> (B)	46

ÍNDICE

RESUMO	6
ABSTRACT	7
RESUMO PARA LEIGOS	8
LISTA DE FIGURAS	9
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Cianobactérias	12
1.2 Florações de cianobactérias e eutrofização	13
1.3 <i>Raphidiopsis raciborskii</i>	13
1.4 Resposta de <i>R. raciborskii</i> ao fosfato	15
1.5 Regulação da expressão gênica em resposta ao fosfato	15
2 JUSTIFICATIVA	20
3 OBJETIVO	20
3.1 Geral	20
3.2 Específico	20
4 METODOLOGIA	21
4.1 Expressão da proteína PhoB recombinante e avaliação da solubilidade	22
4.2 Análise de proteínas por eletroforese em gel de acrilamida desnaturante (SDS-PAGE) ..	23
4.3 Purificação a proteína PhoB recombinante	24
4.4 Análise e obtenção de regiões regulatórias	26
4.4.1 Análise de regiões regulatórias do operon <i>phoBR</i> e do gene <i>pstS</i> na linhagem de <i>R. raciborskii</i> ITEP-A1	26
4.4.2 Amplificação das regiões regulatórias	27
4.4.3 Clonagem das regiões regulatórias no vetor	29
4.4.4 Transformação de <i>Escherichia coli</i>	29
4.4.5 Seleção de clones recombinantes	31
4.5 Ensaio de ligação	31
4.5.1 Gel shift	32
4.5.2 DNase Footprint	34
5 RESULTADOS	35

5.1 Obtenção e purificação da proteína PhoB recombinante	35
5.2 Obtenção das regiões intergênicas de genes do regulon <i>pho</i>	38
5.3 Ensaio de ligação	41
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÃO	49
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

1.1. Cianobactérias

As cianobactérias são bactérias Gram-negativas, aeróbicas que obtêm energia principalmente através da fotossíntese. Cianobactérias capturam luz no espectro visível da radiação solar (400 to 700 nm) através de ficobilissomas, localizados nas membranas tilacóides. A energia é transferida para o fotossistema II e em menor grau para o fotossistema I. O fotossistema II quebra uma molécula de água liberando oxigênio e prótons. Os elétrons obtidos são transferidos em cadeia e atingem o fotossistema I, onde são usados para reduzir NADP. A cadeia de transporte de elétrons também gera um gradiente de prótons que será usado para síntese de ATP. NADPH e ATP serão usados nas reações de fixação de carbono da fase escura da fotossíntese (Reece, 2015). Uma vez que o início da vida na Terra foi possível apenas para microrganismos anaeróbios, pois a atmosfera se apresentava anóxica, acredita-se que alguns microrganismos fototróficos anoxigênicos evoluíram gerando cianobactérias. Estas surgiram há cerca de 2,7 bilhões de anos e sua atividade fotossintética foi gradualmente aumentando as concentrações de oxigênio livre ao longo de 200-300 milhões de anos, primeiro na água e depois na atmosfera. O Grande Evento de Oxigenação da atmosfera ocorreu entre 2,4 e 2,1 bilhões de anos, quando o teor de oxigênio livre passou a aumentar na atmosfera atingindo os níveis atuais. Esta alteração resultou na extinção de diversas formas de vida, pois o gás oxigênio foi tóxico para vários tipos de organismos, e favoreceu a evolução de formas de vida com metabolismo aeróbico e, depois, de formas de vida multicelulares (Madigan, 2016, Flores e Herrero, 2010). Grande parte dos microrganismos anaeróbios passaram a ocupar ambientes como solo e sub superfície de oceanos.

Podemos encontrar cianobactérias nas formas unicelulares, coloniais ou filamentosas. Vivem em ambientes aquáticos na grande maioria das vezes, de água doce, salobra ou salgada, podendo viver sob condições extremas, desde fontes termais a desertos e regiões polares (Olsson-Francis; Cockell, 2010). Também ocorrem em simbiose com fungos e plantas (Reece, 2015). Além disso, participam dos ciclos de carbono, oxigênio e do ciclo de nitrogênio, já que algumas espécies são capazes de fixá-lo (Flores e Herrero, 2010).

Algumas cianobactérias possuem mecanismos de defesa contra possíveis predadores, entre os quais está a produção de metabólitos secundários que ficam armazenados no citosol da célula, sendo liberados caso ocorra lise celular. Estas cianotoxinas, acidentalmente,

quando em contato com o ser humano e outros animais podem causar danos variados à saúde, afetando diferentes sistemas ou órgãos (fígado, pele, sistema nervoso), podendo até mesmo levar à morte por ingestão de água contaminada. Desta forma, a presença excessiva de cianobactérias em corpos d'água representa um sério problema para a saúde pública e para o meio ambiente (Azevedo, 1998).

1.2. Florações de cianobactérias e eutrofização

Eutrofização é o aumento excessivo de nutrientes no ambiente aquático, que está relacionado com o despejo de efluentes não tratados contendo matéria orgânica, ou ao processo de lixiviação, que carrega nutrientes para os corpos d'água. A alta concentração de minerais e nutrientes, principalmente o aumento da concentração de nitrogênio e fósforo, é capaz de induzir o crescimento de produtores primários, como cianobactérias, microalgas e plantas aquáticas. O crescimento excessivo de microrganismos planctônicos, ou seja, capazes de flutuar e se posicionar na coluna de água, é chamado de floração. Ele é seguido de decomposição de matéria orgânica, o que provoca diminuição dos níveis de oxigênio dissolvido na água e conseqüentemente pode levar a morte de espécies que ali vivem, gerando grandes efeitos negativos em ecossistemas aquáticos. Assim, o fenômeno da eutrofização está diretamente relacionado à formação de florações, sendo um dos maiores responsáveis por estes eventos (Azevedo, 1998; Schindler, 2012).

Há espécies de cianobactérias planctônicas capazes de se posicionar na coluna de água graças às vesículas de gás produzidas, que fazem as células ascenderem até a superfície para captar luz e descenderem para áreas mais ricas em nutrientes (Madigan, 2016). As florações estão relacionadas ao acúmulo de células em determinadas camadas da coluna d'água, na superfície ou sub-superfície, associado à sua alta proliferação, o que confere turbidez à água. As cianobactérias, quando se reproduzem em excesso, podem alterar algumas características da água, como cheiro, gosto e cor, além de tornar o ambiente em questão impróprio para banho, recreação e consumo de água, o que é agravado quando há produção de cianotoxinas (Azevedo, 1998; Schindler, 2012).

1.3. *Raphidiopsis raciborskii*

Raphidiopsis raciborskii (anteriormente *Cylindrospermopsis raciborskii*) é uma espécie de cianobactéria filamentosa encontrada em água doce com distribuição mundial (Fig. 1). É considerada uma espécie invasora e é capaz de formar florações em ambientes temperados e

tropicais. Apresenta vantagens adaptativas como tolerância a mudanças de temperatura, pH e salinidade, possibilidade de posicionamento na coluna d'água (vesículas de gás), capacidade de fixação de nitrogênio (células diferenciadas em heterocitos), armazenamento de fosfato, produção de cianotoxinas e formação de células de resistência (acinetos). Além disso, a espécie conta com uma variedade de ecotipos, linhagens que apresentam adaptações específicas a determinadas condições ambientais, o que confere maior flexibilidade e possibilidade de sobrevivência quando as condições ambientais mudam (Antunes et al., 2015; Burford et al., 2016).

As cianotoxinas produzidas por esta espécie são as cilindropermopsinas, alcalóides que atuam como inibidores de síntese protéica e têm principalmente ação citotóxica, encontradas em certas linhagens da Ásia e Oceania. Já na América do Sul, linhagens tóxicas produzem as saxitoxinas, alcalóides que têm efeito neurotóxico, causadoras de uma condição conhecida como PSP (*paralytic shellfish poisoning*) (Fig. 1). Ambas as toxinas causam danos à saúde de animais e seres humanos principalmente através da ingestão de água contaminada. As populações de *R. raciborskii* incluem também linhagens não tóxicas (Azevedo, 1998; Antunes et al., 2015; Burford et al., 2016).

Esta espécie de cianobactéria é uma das principais formadoras de florações em água doce no Brasil e no mundo, principalmente por conta do aumento de disponibilidade de nitrogênio e fósforo na água. Como a espécie tem capacidade de fixar o nitrogênio, a disponibilidade de fósforo torna-se a sua principal limitação para sobrevivência e crescimento.

(A)



(B)



Figura 1 - Morfologia e distribuição de *Raphidiopsis raciborskii* (A) Filamentos de *Raphidiopsis raciborskii* vistos em microscópio óptico. Fonte: Guedes, et al 2019. (B) Distribuição de *R. raciborskii* com indicação de locais de isolamento de linhagens produtoras de cilindropermopsina (•) e saxitoxinas (•), pontos pretos correspondem a linhagens não tóxicas. Fonte: Antunes et al., 2015.

1.4. Resposta de *R. raciborskii* ao fosfato

O controle do aporte de P em corpos d'água é uma estratégia proposta para mitigar a ocorrência de florações de cianobactérias. A melhor abordagem seria a redução contínua da entrada de nutrientes no corpo d'água. Porém, isso requer um planejamento complexo e de longo prazo. Soluções mais imediatas são aplicadas, incluindo tratamentos químicos que precipitam e em seguida imobilizam o P no sedimento. Um exemplo é a argila modificada com lantânio que liga o fósforo reativo solúvel, conhecida como *Phoslock*. Porém, caso essas medidas não sejam acompanhadas de ações que limitem a entrada de P, novamente haverá elevação de sua concentração na água e o efeito deste tipo de tratamento será transiente (Schindler, 2012). Nessa situação, dependendo de suas estratégias ecofisiológicas para lidar com a limitação de P, populações de cianobactérias podem persistir e voltar a formar florações. Desta forma, conhecer a relação entre cianobactérias e disponibilidade de P, assim como a sua resposta fisiológica às variações dos níveis desse nutriente, podem contribuir para a previsibilidade de formação de florações e de sua dinâmica após retirada desses nutrientes.

R. raciborskii é considerada uma espécie oportunista quanto ao uso de fósforo dissolvido. Ela responde à presença de fósforo no ambiente, ativando sistemas de captação e armazenamento, como a assimilação, pela enzima fosfatase alcalina, e o estoque, através de grânulos de polifosfato, competindo assim com outros componentes do fitoplâncton (Antunes et al., 2015; Guedes et al., 2019). Uma vez que o fósforo (P) é um nutriente limitante para a espécie, estudar a sua resposta à disponibilidade deste elemento se faz essencial para estratégias que buscam mitigar a ocorrência de florações por esta cianobactéria. Uma parte deste conhecimento se refere a compreender os mecanismos de resposta à disponibilidade de P por em nível molecular através da regulação da expressão gênica.

1.5. Regulação da expressão gênica em resposta ao fosfato

A regulação da expressão gênica opera no controle da ativação e repressão de genes envolvidos com a formação ou de um produto ou resposta celular adaptativa. Uma alteração do ambiente extracelular é transmitida para o meio intracelular por meio de proteínas de membrana sensoras/sinalizadoras que podem interagir com proteínas intracelulares e ativar a expressão de produtos gênicos (proteínas) como resposta. O mecanismo de sinalização mais comum, chamado de sistema de dois componentes, ocorre por meio de reconhecimento de estímulo extracelular por uma proteína sensora de membrana (quinase) que irá transmitir o

sinal, através de fosforilação, para a proteína reguladora intracelular, que age ativando a transcrição de genes de resposta (Beier e Gross, 2006).

O *regulon pho* é um sistema global de regulação de expressão gênica caracterizado pela resposta à disponibilidade de P em diversos microrganismos. Ele está relacionado à limitação de fosfato inorgânico (Pi) no ambiente extracelular, permitindo a síntese de proteínas que garantem a aquisição, o metabolismo e o estoque de P (Santos-Beneit, 2015; Garner & McCleary, 2019). O sistema de sinalização e resposta envolve um sistema de dois componentes, além de um transportador de membrana de alta afinidade a P (Fig. 2).

O mecanismo de sinalização apresenta PhoR como proteína sensora transmembrana que atua como histidina quinase, autofosforila, e depois transfere o sinal por meio de fosforilação de um resíduo de aspartato na proteína PhoB, e conseqüentemente torna funcional o ativador da transcrição. A proteína PhoB quando fosforilada se liga a sítios conservados em seqüências a montante dos genes regulados e favorecem a interação da RNA polimerase com o promotor e conseqüente início da transcrição. Em altos níveis de Pi, PhoR funciona como uma fosfatase de PhoB, impedindo que a resposta transcricional continue (Santos-Beneit, 2015; Garner & McCleary, 2019).

A comunicação entre PhoR e PhoB é mediada pela proteína reguladora PhoU, localizada na face interna da membrana citoplasmática e por proteínas componentes do sistema de transporte Pst (PstSCAB) (Fig. 2). Este é um sistema de transporte do tipo ABC (ATP-binding cassette) que hidrolisa ATP para transportar substratos através da membrana. PstS é a proteína que liga-se a Pi no periplasma, PstC e PstA são proteínas transmembrana e PstB liga-se ao ATP. É proposto que a ligação de ATP a PstB fecha a face citoplasmática do canal e dá acesso ao Pi ligado à face periplasmática por meio de PstS. Em seguida ocorreria hidrólise de ATP, que ao contrário, fecharia a cavidade periplasmática e abriria a citoplasmática, permitindo a entrada de Pi no citoplasma (Fig. 2B) (Garner & McCleary, 2019).

PhoU é uma proteína de membrana que modula o transporte de Pi e interage com o transportador PstSCAB. Quando os níveis de Pi são altos, PhoU impede o transporte excessivo de Pi pelo sistema Pst, interferindo com a ligação de PstB com ATP. É possível que PhoU forme um complexo de sinalização integrando PhoR e Pst (Fig 2A) (Garner & McCleary, 2019).

Assim, quando as concentrações de Pi são baixas (abaixo de 4 μM), PstS (componente do sistema de transporte Pst) muda de conformação e transmite sinal pelas outras proteínas do

transportador até a ATPase PstB. PstB interage com a proteína PhoU e esta interage com PhoR, que se fosforila e depois fosforila PhoB. A partir da fosforilação, PhoB passa a ser capaz de ativar a transcrição de genes do *regulon pho* (Santos-Beneit, 2015; Fitzgerald et al., 2023).

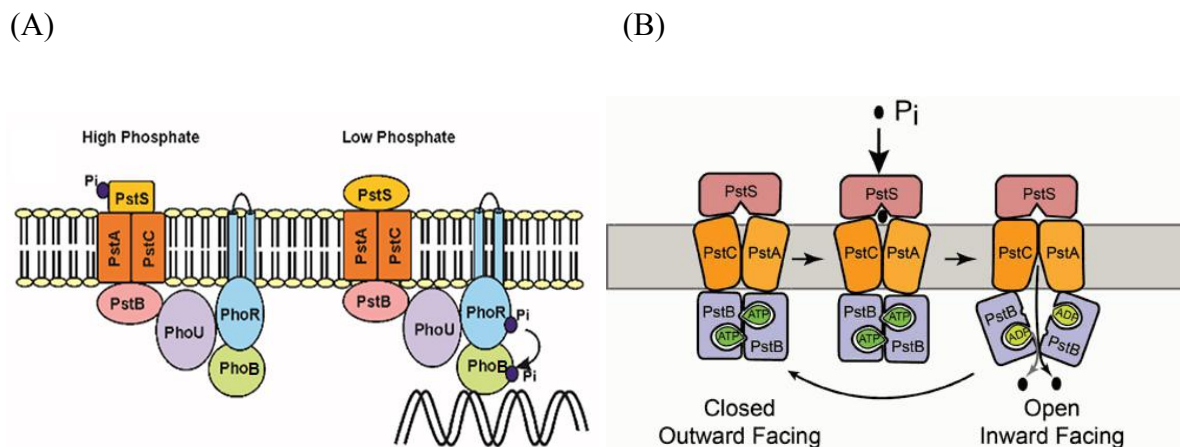


Figura 2 - Esquema de ativação do regulon *pho* por níveis de fosfato (Pi) e transporte de Pi. (A) O sistema de dois componentes PhoBR. PhoR é a sensora do sistema de 2 componentes e PhoB é o ativador da transcrição. Em baixa concentração de Pi, PhoR autofosforila e em seguida fosforila PhoB que passa a ativar a transcrição gênica. Fonte: Martín & Liras, 2021. (B) Transporte de Pi para o citoplasma por meio do sistema Pst. PstS, PstA, PstC, PstB formam um transportador de Pi de alta afinidade, PhoU é uma proteína reguladora negativa de PstB. Fonte: Garner & McCleary, 2019.

PhoB é uma proteína solúvel que consiste em um domínio regulador N-terminal de 123 resíduos unido por um “linker” de cinco resíduos a um domínio de ligação ao DNA C-terminal de 101 resíduos do tipo “*winged helix*” (hélice alada) (Fig. 3A). A proteína PhoB está incluída em uma grande família de fatores de transcrição (OmpR/PhoB) bacterianos com domínios de ligação ao DNA do mesmo tipo estrutural (Bachhawat et al., 2005). Proteínas que interagem com o DNA com domínios do tipo “*winged helix*” apresentam um motivo hélice-volta-hélice alado (*winged*), no qual as “asas” são pequenas folhas β . O motivo consiste de 2 asas (W1, W2), 3 α -hélices (H1, H2, H3) e mais 3 folhas β (S1, S2, S3) arranjados na ordem H1-S1-H2-H3-S2-W1-S3-W2 (Fig. 3B). Uma hélice de reconhecimento de DNA faz contatos específicos com certas sequências no sulco maior do DNA enquanto as asas fazem contatos com o sulco menor ou com o esqueleto açúcar-fosfato do DNA. Assim acontece no domínio C terminal de PhoB, no qual o reconhecimento do DNA se dá pela α -hélice 3, penetrando no sulco maior, enquanto uma asa e uma folha beta interagem com o sulco menor e o esqueleto do DNA (Fig. 3C). As alças de transativação se projetam em uma orientação apropriada para interagir com a subunidade sigma (70) da RNA polimerase, que desencadeia o início da transcrição. PhoB existe principalmente como um monômero e a

fosforilação favorece a dimerização, sendo que a proteína se liga ao DNA como um (ou mais) dímero (s) (Fig. 3C) (Blanco et al., 2002; Bachhawat et al., 2005).

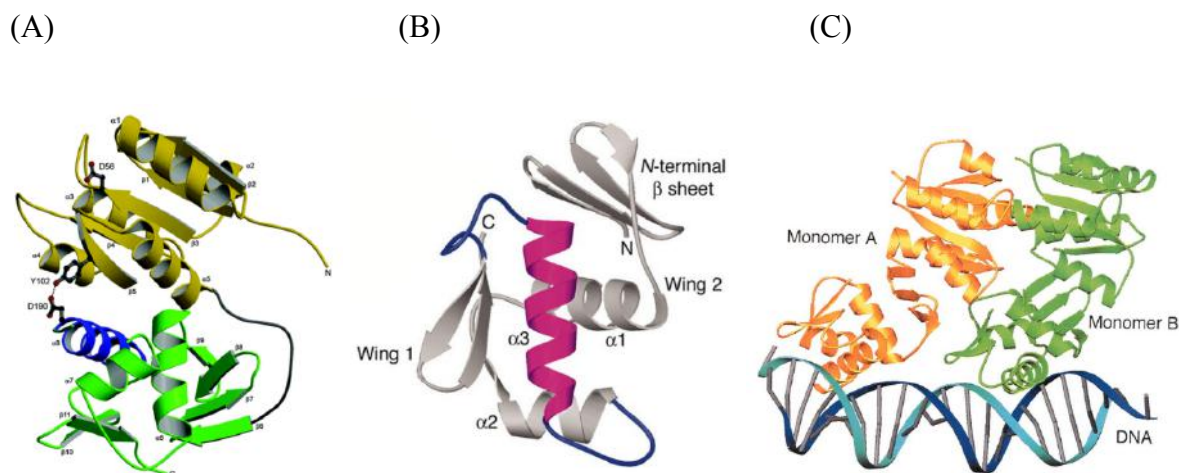


Figura 3 - Aspectos da estrutura da proteína PhoB (A) Domínio regulador em amarelo; sítio de fosforilação Ácido aspártico (D56), domínio de ligação ao DNA em verde com a hélice de reconhecimento em azul; . Fonte: <https://doi.org/10.1021/bi602546q> (B) Domínio motivo hélice-volta-vélice; Hélice de reconhecimento em rosa; Ligação flexível entre hélices em azul. Fonte: DOI:10.1128/JB.185.14.4186-4194.2003. (C) Domínio de ligação ao DNA (Dímero) interagindo com o DNA; Monômero A em amarelo; Monômero B em verde; DNA em azul. Fonte: DOI:10.1128/JB.185.14.4186-4194.2003.

No genoma de *Escherichia coli*, as regiões promotoras dos genes regulados por PhoB compartilham um elemento comum (caixa *pho*) que incluem duas repetições diretas de 11 pares de base (pb) contendo a sequência conservada CTGTCAT e mais quatro nucleotídeos menos conservados, em geral localizada dez nucleotídeos a montante das supostas regiões -10 dos promotores (Blanco et al., 2002; Bachhawat et al., 2005). Análises estruturais mostraram que o domínio C-terminal de ligação ao DNA, quando em contato com uma sequência de interação específica no DNA, se arranja em tandem com vários monômeros se ligando na forma “cabeça com cauda” a sucessivas sequências repetidas diretas de 11 pares de bases (Blanco et al., 2002).

Em *E. coli* e espécies relacionadas, o *regulon pho* inclui genes que codificam o sistema de transporte de fosfato de alta afinidade (*pst*), um sistema de transporte de fosfonato (*phn*) e o transportador de glicerol-3-fosfato (*ugp*), além de outros genes relacionados à homeostase de fosfato. O operon *phoBR* também é regulado por PhoB. Além disso, PhoB já foi relacionado a respostas mais diversificadas como a motilidade, formação de biofilme, quorum sensing, remodelação da superfície celular, resposta estressante e respostas a estresse (Gardner et al., 2019; Fitzgerald et al., 2023).

O *regulon pho* em cianobactérias foi mais bem estudado no gênero unicelular *Synechocystis*. Neste caso o sistema de dois componentes compreende o sensor SphS (ortólogo de PhoR em *E. coli*) e o regulador de resposta SphR (ortólogo de PhoB em *E. coli*) e funciona de maneira similar em resposta aos níveis de Pi no ambiente, formando um regulon semelhante ao *pho* de *E. coli* (Su et al., 2007). O regulon só foi definido experimentalmente em *Synechocystis sp.* PCC6803 (Sy6803) (Suzuki et al., 2004). Em vez de duas repetições de 11 pb em tandem como em *E. coli*, caixas *pho* em cianobactérias normalmente consistem em três repetições cada uma com 8 pb com a sequência de consenso (CTTAACCT), intercaladas por sequências de 3 pb (Suzuki et al., 2004; Su et al., 2007).

Um estudo de análise computacional de dados genômicos investigou o *regulon pho* em 19 cianobactérias (Su et al., 2007) e mostrou que o domínio de ligação ao DNA de SphR de 16 cianobactérias é altamente conservado, sugerindo que os sítios de ligação ao DNA de SphR nessas espécies provavelmente é conservado. Foi realizada uma busca por sítios de ligação de SphR por bioinformática nos vários genomas, o que sugeriu um motivo com três (ou duas) repetições em tandem conservadas (CTTAACCT) separadas por dois (ou um) espaços de 3 pb. Esse tipo de sequência regulatória foi encontrada em diferentes espécies de cianobactérias a montante de genes responsáveis pela utilização de diversas fontes de fósforo, como transportadores de fosfato inorgânico e fosfonatos, além de fosfatases (Su et al., 2007).

Em um estudo mais recente (Jin et al., 2021), foi analisada a regulação de genes da CP liase em uma linhagem de *Synechococcus* termofílico. Caixas *pho* foram identificadas na região a montante do *cluster* de genes de CP liase, e ensaios funcionais mostraram que elas regulam a expressão gênica de maneira dependente da concentração de Pi. Porém, a concentração de Pi que foi inibitória para a expressão gênica foi quase duas ordens de magnitude superior à de qualquer concentração encontrada em ambiente natural ou por ação antropogênica. A regulação foi mediada pelo *regulon pho* e a ausência (deleção) de SphS ou de SphR eliminaram a resposta à concentração de Pi. As três caixas *pho* em tandem (CTTAACCTTggtTTTAACTTcagTATCAGGC) a montante dos genes CP-liase apresentaram efeitos diferentes sobre a expressão gênica: uma delas não se mostrou essencial mas afetou a resposta das outras duas caixas (Jin et al., 2021).

2. JUSTIFICATIVA

A eutrofização crescente de ambientes aquáticos aumenta a disponibilidade de nutrientes, principalmente N e P, que estão diretamente relacionados à proliferação de cianobactérias e formação de florações. Esses eventos afetam a qualidade da água e representam um problema para a saúde pública através da produção de cianotoxinas nocivas aos seres humanos. *R. raciborskii* é uma das principais formadoras de florações em água doce no Brasil e no mundo, incluindo linhagens tóxicas.

Visto que o P é um nutriente limitante para a reprodução de *R. raciborskii*, o controle do aporte excessivo de P em corpos d'água e conseqüentemente a mitigação da formação de florações se faz essencial. A eficácia deste tipo de estratégia depende da investigação dos mecanismos de aquisição, metabolização e estoque de P em resposta à sua disponibilidade. Embora esse tema seja investigado em outras espécies de cianobactérias (Suzuki et al., 2004; Su et al., 2007; Jin et al., 2021), não se conhece muito sobre a base molecular e a complexidade deste sistema de regulação em *R. raciborskii* (Willis et al, 2019). Por exemplo, não há muitos estudos acerca da regulação da expressão gênica mediada por PhoB e os detalhes de sua ação após interação com o DNA. Desta forma buscamos obter a proteína PhoB pura a partir de expressão em sistema recombinante para posterior investigação da sua interação com regiões regulatórias no genoma de *R. raciborskii*.

3. OBJETIVO

3.1. Geral

Caracterizar a interação do ativador transcricional PhoB com regiões regulatórias próximas a promotores de genes de resposta a níveis de fosfato na cianobactéria *Raphidiopsis raciborskii*.

3.2. Específicos

Purificação da proteína PhoB por meio de indução da expressão em sistema recombinante de *Escherichia coli*.

Obtenção das regiões regulatórias de genes do *regulon pho* a partir do genoma de *Raphidiopsis raciborskii*.

Teste da interação da proteína PhoB pura e com regiões regulatórias dos genes do *regulon pho*, operon *phoBR* e operon *pstSCAB*, por ensaio de *gel shift* e *DNase footprinting*.

4. METODOLOGIA

Em uma etapa anterior do projeto, o gene *phoB* foi amplificado a partir do DNA genômico de uma linhagem de *Raphidiopsis raciborskii* (CYRF) e clonado no vetor de expressão pET28a (Novagen) (Fig. 4) (Guedes, 2023). Nessa construção, foi adicionada à proteína uma cauda de 6 Histidinas no N-terminal para facilitar a purificação. Foi realizada a transformação de *E. coli* BL21DE3, seleção de colônias resistentes a canamicina, purificação do plasmídeo recombinante e sequenciamento de DNA, confirmando a clonagem do gene (plasmídeo gerado pET28a *phoB*). Em seguida, foi realizado um teste de expressão da proteína recombinante em *E. coli* BL21DE3, o que resultou na produção desta proteína. A análise em SDS-PAGE mostrou indução de expressão de PhoB, gerando uma banda de cerca de 26 kDa no caso da cultura induzida, porém majoritariamente na forma insolúvel (Guedes, 2023).

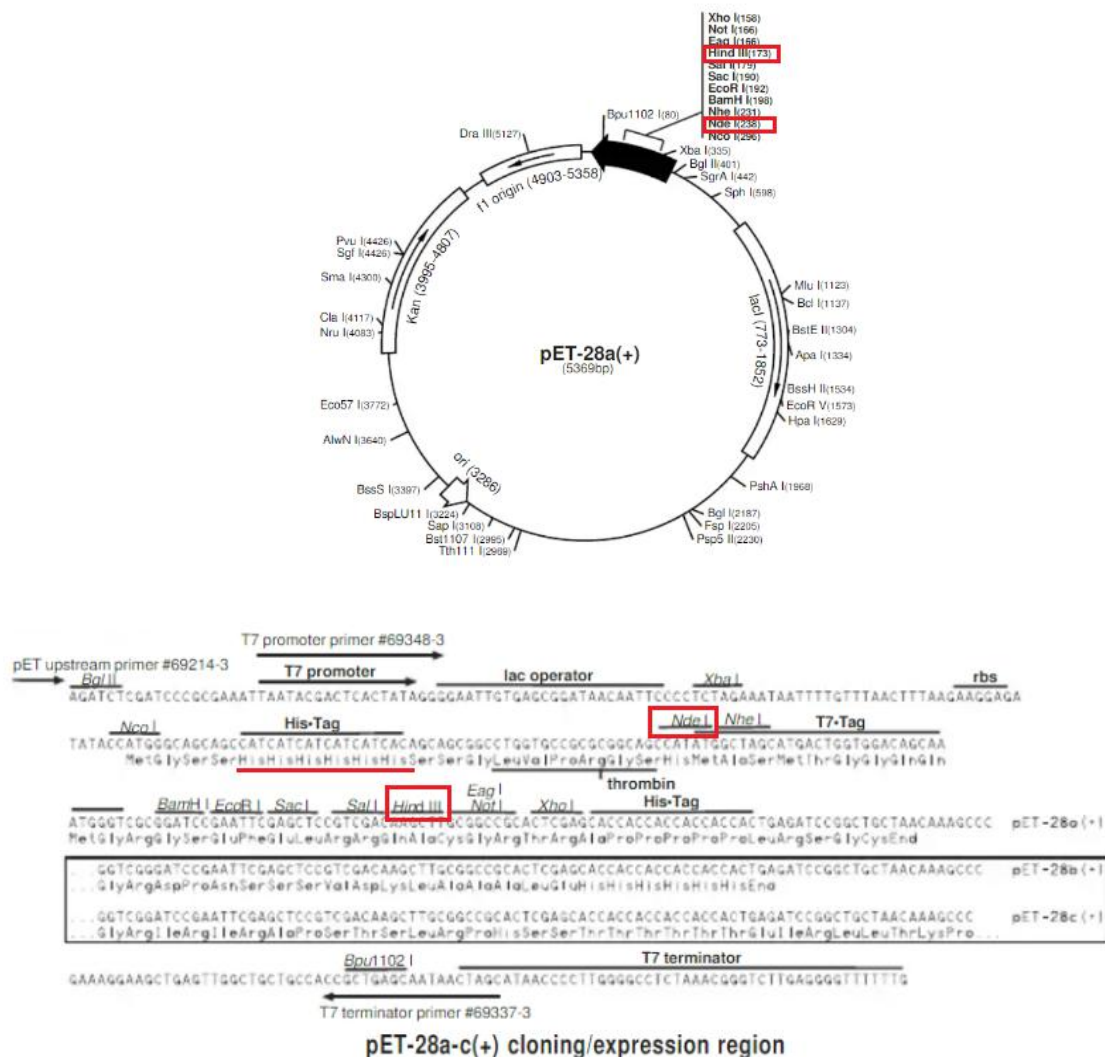


Figura 4 - Mapa do plasmídeo pET28a. Sítio múltiplo de clonagem com destaque para os sítios de restrição usados para clonagem do gene *phoB*. Fonte: Promega.

4.1. Expressão da proteína PhoB recombinante e avaliação da solubilidade

O primeiro teste de indução da expressão da proteína foi realizado em células *E. coli* BL21DE3 (10 a 50 mL) cultivadas em meio LB líquido a 37 °C em shaker por cerca de 2h até atingirem densidade óptica a 600 nm (OD600) de 0,6, correspondendo à fase exponencial de crescimento. Em seguida foi adicionado IPTG 1 mM e a cultura foi mantida nas mesmas condições por mais 3 h. As células foram colhidas e centrifugadas (14000 g 4 min) e os pellets ressuspensos em 1/10 do volume inicial de Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e NaCl 0,3 M. Depois foram adicionadas esferas de vidro (*glass beads*, 150-212 µm, G1145, Sigma Aldrich) e as células foram levadas no gelo para serem rompidas. Para lise celular foi usado o equipamento FastPrep-24 (MPbio) com 5 ciclos de intensidade de 4,5 M/S por 30 segundos, com intervalos de 2 minutos no gelo. O lisado foi deixado 5 min no gelo para decantar as esferas. O volume de líquido foi transferido para um novo tubo que foi centrifugado a 10000 g a 7 °C por 20 minutos. O sobrenadante foi coletado, correspondendo à fração solúvel. O precipitado foi separado, correspondendo à fração insolúvel. As duas frações foram analisadas separadamente em SDS-PAGE 15% para definir onde se encontrava a proteína recombinante.

Outros métodos alternativos de indução foram testados para se obter a proteína na fração solúvel, com as seguintes modificações em relação ao descrito anteriormente (Tabela 1). Um esquema ilustrativo das etapas envolvidas nesta metodologia é mostrado na Figura 5.

Tabela 1 - Condições de indução da expressão da proteína recombinante.

	(i)	(ii)	(iii)	(iv)	(v)
concentração de IPTG para indução	1 mM	0,2 mM	0,1 mM	0,1 mM	0,07 mM
temperatura de cultivo	20°C	25°C	18°C	18°C	18°C
tempo após indução	3 h	18 h	1:30 h e 30h	2:30 h, 4 h e 18 h	18 h

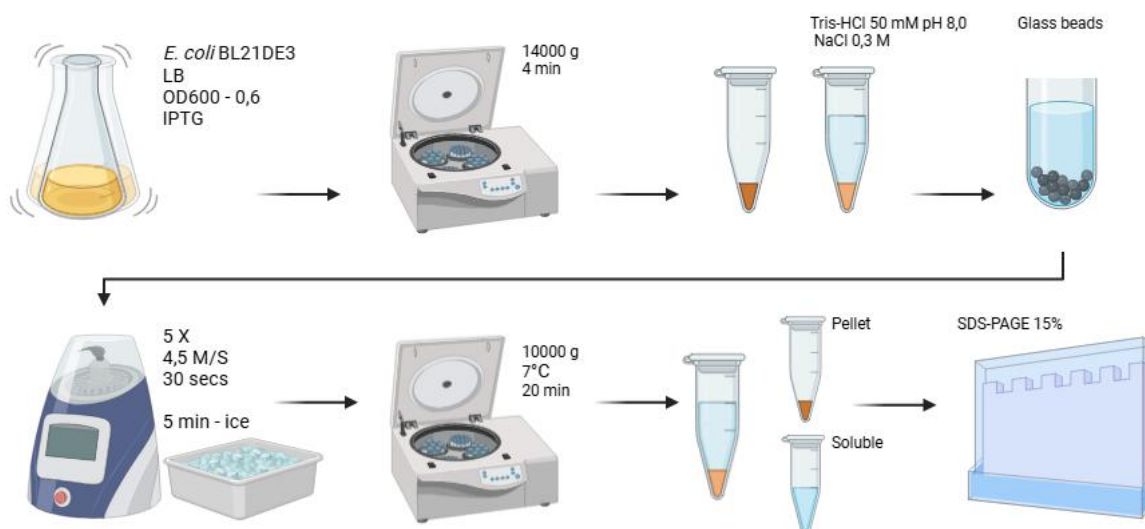


Figura 5 - Esquema da indução da expressão da proteína PhoB recombinante e análise em SDS-PAGE.

4.2. Análise de proteínas por eletroforese em gel de acrilamida desnaturante (SDS-PAGE)

Os lisados obtidos dos testes de indução foram analisados por eletroforese em gel de poli(acrilamida) (15%) contendo SDS (dodecil-sulfato de sódio). Uma alíquota da fração solúvel foi adicionada de igual volume de tampão de amostra 2x (125 mM Tris, 4% (p/v) SDS, 20% (v/v), glicerol e 0,01% (p/v), azul de bromofenol, 100 mM DTT). A fração insolúvel foi adicionada de 50 μ L de H₂O e foi adicionado o mesmo volume de tampão de amostra. Os tubos foram incubados a 100°C por 5 min e depois centrifugados a 12000 x g por 30 s. As amostras foram aplicadas em gel.

O gel de separação foi feito com H₂O 3,2 mL; Acrilamida/bis (37,5:1) 30% 4,2 mL; Tris-HCl (1,5 M, pH 8.8) 2,5 mL; SDS, 10% 100 μ L; TEMED 10 μ L; persulfato de amônio 10% 32 μ L. O stacking foi feito com H₂O 6,1 mL; Acrilamida/bis (37,5:1) 30% 1,3 mL; Tris-HCl (0,5 M, pH 6.8) 2,5 mL; SDS, 10% 100 μ L; TEMED 10 μ L; persulfato de amônio 10% 100 μ L. O tampão de corrida foi Tris Glicina: 0,025 M Tris, 0,192 M Glicina, 0,1% SDS pH 8,3. A corrida foi realizada a 100 V por 1h30 e após, os géis foram corados com a solução *Coomassie brilliant blue* 0,1% em metanol/ácido acético/água (45/10/45, v/v/v), e descorados com solução de metanol 40% (v/v) e ácido acético 10% (v/v) (Green; Sambrook, 2012). O gel incluiu um padrão de peso molecular de proteínas (Broad Range Protein Molecular Marker, Promega) para localizar a proteína PhoB, que possui massa molecular de 26 kDa.

4.3. Purificação da proteína PhoB recombinante

Para a purificação da proteína PhoB a partir de *E. coli* BL21DE3 + pET28a phoB foi usado o método de purificação por afinidade com resina de agarose e níquel (Ni-NTA), pois o níquel possui alta afinidade com histidinas e a proteína recombinante possui cauda de histidina N terminal. A eluição da proteína da resina foi realizada com imidazol em maior concentração, pois este é um alcalóide que, assim como a histidina, possui afinidade com o níquel e por isso compete e desloca a proteína da resina. Os protocolos de purificação foram baseados no guia The QIAexpressionist - (EN) [The QIAexpressionist - (EN) - QIAGEN] e no protocolo de Suzuki et al., 2004.

Para purificação da proteína a partir da fração solúvel, o volume foi aplicado em resina Ni-NTA pré-equilibrada com tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,3 M e imidazol 5 mM. A fração de proteínas foi incubada overnight com a resina a 4 °C, sob agitação. Em seguida, a resina foi montada em uma coluna e foi coletado o *flow through* (tampão de equilíbrio). Para as etapas seguintes foram testados três protocolos (Tabela 2).

Tabela 2 - Métodos testados para purificação da proteína recombinante em coluna de afinidade de níquel agarose, A e B condições usadas para fração solúvel, C condição usada para fração insolúvel. Em negrito as alterações feitas nos protocolos.

	A	B	C
tampão de lavagem 1	[2 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,3 M e Imidazol 20 mM]	[20 mL de TRIS-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,3 M e Imidazol 20 mM],	[10 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,3 M e Imidazol 10 mM, uréia 6M]
tampão de lavagem 2	-	[10 mL com Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM e Imidazol 20 mM],	-
tampão de eluição	[2 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,3 M e Imidazol 250 mM] coletado em 5 frações de aproximadamente 500 µL.	[4 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM e Imidazol 250 mM] coletado em 8 frações de aproximadamente 500 µL.	[4 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,3 M e Imidazol 250 mM, uréia 6M] coletado em 8 frações de aproximadamente 500 µL.

Para purificação a partir da fração insolúvel, após lise das células em Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e NaCl 0,3 M e separação das frações solúvel e insolúvel por centrifugação, o precipitado foi ressuspensão no mesmo tampão anterior contendo uréia 6M e imidazol 5 mM e incubado a 4 °C por 1h. Em seguida foi feita uma centrifugação a 10000 g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi incubado com a resina Ni-NTA pré equilibrada com o mesmo tampão [Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e NaCl 0,3 M, uréia 6 M, imidazol 5 mM] a 4 °C por 1h (Tabela 2C). As etapas de lavagem e eluição foram feitas na presença de uréia. Para retornar a proteína para condição não desnaturante, foi feita diálise (membrana de diálise de poro 3 kDa) contendo 500 mL de Tris-HCl 50mM, pH 8,0; NaCl 0,3 M, uréia 3M a 4 °C por 24 h seguido de troca de tampão para Tris-HCl 50mM, pH 8,0; NaCl 50 mM (500 mL) e incubação a 4 °C por 24 h. Um esquema ilustrativo das etapas envolvidas nesta metodologia é mostrado na Figura 6.

Em todos os casos, as frações das purificações foram analisadas em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%. A concentração de proteína nas frações purificadas foram determinadas por leitura de absorvância a 280 nm em espectrofotômetro Nanodrop (Thermo Scientific). As frações contendo a proteína purificada foram adicionadas de 0,1 mM de EDTA, 5% de glicerol e preservadas a -20 °C.

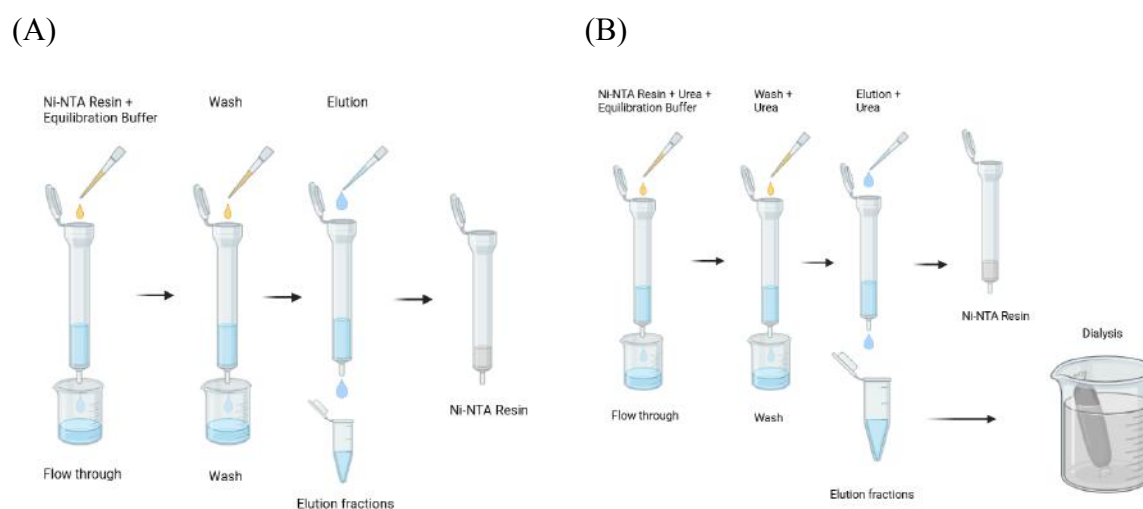


Figura 6 - Esquema da Purificação da proteína PhoB recombinante na fração solúvel (A) e na fração insolúvel (B).

4.4. Análise e obtenção de regiões regulatórias

4.4.1. Análise de regiões regulatórias do operon *phoBR* e do operon *pstSCAB* em *R. raciborskii*

Para testar a interação da proteína PhoB com as regiões regulatórias de genes do regulon *pho* foi necessário obter a sequência da região a montante do início da transcrição, na qual a proteína liga durante a regulação da transcrição. Para tal, primeiramente analisamos o posicionamento e as sequências das regiões a montante do operon *phoBR* e do gene *pstS* (operon *pstSCAB*) no genoma da linhagem de *R. raciborskii* Cr2010 (NCBI Reference Sequence: NZ_CP065936.1), que corresponde ao genoma de referência (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/datasets/genome/GCF_003367075.2/) (Fig. 7 e Fig 8).

Em uma etapa seguinte realizamos o alinhamento entre as sequências correspondentes do genoma da linhagem ITEP-A1 (que foi usada para amplificar as regiões por PCR) e da linhagem Cr2010. Essa linhagem (ITEP-A1) foi escolhida porque está disponível no banco de linhagens do laboratório e apresenta o genoma sequenciado (https://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/m/main.cgi?section=TaxonDetail&page=taxonDetail&taxon_oid=2728369583) (IMG Submission ID 126055). O alinhamento das sequências foi realizado com o programa *Geneious version 6.1* (Biomatters) (<http://www.geneious.com>).

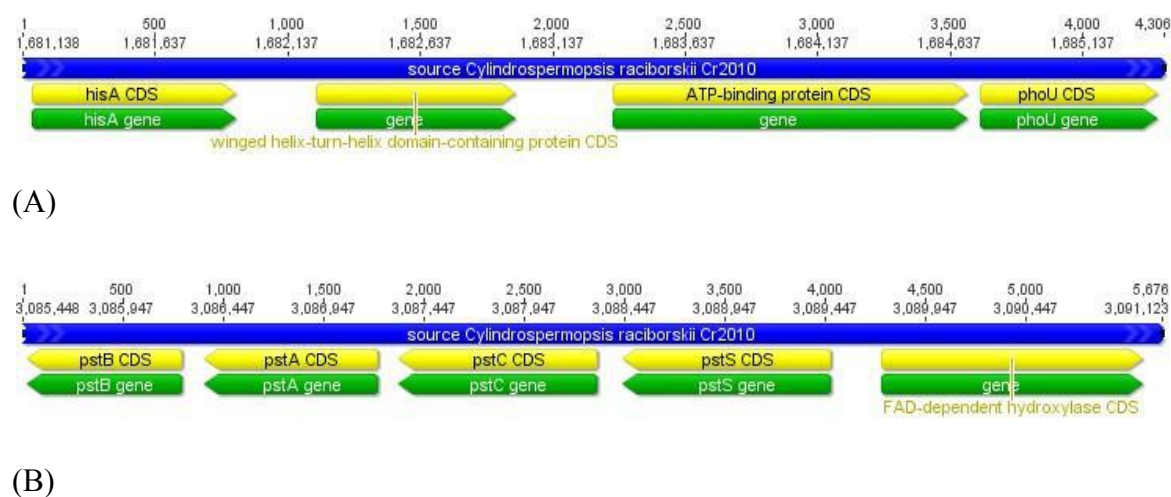


Figura 7 - Localização dos operons *phoBR* e *pstSCAB* no genoma da linhagem de *R. raciborskii* Cr2010. (A) operon *phoBR* (*Winged helix-turn-helix domain-containing protein* CDS); (B) gene *pstS* (parte do operon *pstSCAB*).



Figura 8 - Regiões intergênicas a montante do operon *phoBR* (A) e do gene *pstS* (B). Em azul as sequências complementares aos primers, em negrito os códons de início ou fim dos genes.

A busca por possíveis sítios de ligação da proteína regulatória nas regiões intergênicas adjacentes a *phoB* e *pstS* foi realizada com a ferramenta *FIMO* (Find Individual Motif Occurrences): *Version 5.5.7* disponível no MEME Suite (<https://meme-suite.org/meme/>). Foi utilizado como motivo de busca a sequência consenso CTTAACCT (Jin et al., 2021) e as opções default do programa com um corte de *p-value* < 0,01.

4.4.2. Amplificação das regiões regulatórias

Para clonar as regiões regulatórias foram desenhados pares de primers que resultam na amplificação de toda a região intergênica entre *phoBR* e o gene a montante, *hisA* (fosforibosil formimino-5-amino imidazol carboxi amido ribotideo isomerase) e entre *pstS* e o gene a montante (FAD hidrolase). Os primers foram desenhados para incluir toda a região intergênica e parear com o final do gene a montante e o início do gene a jusante (Fig. 9) As sequências dos primers das regiões intergênicas a serem amplificadas estão na Tabela 3 e sua posição esperada na Figura 8. A temperatura de anelamento de cada primer de um mesmo par e a probabilidade de formação de estruturas secundárias foram verificadas com o programa *OligoAnalysis* (<https://eurofinsgenomics.eu/en/ecom/tools/oligo-analysis/>).

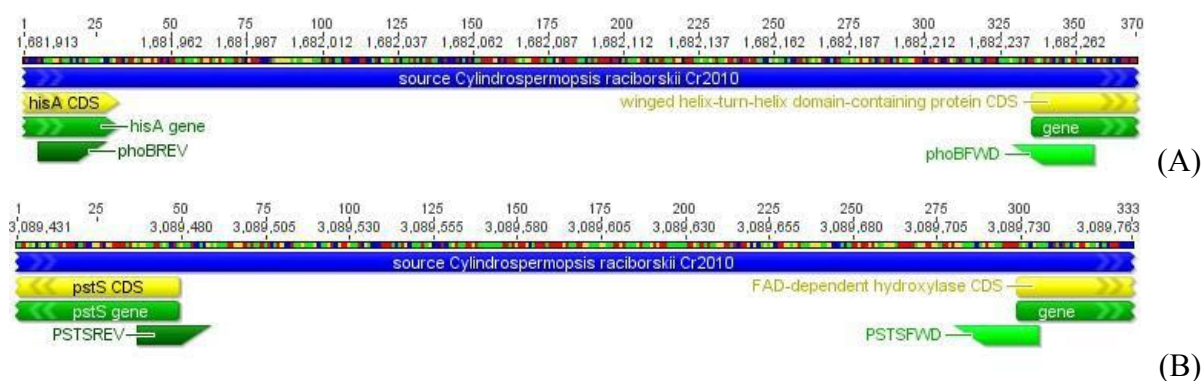


Figura 9 - Localização dos primers desenhados para amplificar as regiões intergênicas. (A) primers para a região entre *phoB* e *hisA* e (B) primers para região entre de *pstS* e *fad* , tendo como referência a linhagem de *R. raciborskii* Cr2010.

Tabela 3 - Primers desenhados para amplificar as regiões intergênicas a montante dos genes do regulon *pho*.

	Reg inter <i>phoBR</i>	Tm	Reg inter <i>pstS</i>	Tm
Fwd	5'- AGG TAA TTC AGT AGT ATA CAT TGA TTG -3'	57,4 °C	5'- ACG ACA TTT TTA ACC TCA GAA AAC C -3'	58,1 °C
Rev	5'- ACT TTA GAC TTC TCT CGT TTT GC -3'	57,1 °C	5'- TGG TTA ATG TCA TGT TAC CTC G -3'	56,5 °C

A amplificação das regiões de interesse foi feita a partir de DNA genômico de *R. raciborskii* linhagem ITEP-A1, previamente purificado e disponível no laboratório. A reação inclui: tampão 5x GoTaq polimerase (Promega), dNTP 0,2 mM, 1 μ M de cada um dos primers, enzima GoTaq Polimerase (Promega) 1,2 unidades, DNA genômico 1ul (50 ng). As condições de PCR foram: 94°C 5 min e 35 ciclos de 94°C 1 min, 54°C 30 s, 72°C 30 s, mais uma etapa de 72°C 10 min.

Os produtos de PCR foram analisados em eletroforese em gel de agarose 1% em tampão TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético e 0,4 mM EDTA, pH 8,0). A agarose foi dissolvida em tampão TAE (a 1%), aquecida para dissolver e colocada na cuba com o pente. Após a solidificação do gel, foi colocado tampão TAE 1X na cuba e a amostra de DNA foi misturada com tampão de amostra 6x (30% glicerol, 0,25% bromofenol blue, 0,25% xileno cianol em 50mM Tris HCl pH 8,0) e aplicada no poço. O gel foi submetido a um campo elétrico (80V 0,02 Amp) para corrida. O gel foi corado com brometo de etídeo (0,5 ug/mL) e o DNA foi visualizado com luz ultravioleta.

As bandas correspondentes aos produtos foram retiradas do gel e purificadas usando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up* (Promega), conforme instruções do fabricante. Em seguida, o DNA purificado foi dosado em Nanodrop.

Para confirmar a identidade dos produtos nós enviamos as amostras para sequenciamento (Plataforma de Sequenciamento de DNA, IBCCF, UFRJ). As sequências obtidas foram alinhadas com as regiões intergênicas de ITEP-A1 e Cr2010 usando o programa *Geneious version 6.1 (Biomatters)* (<http://www.geneious.com>).

4.4.3. Clonagem das regiões regulatórias no vetor

Para clonagem dos insertos, foi feita a ligação no vetor pGEMTeasy (Promega) (Fig. 10) usando 50 ng de DNA de plasmídeo e a massa de inserto correspondente para obter a proporção de 5:1 inserto:vetor, como ilustrado abaixo:

$$\frac{50 \text{ ng de vetor} \times [\text{inserto} \times \text{tamanho do inserto}(0,25 \text{ kbases})]}{\text{Tamanho do vetor} (3 \text{ Kbases})} \times \frac{5}{1} = \text{ng de inserto}$$

Foi adicionado na reação 1 ul de T4 DNA ligase (Promega) (10 unidades), em tampão da enzima 10 x em volume final de 10 μL . A reação ocorreu a 4 °C por 18 h.



Figura 10 - Vetor pGEM Teasy. Usado para clonar os produtos de PCR das regiões intergênicas dos genes do regulon pho. Fonte: Promega

4.4.4. Transformação de *Escherichia coli*

A transformação foi feita em bactérias *E. coli* da linhagem DH5 α , mantidas em estoque em N₂ líquido. A metodologia está ilustrada na Figura 11. As bactérias foram semeadas em ágar LB e cultivadas a 37 °C por 18 h. Uma colônia foi inoculada em meio LB líquido e cultivada a 37 °C por 18 h, sob agitação (100 rpm). No dia seguinte foi feita uma diluição na proporção 1:100 em meio LB líquido (50 mL) e o cultivo continuou a 37 °C por cerca de 2 h, sob agitação até a densidade óptica a 600 nm atingir 0,5. A suspensão bacteriana foi incubada

no gelo por 10 min e todos os procedimentos seguintes foram feitos no gelo ou a 4°C. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 8000 g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em H₂O gelada (mesmo volume original). Foi feita uma segunda centrifugação como a anterior, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em H₂O gelada (metade do volume original). Foi feita uma terceira centrifugação como a anterior, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em glicerol 10% (1/10 do volume original). Finalmente foi feita mais uma centrifugação e a suspensão foi ressuspensa em 1/150 do volume original. Aliquotas de células competentes foram mantidas no N₂ líquido para uso posterior (Green; Sambrook, 2012).

Para a transformação, as bactérias foram colocadas junto ao produto da ligação e foi dado um choque elétrico no eletroporador Gene Pulser (BioRad) para que ocorresse a entrada do plasmídeo. As células competentes (70 µL) foram obtidas do N₂ líquido, mantidas no gelo até descongelarem e incubadas com 2 µL da reação de ligação por 5 min. A suspensão foi submetida a 1,5 V, 25 *micro Faraday* e 1000 Ohms. As células foram imediatamente transferidas para meio SOC adicionado de MgCl₂ 10 mM e glicose 20 mM e incubadas a uma temperatura de 37 °C por 1 h. O plaqueamento das células transformadas foi realizado em placa de Petri contendo meio LB com ampicilina para que apenas os clones resistentes crescessem. Após 1 dia foram selecionadas colônias resistentes para serem analisadas.

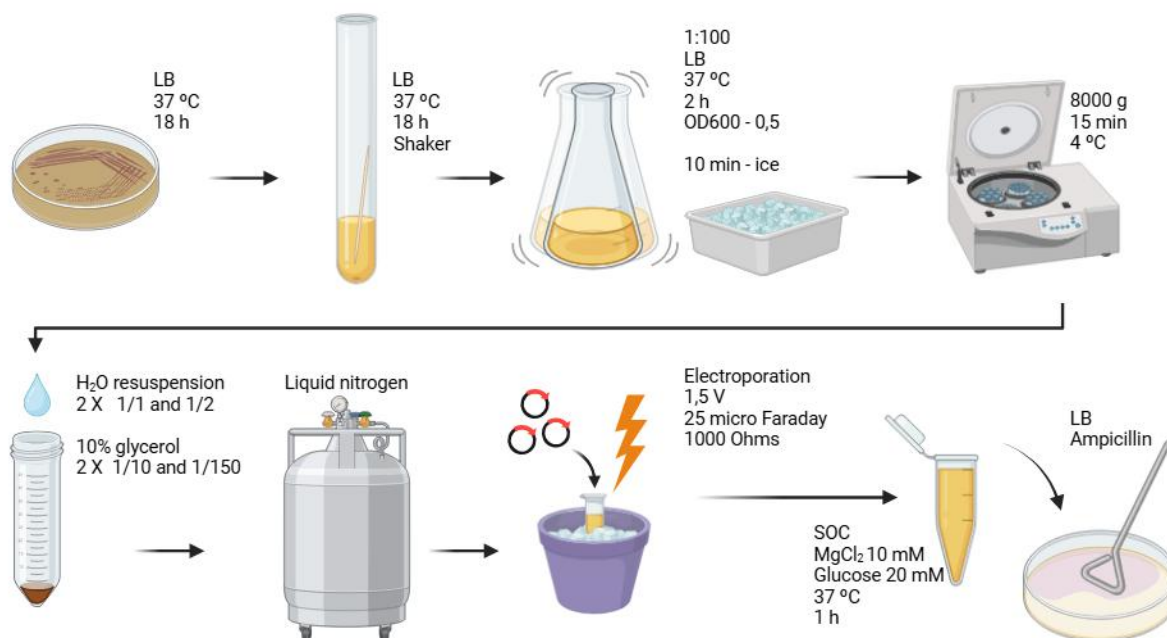


Figura 11 - Esquema de transformação de *E. coli* para obtenção de clones contendo vetores com as regiões regulatórias de interesse.

4.4.5. Seleção de clones recombinantes

Após crescimento de colônias resistentes em placas, passamos colônias para placas de seleção por cor. Foi preparada uma mistura contendo 40 μ L de X-Gal (20 mg/mL), 40 μ L de IPTG 100 mM e 120 μ L de água MilliQ estéril. Essa solução foi espalhada sobre uma placa contendo meio LB e ampicilina (100 μ g/mL) e evaporada no fluxo laminar. As colônias foram transferidas para esta placa com palitos e incubadas a 37 °C por 18 h. Neste plasmídeo o inserto é clonado dentro do gene *lacZ* que codifica a enzima β -galactosidase, quando é adicionado IPTG, a enzima converte o substrato e gera uma cor azul, indicando que não houve clonagem naquela colônia, porém nas colônias brancas o gene *lacZ* foi interrompido pela entrada do inserto e a colônia não gera o produto azul.

Foi realizado então o PCR das colônias selecionadas (espetadas com ponteira e diluídas em 50 μ L de água) como descrito acima, porém trocando os primers por SP6 e T7 (pareiam no vetor pGEMTeasy, Fig. 7). As condições de PCR foram: 94 °C 3 min e 29 ciclos de 94 °C 30 s, 40 °C 30 s, 72 °C 1 min, mais uma etapa de 72 °C 10 s. Os produtos foram analisados em gel de agarose 1% em tampão TAE nas condições já descritas.

As colônias positivas foram cultivadas overnight a 37 °C em meio LB com ampicilina (100 μ g/mL) sob agitação e as células foram coletadas por centrifugação (12000g 2 min 4 °C). Foi realizada a minipreparação usando o kit *Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System* (Promega), conforme instruções do fabricante. Em seguida, o DNA dos plasmídeos foram mandados para sequenciamento (Plataforma de Sequenciamento de DNA, IBCCF, UFRJ).

4.5. Ensaios de ligação

Para os ensaios de ligação da proteína ao DNA, foi necessário obter as regiões regulatórias marcadas para poderem ser detectadas. Isso foi feito com marcadores ligados covalentemente a uma das extremidades do DNA, sendo Biotina para o ensaio por *Gel-shift*, ou FAM (marcador fluorescente) para o ensaio de *DNase footprint*.

Para isso foram comprados primers SP6 (para o vetor pGEMTeasy) contendo cada uma dessas marcações, biotina ou FAM (Exxtend Biotecnologia Ltda). As PCR foram realizadas com os primers SP6 e *phoBRev* (Tabela 3) para a região regulatória de *phoBR* e com os primers SP6 e *pstSFwd* para a região regulatória de *pstS*. As condições de PCR foram: 94 °C 3 min e 29 ciclos de 94 °C 30 s, 40 °C 30 s, 72 °C 1 min, mais uma etapa de 72 °C 10 s. Os produtos foram analisados em gel de agarose 1% em tampão TAE nas condições já descritas e

as bandas correspondentes foram retiradas do gel e purificadas usando o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up* (Promega), conforme instruções do fabricante. O DNA contendo marcação com Biotina foi quantificado em Nanodrop (Thermo Scientific) apresentando $\approx 10\text{ng}/\mu\text{L}$.

4.5.1. *Gel shift*

O ensaio de *gel-shift* ou retardo da mobilidade eletroforética, consiste em analisar um fragmento de DNA após ligação a uma proteína quanto à sua migração em gel de poliacrilamida em condições não desnaturantes. Caso haja interação entre a proteína e o DNA a mobilidade do fragmento será retardada, e ele ficará em uma posição acima no gel se comparado ao fragmento livre, resultando em um deslocamento ou atraso (“*shift*”) na migração da banda marcada. O fragmento de DNA contendo a região que se quer testar deve ser previamente marcado para poder ser detectado após a corrida.

As reações de ligação entre proteína e DNA (volume final 20 μL) incluíram o tampão Tris HCl 1M pH 8,0, EDTA 50mM pH 8,0, KCl 1M, Poly (dI•dC) 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, DTT 0,1M, H₂O, DNA (região intergênica *phoBR* ou *pstS*) previamente marcado com biotina por PCR, e 4 ou 6 μL de amostra de proteína purificada. A reação foi incubada por 30 min a 25 °C.

As etapas realizadas a seguir estão ilustradas na Figura 12. Um gel de poliacrilamida 6% foi feito utilizando TBE 0,5X e montado na cuba com tampão de corrida TBE 0,5X. Foi necessário fazer uma “pré-corrída”, em que o gel foi posto para correr a 100V por aproximadamente 50 minutos. Em seguida as reações foram aplicadas e o gel submetido a eletroforese (100V) e a corrida só foi interrompida quando o azul de bromofenol se encontrava a cerca de 2 cm do final do gel, pois isso indicava que o DNA marcado com Biotina estaria um pouco acima.

O gel foi então retirado do aparato de corrida e transferido para uma membrana de náilon, que foi previamente embebida por 10 minutos em um recipiente contendo TBE 0,5X. O gel junto à membrana foi posicionado entre esponjas pré-embebidas em TBE 0,5X, formando um “sanduíche” de transferência eletroforética e mergulhado em uma cuba contendo TBE 0,5X resfriado a $\sim 10^\circ\text{C}$. A transferência ocorreu a 100V por aproximadamente 60 minutos.

Após a transferência a membrana foi retirada do sanduíche (neste ponto o gel perde sua coloração) e colocada em um pedaço de papel filtro, não permitindo que seque totalmente. A membrana sofreu um *Cross-link* a 120 mJ/cm² utilizando um equipamento de luz UV.

A detecção das bandas marcadas com Biotina foi realizada com o *Chemiluminescent Nucleic Acid Detection Module Kit* (Thermo Scientific) conforme instruções do fabricante. O Blocking buffer, previamente aquecido até dissolver completamente, foi adicionado (20 mL) à membrana e mantido por 15 minutos, sendo levemente agitado. O tampão foi então removido e adicionado à membrana 20 mL do conjugado Estreptavidina-Peroxidase e *Blocking buffer* (diluição 1:300) por 15 minutos com leve agitação. A membrana foi colocada em um novo recipiente contendo 20 mL de *Wash buffer* 1X e levemente agitada por 5 minutos, esta lavagem foi realizada 4 vezes. A membrana foi novamente posicionada em um recipiente distinto e então foi adicionado 30 mL de *Substrate Equilibration buffer*, por 5 minutos com leve agitação. Em seguida a membrana foi retirada do recipiente, sua borda foi moderadamente seca, e colocada sobre uma superfície lisa e reta para a aplicação do *Substrate Working Solution (Luminol/Enhancer Solution e Stable Peroxide Solution*, diluição 1:1) sobre a membrana e incubada por 5 minutos na ausência de luz forte. A membrana então foi seca nas bordas e cuidadosamente envolta em um plástico-filme, de modo a evitar bolhas. A membrana foi então exposta a um equipamento medidor de quimiluminescência (ImageQuant LAS 4000, GE), com o tempo de exposição ajustado de acordo com a intensidade do sinal.

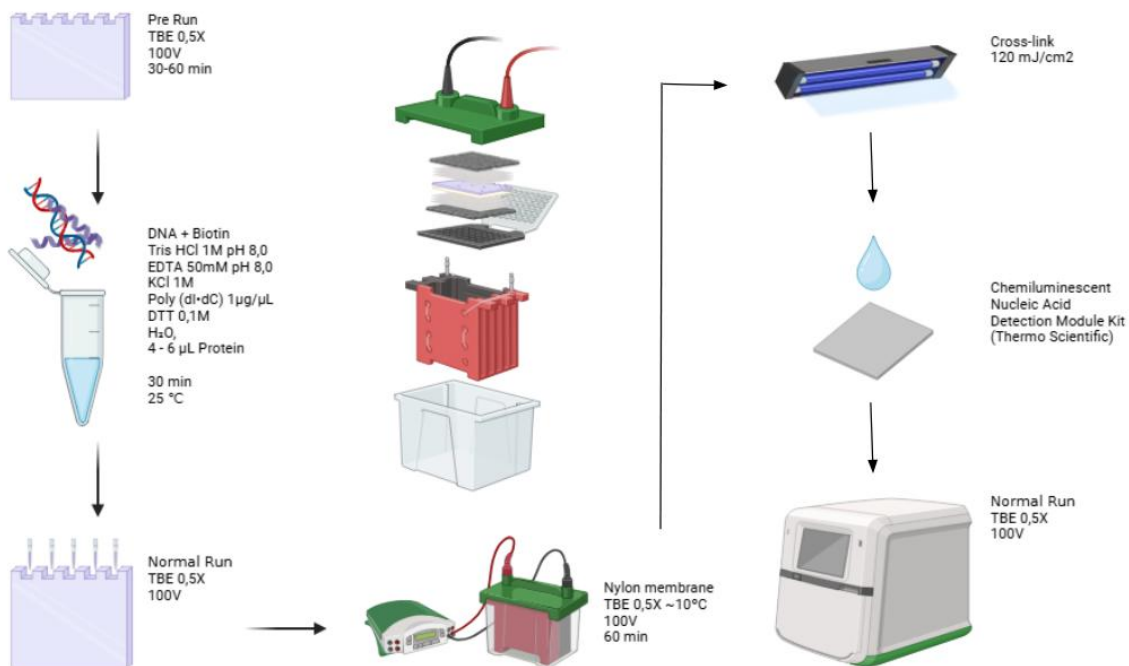


Figura 12 - Esquema das etapas necessárias para a realização do ensaio de *gel shift*.

4.5.2. *DNase Footprint*

O ensaio de *DNase footprint* também se iniciou com a interação entre a proteína reguladora e um fragmento de DNA e foi seguida da adição de DNase com o objetivo de digerir o DNA de forma aleatória gerando porções de diversos tamanhos. Em seguida, o DNA foi precipitado e analisado em sequenciador automático (SeqStudio, Thermo Scientific), que realizou a análise de fragmentos, capaz de determinar o tamanho exato dos fragmentos por meio da separação em eletroforese capilar. Há uma indicação de ligação quando for possível identificar uma sequência de “proteção”, que não permite corte ao DNA caso ele esteja interagindo com a proteína. As etapas realizadas a seguir estão ilustradas na Figura 13.

A reação de ligação entre proteína e DNA (20 mL) incluiu o tampão Tris HCl 1M pH8,0, EDTA 50 mM pH8,0, KCl 1M, Poly (dI•dC) 1µg/µL, Glicerol 50% , MgCl₂ 100 mM, BSA 10µg/µL, DTT 0,1M, H₂O, DNA (região intergênica *phoBR* ou *pstS*) previamente marcado com FAM por PCR, e 0,3 µL de proteína purificada, e foi incubada por 30 min a 25 °C.

Aos 20 µL de reação foi adicionado 39 µL de tampão de DNase RQ1 1X (Promega). Para a digestão do DNA foi adicionada à reação, 1 µL de enzima DNase RQ1 (Promega) previamente diluída 1:50 (em tampão RQ1), seguiu-se a incubação por 1 minuto e 45 segundos a 25 °C. A reação de digestão foi interrompida pela adição de 3 µL de EDTA 0,5 M pH8,0. Foi adicionado 40 µL de H₂O e 100 µL de Fenol Clorofórmio, os tubos eppendorfs foram agitados para formar uma mistura homogênea e então levados para a microcentrífuga a 16000 g, 15 °C, por 15 minutos. Após a centrifugação, a solução apresenta duas fases com separação visível, uma superior e outra inferior. A fase superior foi extraída (aproximadamente 80 µL) e adicionada à um novo tubo eppendorf, e foi acrescentado 8 µL de acetato de sódio 3 M pH 5,8, 1 µL de tRNA (10 ng/mL) e 200 µL de etanol 100%. O tubo foi centrifugado a 16000 g, 15 °C, por 30 minutos. O sobrenadante foi removido e adicionado ao pellet 100 µL de etanol 75%, seguido de centrifugação a 16000 g, 15 °C, por 15 minutos. O sobrenadante foi removido e o pellet foi levado para secar a 60 °C e por fim ressuscendido em 10 µL de formamida, para ser analisado em eletroforese capilar (SeqStudio, Thermo Scientific). Os resultados foram analisados com o programa *Gene Mapper* (Thermo Scientific).

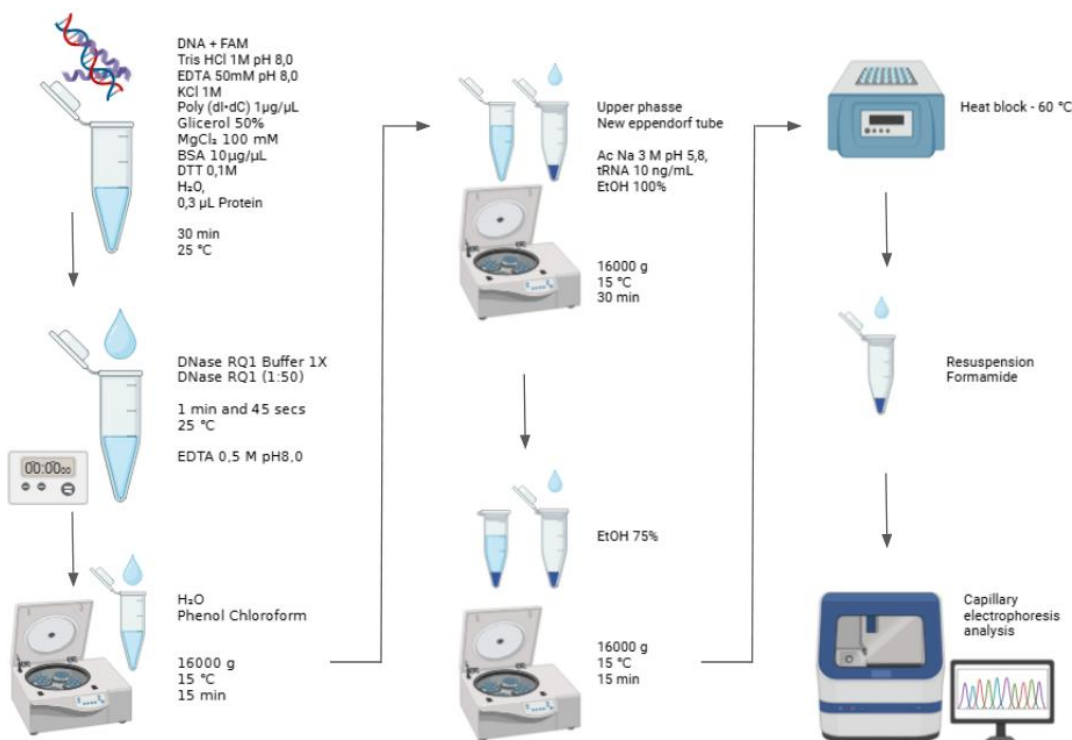


Figura 13 - Esquema das etapas necessárias para a realização do ensaio de *DNase footprint*.

5. RESULTADOS

5.1. Obtenção e purificação da proteína PhoB recombinante

Os testes de indução da expressão da proteína PhoB em células de *E. coli* BL21DE3 contendo o vetor pET28*phoB* foram realizados com objetivo de obter a proteína na fração solúvel. Nas condições aplicadas para a indução na primeira tentativa, [(i), IPTG 1 mM e incubação a 20 °C por 3h] (Tabela 1), a proteína recombinante ficou apenas na fração insolúvel (Fig. 14A). Por isso, testamos outras condições: (ii) IPTG 0,2 mM e incubação a 25 °C por 18h; (iii) IPTG 0,1 mM e incubação a 18 °C por 1:30 h e 30h (*overnight*); (iv) IPTG 0,1 mM e incubação a 18 °C por 2:30 h, 4 h e 18 h. Nesses casos houve recuperação da proteína recombinante nas frações solúvel e insolúvel (Fig. 14B, C e D), porém sempre em maior quantidade na fração insolúvel, o que indicou que nas condições testadas, a recuperação de proteínas solúveis em comparação com o total produzido não era adequada para a purificação.

A partir daí decidimos reduzir a concentração de IPTG (0,07 mM), além de manter a temperatura de indução a 18 °C e o tempo de incubação de 18 h [condição de teste (v), Tabela 1] Esta condição apresentou proporção de proteína na fração solúvel equivalente à da fração

insolúvel (Fig. 14E). Desta forma, esta foi a condição selecionada para seguir com a purificação.

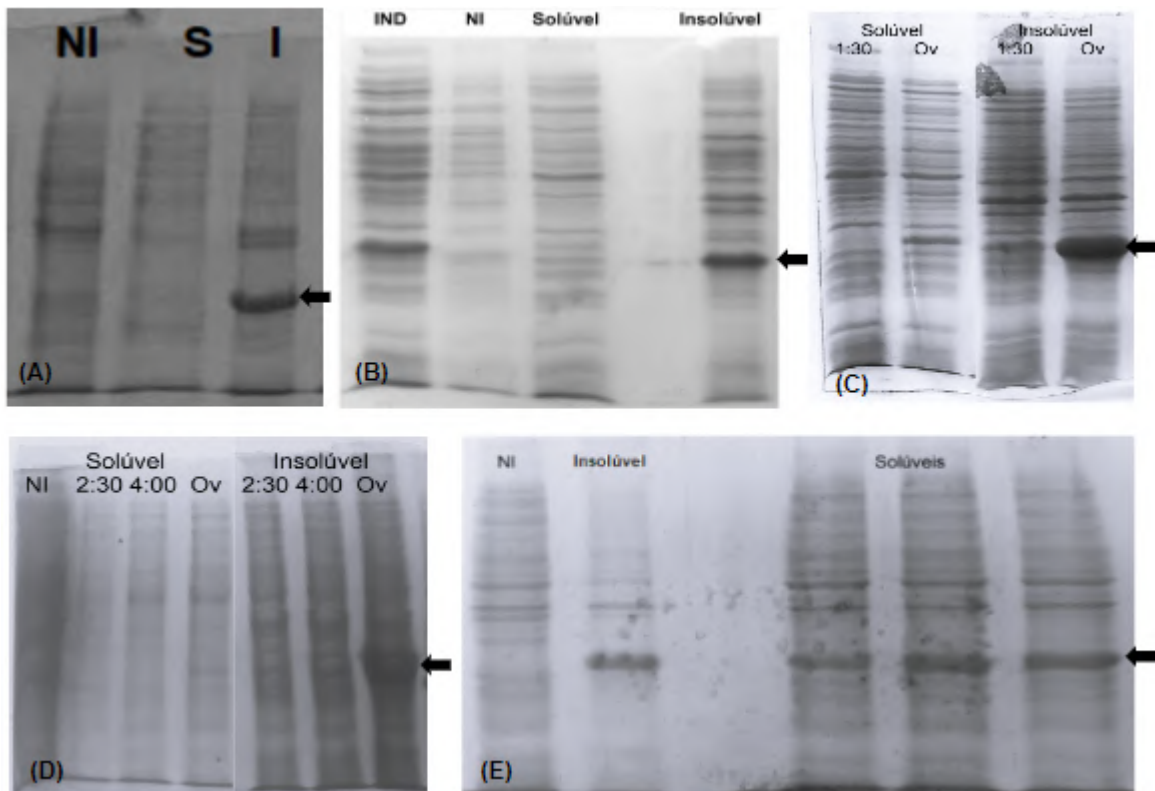


Figura 14 - SDS-PAGE 15%, mostrando os perfis de proteínas de *E. coli* DE3 após indução em diferentes condições para expressão da proteína recombinante PhoB. (A) protocolo (i), IPTG 1 mM e incubação a 20 °C por 3h; NI, não induzido, S, fração solúvel, I, fração insolúvel; (B) protocolo (ii) IPTG 0,2 mM e incubação a 25 °C por 18h, IND, induzido, NI, não induzido; (C) protocolo (iii) IPTG 0,1 mM e incubação a 18 °C por 1:30 h e 30h (overnight, ov); (D) protocolo (iv) IPTG 0,1 mM e incubação a 18 °C por 2:30 h, 4 h e 18 h (ov). (E) protocolo (v) IPTG 0,07 mM, incubação a 18 °C por 18 h. Setas indicam a proteína recombinante.

A proteína foi purificada por meio de cromatografia por afinidade em resina níquel-agarose. A amostra foi passada na coluna e foram coletadas as frações de *flow through*, lavagem e as eluições (frações purificadas). Foram testados diferentes protocolos (Tabela 2). O primeiro protocolo (Tabela 2A) testado incluiu apenas uma etapa de lavagem com menor volume [2 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,3 M, imidazol 20 mM] seguida da etapa de eluição [Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,3 M, imidazol 250 mM]. Pudemos perceber que a purificação não estava apropriada, apresentando outras bandas nas frações da eluição que não representavam a proteína PhoB (Fig. 15A).

Como o protocolo anterior incluía uma alta concentração de NaCl (0,3 M), isso poderia prejudicar o ensaio de ligação ao DNA. Portanto, decidimos aumentar o volume da lavagem antes da eluição (de 2 mL para 20 mL) e incluir mais uma etapa de lavagem para reduzir a concentração de NaCl para 150 mM (Tabela 2 B). A eluição foi feita nas mesmas condições

anteriores porém em NaCl 150mM. Esta condição melhorou a pureza da proteína recombinante (Fig. 15B).

Também purificamos a proteína a partir da fração insolúvel, uma vez que esta fração continha alta abundância de proteína recombinante (Fig. 15C). Neste caso as etapas de purificação foram feitas na presença de uréia e depois de eluída da coluna de afinidade em frações, a amostra foi dialisada para remover a uréia e ficar em menor concentração de NaCl (50 mM).

Ao final, obtivemos uma preparação de proteína purificada a partir da fração solúvel contendo 0,2 ug/mL (6,5 uM) e uma preparação de proteína purificada a partir da fração insolúvel (depois solubilizada com ureia e dialisada), dividida em duas frações, uma contendo 1 ug/mL (35 uM) e outra contendo 0,6 ug/mL (20 uM).

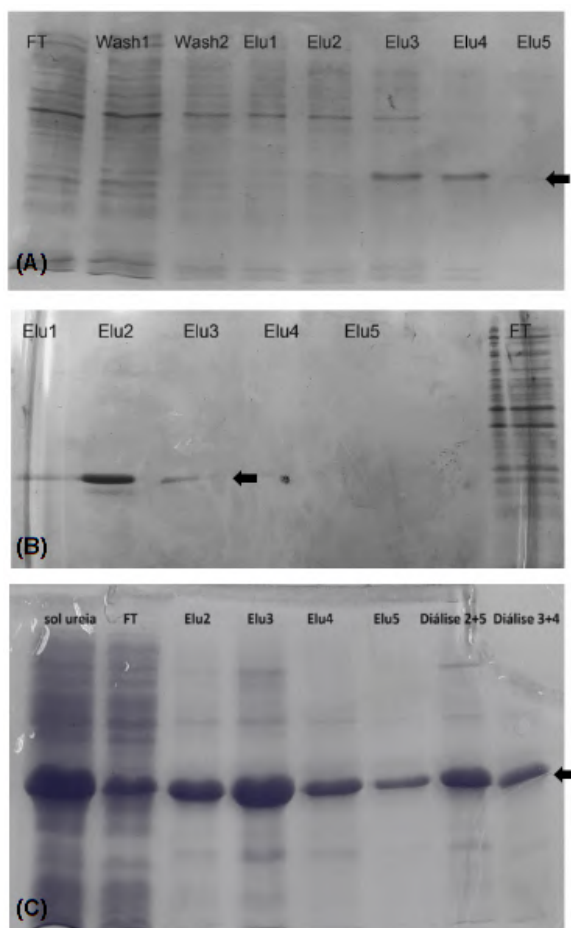


Figura 15 - SDS-PAGE 15%, com as amostras de frações de purificação da proteína recombinante PhoB em coluna de Ni-NTA. (A) purificação da fração solúvel, etapa de lavagem [2 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,3 M, imidazol 20 mM] seguida da etapa de eluição [Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,3 M, imidazol 250 mM]. (B) purificação da fração solúvel, duas etapas de lavagem [20 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,3 M, imidazol 20 mM] e [10 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,15 M, imidazol 20 mM] e eluição [4 mL de Tris-HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 0,15 M, imidazol 250 mM]. (C) purificação da fração insolúvel, sol ureia, fração de proteínas inicial solubilizada em uréia, Diálise 2+5, amostras das frações eluídas 2 e 5 unidas após a diálise, Diálise 3+4, amostras das frações eluídas 3 e 4 unidas após a diálise. FT, flowthrough, Wash, frações de lavagem, Elu, frações de eluição. Setas indicam a proteína recombinante.

5.2. Obtenção das regiões intergênicas de genes do regulon *pho*

Para testar a interação da proteína PhoB com as regiões regulatórias dos genes selecionados, foi preciso obter as regiões intergênicas a partir do genoma de *R. raciborskii*. Analisamos as regiões intergênicas dos operons *phoBR* e *pstSCAB* alinhando as sequências dos genomas de duas linhagens, ITEP-A1 e Cr2010 a fim de verificar se eram conservadas (Fig. 16). No caso da região intergênica de *phoBR*, foi possível visualizar uma diferença significativa na quantidade de pares de bases da região intergênica entre o genoma de ITEP-A1 e anotação do genoma de referência Cr2010 (Fig. 16A).

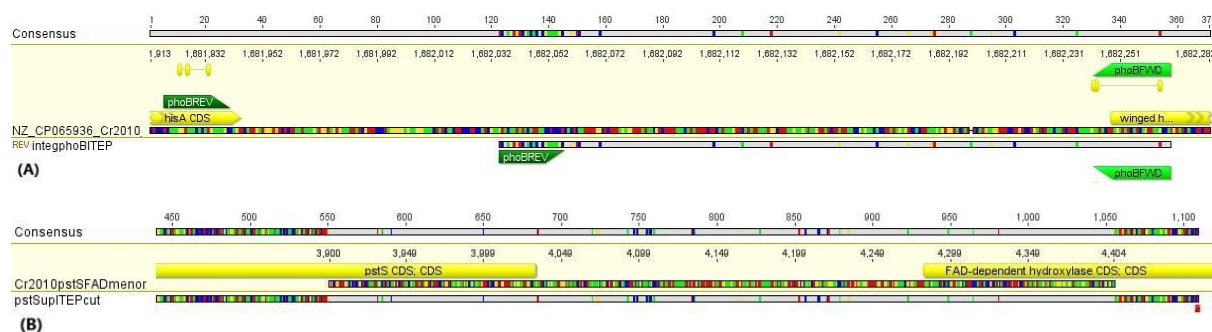


Figura 16 - Alinhamento das regiões intergênicas a montante de (A) *phoBR* (B) *pstS* nos genomas das linhagens ITEP-A1 e Cr2010, genoma de referência [CP065936.1]. Na parte superior a sequência consenso, em cinza, trechos de sequência idênticos entre os genomas comparados, em cores, substituições da sequência de bases.

A partir dessas sequências, foram desenhados os primers para amplificação das regiões de interesse a montante dos genes *phoB* e *pstS* (Tabela 3, Figs. 8 e 16). Foi realizada a amplificação das regiões usando como molde o DNA cromossômico da linhagem ITEP-A1. As regiões foram amplificadas e posteriormente purificadas a partir de gel de agarose.

Após ligação de insertos no plasmídeo pGEMTeasy, foi realizada a transformação em *E. coli* DH5 α competente. A seleção de células transformadas foi feita através de plaqueamento com meio LB com ampicilina, onde as colônias que cresceram apresentavam resistência ao antibiótico, devido ao gene correspondente presente no plasmídeo. No caso das duas clonagens foi possível obter colônias transformadas (Fig. 17A).

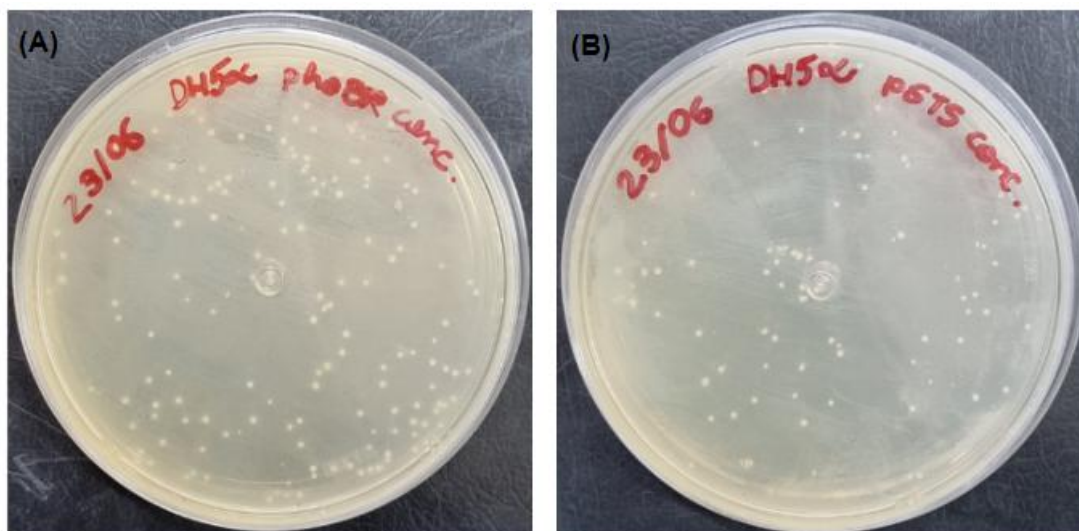


Figura 17 - Resultado da transformação de células *E. coli* DH5 α para obter as regiões intergênicas de interesse clonadas em pGEM. (A) pGEMTeasy + região intergênica de *phoBR* (B) pGEMTeasy + região intergênica de *pstS*.

Após crescimento de colônias resistentes em placa, algumas foram inoculadas em placas contendo meio LB com ampicilina e X-Gal + IPTG para a seleção de colônias que apresentassem ligação do inserto no plasmídeo. Conseguimos resgatar colônias brancas, ou seja, em que houve a inserção da região intergênica de *phoBR* no plasmídeo e também conseguimos colônias brancas no caso da região intergênica de *pstS* (Fig. 18).

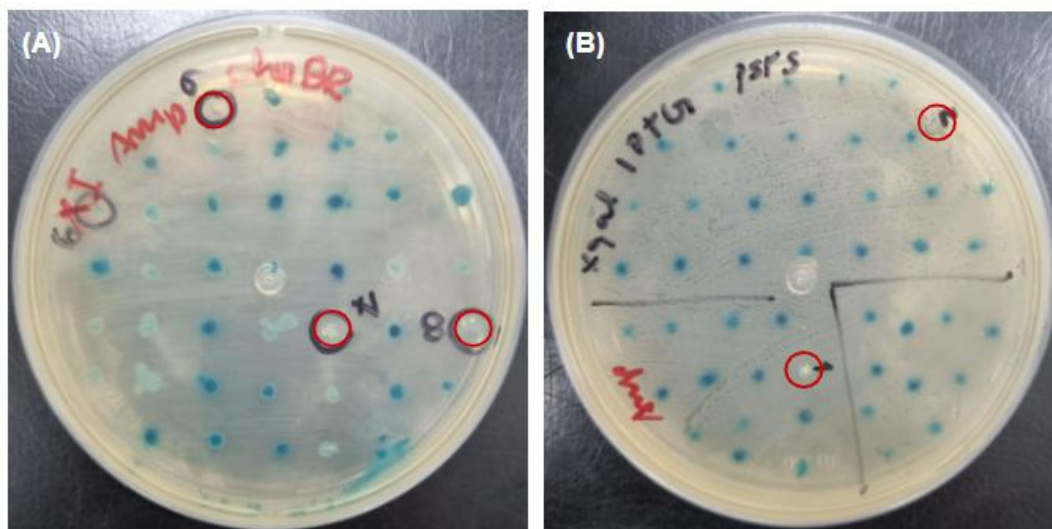


Figura 18 - Seleção de *E. coli* DH5 α contendo pGEM com as regiões intergênicas de interesse clonadas. (A) pGEMTeasy + região intergênica de *phoBR* (B) pGEMTeasy + região intergênica de *pstS*. Placas com meio LB ampicilina + IPTG + XGal para seleção de colônias de *E. coli* DH5 α em que houve entrada do inserto no vetor pGEMTeasy (A) ligação de região intergênica de *phoBR*, (B) ligação de região intergênica de *pstS*.

As colônias brancas foram obtidas e usadas em PCR utilizando os primers T7 e SP6, que pareiam com regiões do vetor pGEMTeasy nas extremidades do inserto clonado. Para verificar a presença dos insertos, os produtos foram analisados em gel de agarose 1%. Houve amplificação de insertos com os tamanhos esperados a partir das colônias brancas (dado não mostrado). Essas foram então usadas para obter os plasmídeos por minipreparação que foram enviados para o sequenciamento. O alinhamento das sequências dos clones com as regiões correspondentes nos genomas de linhagens de *R. raciborskii* confirmou a clonagem das regiões corretas (Figs. 19 e 20).

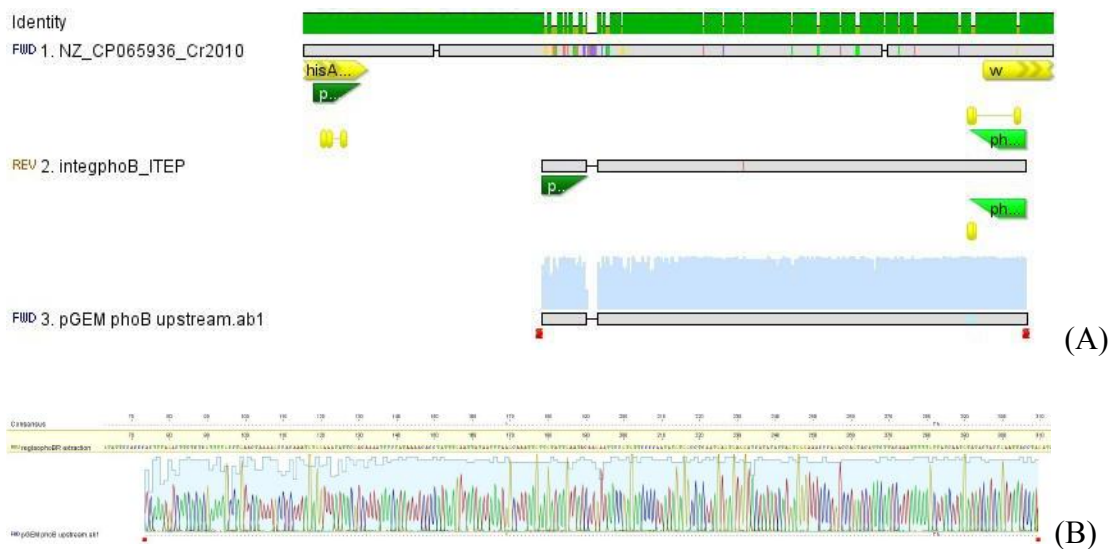


Figura 19 - Alinhamento de sequência clonada em pGEMTeasy e região intergênica a montante de *phoBR*. (A) sequência (3) clonada no vetor pGEMTeasy alinhada com as sequências genômicas da linhagens de *R. raciborskii* Cr2010 (1) e ITEP-A1 (2). (B) imagem ampliada do alinhamento da sequência clonada no vetor pGEMTeasy com a sequência intergênica de *R. raciborskii* ITEP-A1.



Figura 20 - Alinhamento de sequência clonada em pGEMTeasy e região intergênica a montante de *pstS*. (A) sequência clonada no vetor pGEMTeasy alinhada com a sequência genômica da linhagens de *R. raciborskii* Cr2010. (B) imagem ampliada do alinhamento da sequência clonada no vetor pGEMTeasy com a sequência intergênica de *R. raciborskii* ITEP-A1.

Algumas características importantes dos clones obtidos para cada região intergênica estão ilustradas na Figura 21, incluindo as posições dos primers usados para gerar os fragmentos clonados e as posições dos primers SP6 e T7 encontrados no vetor, que foram utilizados para gerar os fragmentos de DNA para os ensaios de ligação a seguir.

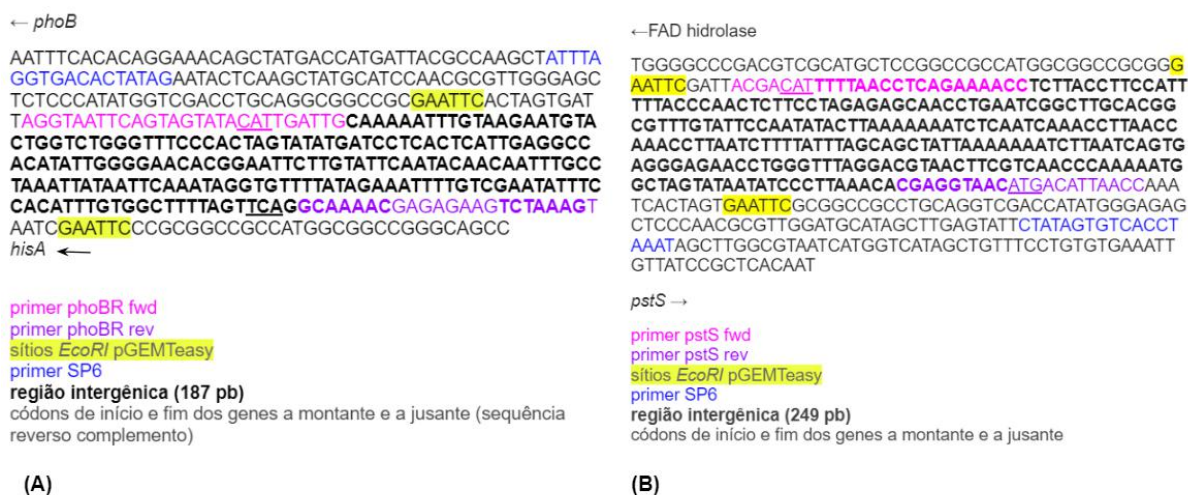


Figura 21 - Características dos clones obtidos. (A) clone pGEMTeasy+ *phoBR* (B) clone pGEMTeasy+ *pstS*. Em rosa e roxo primers usados para amplificar as regiões intergênicas a partir do genoma. Em amarelo, sítios *EcoRI* do vetor que flanqueiam o inserto clonado. Em negrito as regiões intergênicas. Em azul primer SP6 que foi usado para amplificar as regiões intergênicas marcadas com biotina ou FAM.

5.3. Ensaios de ligação

Os primers SP6 marcados com Biotina e FAM foram usados em ensaios de PCR para obter as regiões intergênicas de *pstS* e *phoBR* contendo um dos marcadores ligados covalentemente à sua extremidade do DNA.

Nos ensaios foram testadas as preparações de PhoB purificada a partir da fração solúvel e da fração insolúvel. Apenas as preparações de PhoB purificada a partir da fração insolúvel deram resultado positivo no retardo do DNA (dados não mostrados). Isso deve ter acontecido devido à menor concentração de proteína na fração solúvel.

No caso das duas regiões intergênicas, o ensaio *Gel shift* apresentou o retardo da banda marcada de DNA que ficou posicionada acima do fragmento livre de DNA remanescente, o qual não interagiu com a proteína, como é possível observar a Figura 22.

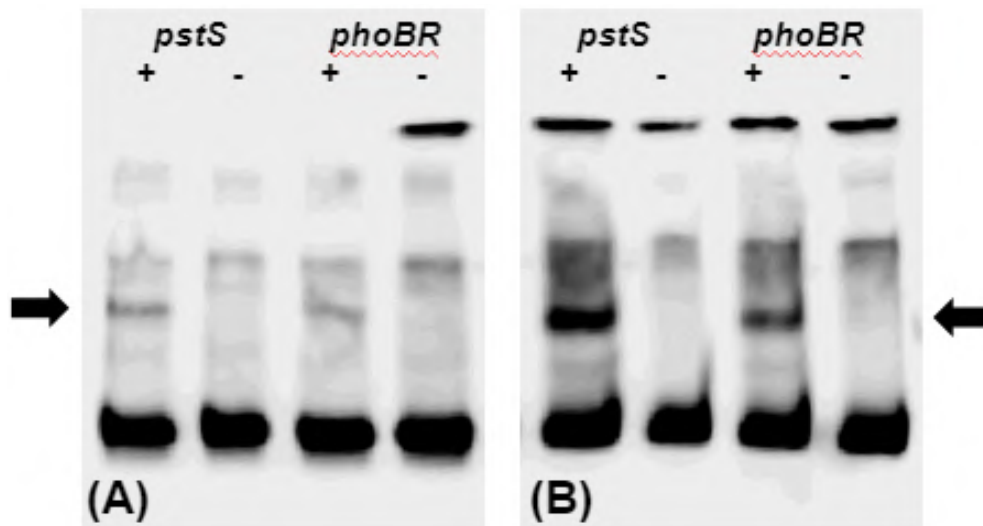
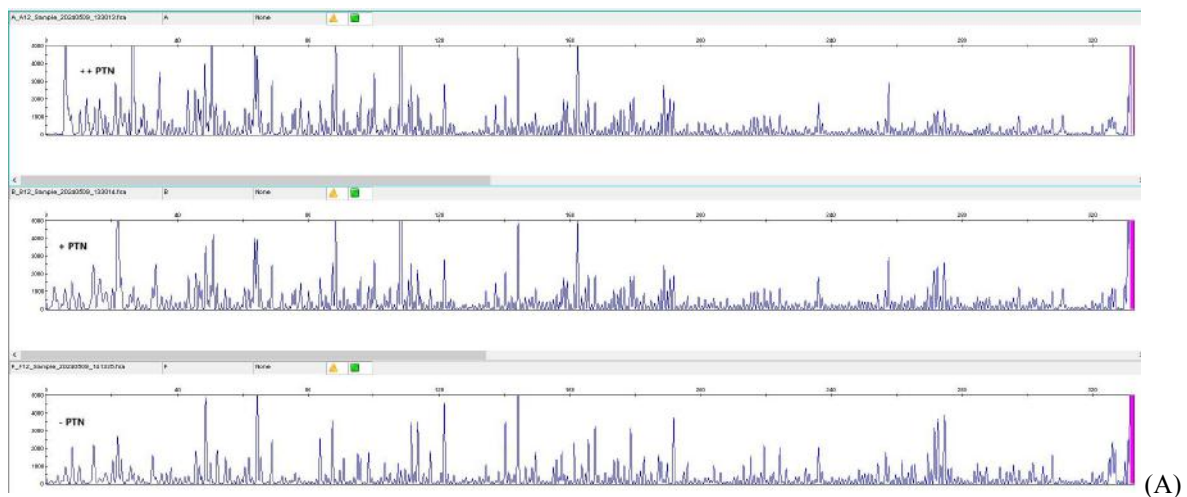


Figura 22 - Gel shift da ligação de PhoB em regiões regulatórias dos operons *pstSCAB* e *phoBR*. DNA marcado com biotina, + presença e - ausência da proteína. (A) PhoB - 7 μ M (B) PhoB - 10 μ M. Setas indicam retardo eletroforético.

Os ensaios de *DNase footprint* apresentaram dificuldade para uma visualização de uma “zona de proteção” efetiva. Resultados representativos são mostrados nas Figuras 23 e 24. Diversos ensaios foram feitos variando as concentrações de DNA e de proteína, assim como a concentração de DNase e o tempo de digestão. Estes ajustes ainda estão em andamento.



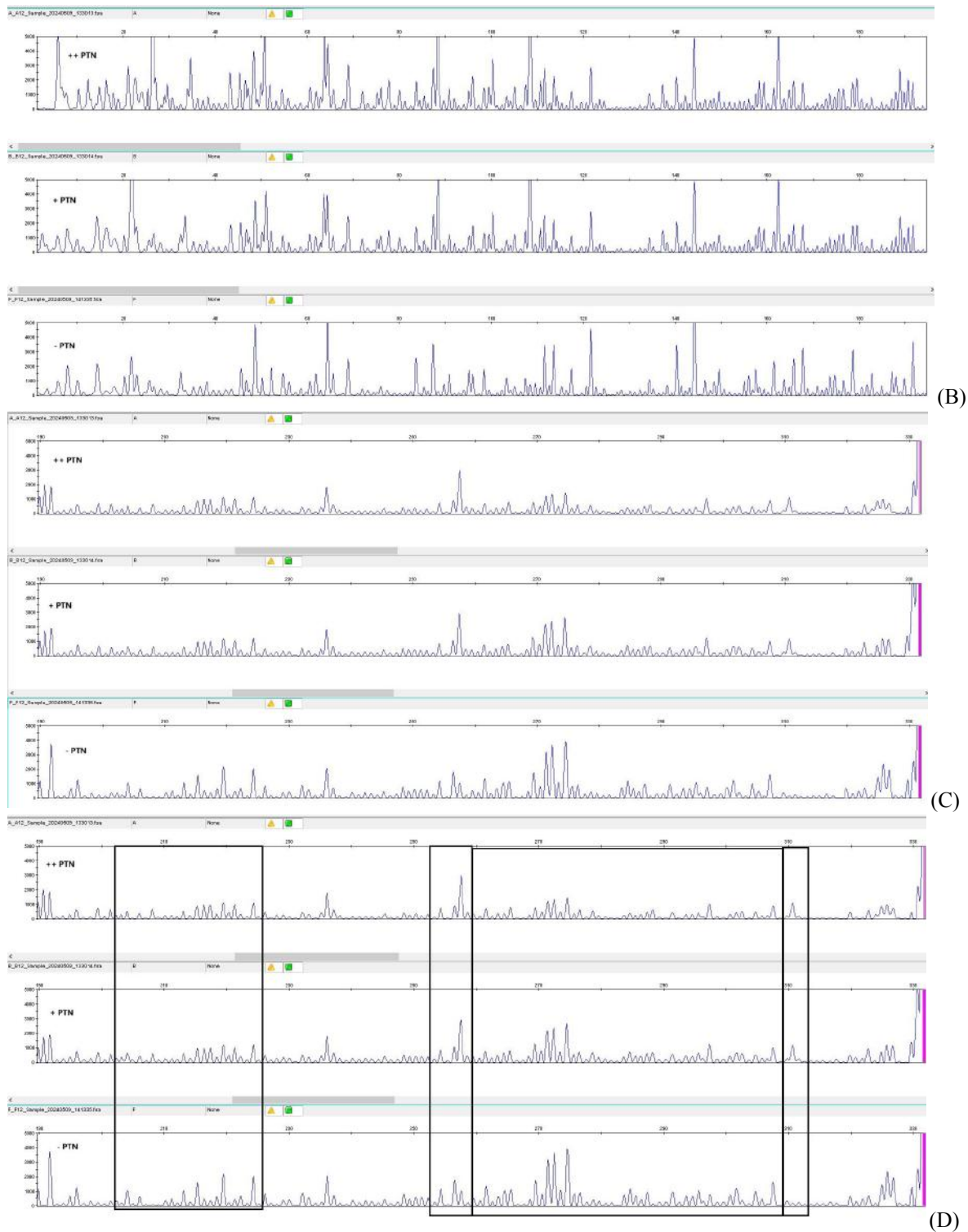
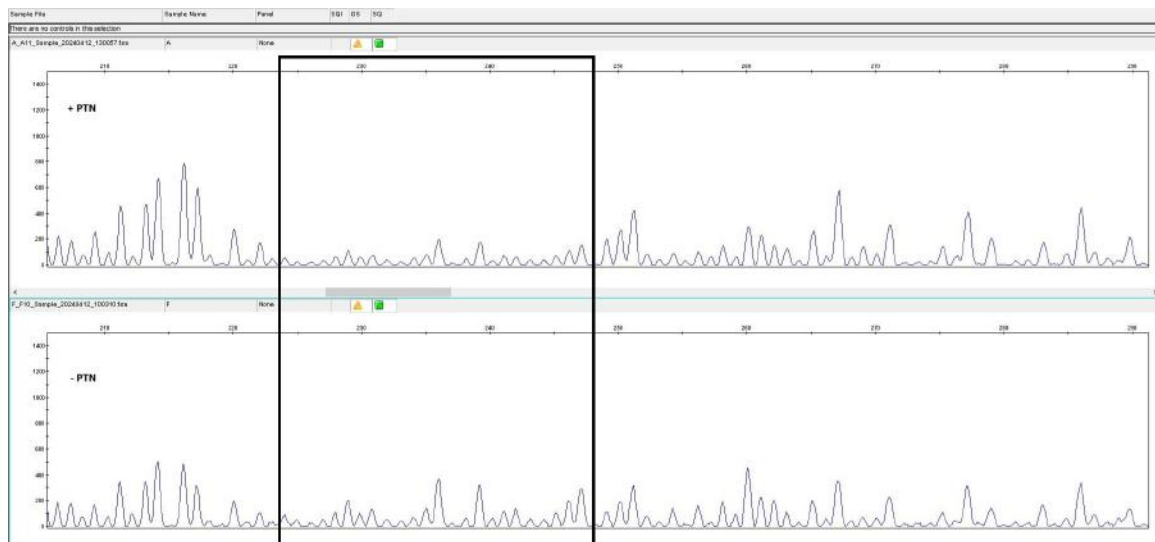
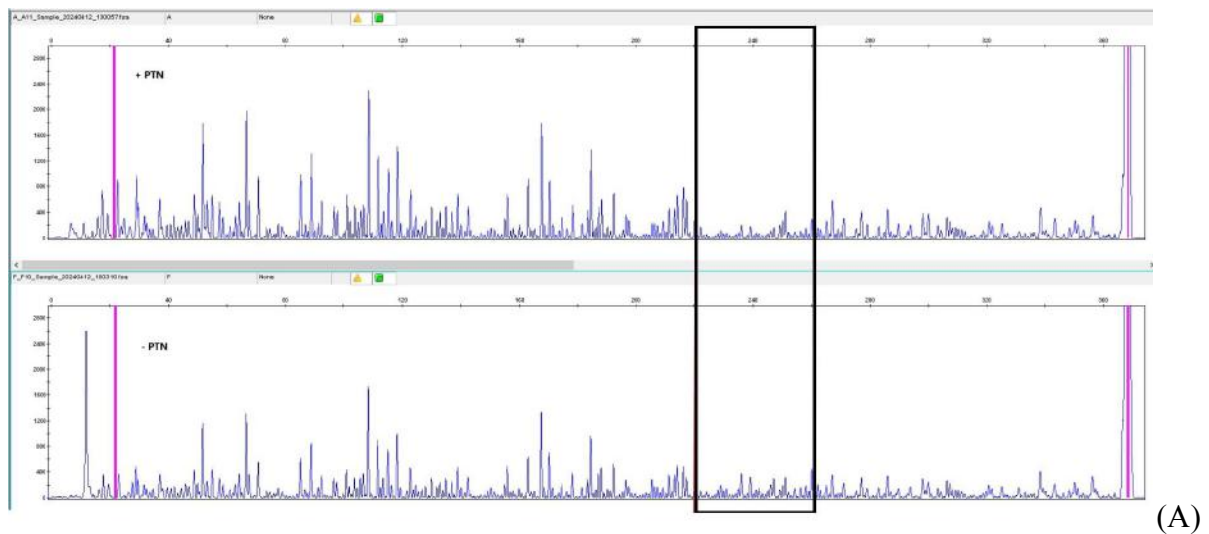


Figura 23 - Padrão de fragmentos de DNA gerados no ensaio de DNase footprint com região *phoBR*. Ligação de PhoB em região reguladora do operon *phoBR* marcado com FAM e analisada (A) padrão completo de digestão, à direita a faixa rosa indica o sinal do fragmento não digerido (330 pb). (B) zoom da região de 1 a 200 pares de base, sem sinal de proteção. (C) zoom da região de 190 a 330 pares de base. (D) possíveis regiões de proteção, retângulos marcam picos com intensidades diferentes na presença e ausência de proteína. ++ PTN, reação contendo PhoB (10 uM), + PTN, reação contendo PhoB (5 uM) - PTN, controle negativo sem proteína.

As reações mais promissoras usando a região intergênica de *phoBR* indicaram proteção ou em alguns pontos (202-225 pb e 252-313 pb) (Fig. 23 D) com diminuição da intensidade de picos na presença de concentrações crescentes da proteína em relação ao controle negativo. Em certos picos ocorreu o contrário com aumento de intensidade na ausência da proteína.

Já para as reações mais promissoras usando a região intergênica de *pstS*, houve indício de proteção em uma região (223-248 pb) (Fig. 24 B) com diminuição da intensidade de picos na presença da proteína em relação ao controle sem proteína.



(B)

Figura 24 - Padrão de fragmentos de DNA gerados no ensaio de DNase footprint com região *pstS*. Ligação de PhoB em região reguladora do operon *pstS* marcado com FAM e analisada (A) padrão completo de digestão, à direita a faixa rosa indica o sinal do fragmento não digerido (368 pb). (B) zoom da região de 200 a 290 pares de base. Possíveis regiões de proteção, retângulos marcam picos com intensidades diferentes na presença e ausência de proteína. + PTN, reação contendo PhoB (10 uM), - PTN, controle negativo sem proteína.

A partir destes resultados tentamos localizar nas sequências das regiões intergênicas as possíveis regiões de proteção (Fig. 25). Isso resultou em duas regiões de 23 e 61 pb, respectivamente, a montante do códon de início para *phoBR* e uma região de 25 pb a montante do códon de início para *pstS*.

inserto: phoBR SP6 FAM - phoBR rev

FAM***ATTTAGGTGACACTATAG**AATACTCAAGCTATGCATCCAACGCGTTGGGAGCTCTCCCATATGGT
CGACCTGCAGGCCGGCCGCGAATTCAGTAGTGATT**AGGTAATTCAGTAGTATACATTGATTGCAAAAATT**
TGTAAGAATGTACTGGTCTGGGTTCCCACTAGTATATGATCCTCACTCATTGAGGCCACATATTGGG
GAACACGGAATCTTGATTCAATACAACAATTTGCCTAAATTATAATT**CAAATAGGTGTTTTATAGAA**
ATTTTGTGCAATATTCCACATTTGTGGCTTTTAGTTCAG**GCAAACGAGAGAAGCTAAAG**

(A)

inserto: pstS SP6 FAM - pstS fwd

ACGACATTTTAACTCAGAAAACCTCTTACCTTCCATTTTTACCCAACCTTTCCTAGAGAGCAACCTG
AATCGGCTTGCACGGCGTTTGATTCCAATATACTTAAAAAATCTCAATC**AAACCTTAACCAAACCT**
TAATCTTTTATTTAGCAGCTATTAATAAATCTTAATCAGTGAGGGAGAACCTGGGTTTAGGACGTAA
CTTCGTCAACCCAAAATGGCTAGTATAATATCCCTAAACA**CGAGGTAACATGACATTAACC**AAATCA
CTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAGGTGCACCATATGGGAGAGCTCCCAACGCGTTGGATGCATAGC
TTGAGTATT**CTATAGTGTCACCTAAAT***FAM

(B)

Figura 25 - Possível localização de regiões reguladoras do operon *phoBR* (A) e do gene *pstS* (B). As regiões indicadas nos ensaios de footprint foram marcadas considerando a distância entre os perfis de proteção e a extremidade e marcada com FAM. Primer SP6 (em azul) agregado à uma marcação com FAM (em vermelho), Primer rev (em cor de rosa), Região intergênica (em negrito), códon de início da tradução (sublinhado) e Região de proteção (marcado em amarelo).

A busca por possíveis sítios de ligação da proteína regulatória nas regiões intergênicas adjacentes a *phoB* e *pstS* de acordo com o consenso CTTAACCT, foi realizada e indicou a presença de possíveis sítios (Fig. 26). No caso de *phoBR* apenas uma caixa (p-value > 0,01) foi identificada que estaria -121 a -128 do códon de início da tradução do gene *phoB*. No caso de *pstS*, duas caixas (p-value > 0,01) espaçadas por 3 pares de base foram identificadas, estando que estaria -121 a -139 do codon de início da tradução do gene *pstS* (Fig. 25). Não se conhece o início da transcrição desses genes.

CATTGATAACAAAAATTTGTAAGAATGTACTGGTCTGGGTTTCCCCTAGTATATGATCCTC
 ACTCATTGAGGCCACATATTGGGGAAACACGGAATTCCTTGTATTCAAATACAACAATTTGCTTA
AATTATAATTCAAATAGGTGTTTTATAGAAATTTTGTCTGAATATTTCCACATTTGTGGCTTT
TAGTTCA

motif	start	stop	strand	score	p-value	q-value	matched_sequence
CTTAACCT	66	73	-	9.72121	0.000254	0.07	CTTAAATT

(A)

CATTTTTAACCTCAGAAAACCTCTTACCTTCCATTTTTACCCAACCTTTCCTAGAGAGCAAC
 CTGAATCGGCTTGCACGGCGTTTGTATTCCAATATACTTAAAAAATCTCAATCAAACCTTA
ACCAAACCTTAATCTTTTATTTAGCAGCTATTAATAAATCTTAATCAGTGAGGGAGAACCT
 GGGTTTAGGACGTAACCTTCGTCAACCCAAAAATGGCTAGTATAATATCCCTTAAACACGAGG
 TAAC**ATG**

motif	start	stop	strand	score	p-value	q-value	matched_sequence
CTTAACCT	121	128	+	9.72121	0.000254	0.07	CTTAACCA
CTTAACCT	5	12	+	9.44242	0.000438	0.07	TTTAACCT
CTTAACCT	132	139	+	9.44242	0.000438	0.07	CTTAATCT
CTTAACCT	126	133	+	4.49697	0.00169	0.202	CCAAACCT
CTTAACCT	23	30	+	4.21818	0.00412	0.247	CTTACCTT
CTTAACCT	165	172	+	4.21818	0.00412	0.247	CTTAATCA
CTTAACCT	197	204	+	4.21818	0.00412	0.247	CGTAACTT
CTTAACCT	236	243	+	4.21818	0.00412	0.247	CTTAAACA

(B)

Figura 26 - Busca por caixas pho nas regiões reguladoras do operon *phoBR* (A) e do gene *pstS* (B). O motivo buscado foi CTTAACCT. Em azul a localização das caixas mais promissoras. Em negrito o códon de início do gene. Sublinhado as possíveis regiões de proteção encontradas. No caso da região *phoBR* é mostrada a sequência reverso complemento pois a caixa está na fita negativa. O *p*-value da ocorrência de um motivo é a probabilidade de uma sequência aleatória do mesmo comprimento do motivo ser encontrada na mesma posição com um score igual ou maior. O score corresponde à localização do motivo em uma determinada posição da sequência e é computado somando as entradas de cada coluna de uma matriz de scores dependentes de posição para aquele motivo. O *q*-value da ocorrência de um motivo é definido como uma taxa de falsa descoberta, caso a ocorrência seja selecionada como significativa. A tela é ordenada por valor crescente de *p*-value. Foram selecionadas ocorrências com *p*-value < 0,01.

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho é uma etapa de um projeto mais amplo que busca aprofundar o entendimento sobre a regulação da expressão gênica mediada pela proteína PhoB na cianobactéria *Raphidiopsis raciborskii*, com foco em sua interação com regiões reguladoras

de genes do *regulon pho*. Os resultados obtidos cumpriram os objetivos propostos e permitiram concluir etapas iniciais para isso. Apesar de avanços experimentais importantes, foram identificados alguns desafios na metodologia, apontando a necessidade de aprimoramento em investigações futuras.

A obtenção de PhoB recombinante foi um avanço significativo, especialmente após otimizações nas condições de indução, como a redução da temperatura e da concentração de IPTG. Essas alterações permitiram recuperar uma parte significativa da proteína na fração solúvel, essencial para ensaios que vieram depois. A proteína PhoB é naturalmente solúvel mas a sua expressão no sistema recombinante gera uma concentração muito alta de proteína no citoplasma que acaba agregando na forma de corpos de inclusão (Berrow et al., 2006). Por isso, foram adotadas alterações na etapa de indução de expressão para que a proteína fosse gerada em menor intensidade e pelo menos uma parte fosse recuperada solúvel. A purificação utilizando resina de níquel-agarose foi ajustada para garantir maior pureza, alinhando-se aos critérios metodológicos observados em estudos como o de Suzuki (2004), que também enfrentou desafios similares na expressão da proteína SphR (ortólogo de PhoB em *E. coli*) em *Synechocystis* sp..

A possibilidade de purificar PhoB a partir da fração insolúvel com o uso de ureia seguido de diálise para renaturação da proteína permitiu recuperar uma quantidade bem maior de proteína, o que deve ter resultado no retardo positivo que observamos usando estas preparações (resultando em 4-7 uM no ensaio de ligação). A fração solúvel estava menos concentrada e a quantidade de proteína (resultando em ~1 uM) no ensaio não deve ter sido suficiente para gerar retardo. Pretendemos concentrar a fração solúvel para ter tanto a fração solúvel quanto a insolúvel na mesma concentração e testar se há diferença na ligação ao DNA.

A clonagem bem-sucedida das regiões regulatórias de *phoB* e *pstS* foram confirmadas por sequenciamento dos clones recombinantes. Usamos como base para localização das regiões intergênicas, planejamento dos primers, e alinhamento dos clones recombinantes o genoma da linhagem de referência Cr2010, que está bem anotado e completo. Em seguida, comparamos com as regiões correspondentes no genoma da linhagem ITEP-A1 que está disponível no nosso banco de dados e que foi usada para amplificação dessas regiões. O alinhamento das sequências genômicas revelou uma conservação razoável, certificando a obtenção das regiões desejadas. Porém, no caso da região intergênica a montante de *phoBR*, comparando os dois genomas vimos que a região de ITEP-A1 era menor do que a de Cr2010. Isso pode ser devido a uma anotação errada (provavelmente para ITEP-A1, já que Cr2010 é o

genoma de referência). Ou então, de fato no genoma de ITEP-A1 a região intergênica é menor. Foi interessante notar que há diferenças também nas sequências das regiões intergênicas, o que sugere que estas possam ter atividades diferentes (maior ou menor intensidade de resposta ou afinidade a PhoB) que caracterizem respostas diferentes entre linhagens. Este é um aspecto que pretendemos explorar futuramente.

Na busca por possíveis sítios de ligação da proteína PhoB ao DNA das regiões analisadas, encontramos trechos com bastante homologia ao consenso de caixas pho (*Pho Boxes*) apontado em cianobactérias (Su et al., 2007, Jin et al. 2021). Esse resultado corrobora com o trabalho de Jin (2021), que investigou a regulação de *Pho Boxes* em *Synechococcus* OS-B0, destacando a relevância destas sequências para respostas adaptativas.

Os ensaios de *Gel Shift* confirmaram a interação de PhoB com regiões regulatórias, validando a funcionalidade da proteína purificada e seu papel no reconhecimento de sequências reguladoras. Esses achados estão alinhados com os resultados de Su et al. (2007), que relataram sítios de interação conservados entre a proteína reguladora e regiões em diferentes genomas de cianobactérias. Temos como perspectiva testar diferentes concentrações de proteína nos ensaios para investigar se ela pode se ligar a mais de um sítio e assim gerar diferentes bandas de retardo sucessivamente mais altas no gel, como observado no caso da proteína homóloga em *Vibrio cholerae* (Diniz et al., 2011).

O ensaio de *DNase Footprint* seria o objetivo final necessário para mapear os sítios de ligação da proteína. No entanto, apresentou limitações na identificação de zonas claras de proteção, dificultando a definição precisa dos sítios de ligação, sugerindo a necessidade de ajustes experimentais. Estes podem depender de testar diferentes concentrações de proteína e razões entre proteína e DNA que resultem na ligação eficiente e proteção à digestão. Seguimos as condições de ligação relatadas por Suzuki et al. (2004) com a proteína homóloga de *Synechocystis*, portanto essas devem ser apropriadas para observar a ligação. Já que estamos ainda na fase de adaptação da metodologia de DNase footprinting para detecção de DNA fluorescente por eletroforese capilar, a geração de um padrão de fragmentos claro é essencial. Porém notamos nos nossos ensaios após a corrida eletroforética que sempre uma quantidade grande de fragmentos de DNA marcados íntegros sobrava na reação. Desta forma, é possível que a digestão ou a precipitação dos fragmentos de digestão não esteja sendo eficiente, o que dificulta visualizar a proteção. Estamos realizando ajustes mudando as concentrações de DNase e tempo de digestão para tentar resolver esta questão. Contudo, ao alinhar suposta zona de proteção encontrada em *pstS* (*DNase footprinting*) com a localização de caixas pho previstas pelo programa, foi possível identificar a mesma região. No caso de

phoB, mesmo após alinhar as regiões (*DNase footprinting*) com caixas *pho* previstas pelo programa, os resultados seguem inconclusivos.

Os resultados obtidos demonstram que é bastante desafiador estudar a regulação gênica em resposta à disponibilidade de fósforo no nível molecular. Porém, as respostas que podem ser obtidas irão ampliar o entendimento sobre a biologia molecular de *R. raciborskii*, e conseqüentemente sobre suas estratégias de adaptação com potencial resultados para controle de florações tóxicas.

Esperamos que conhecendo a base da regulação em genes conhecidamente integrantes do *regulon pho*, seja possível comparar sequências regulatórias entre linhagens e investigar se isso alteraria a expressão dos respectivos genes, o que apontaria para diferenças de resposta a níveis de Pi entre linhagens. Também seria interessante avaliar se a resposta regulatória é gradual em resposta a diferentes concentrações de Pi extracelular. Finalmente, tendo com base as sequências de regulação e sítios de interação da proteína em genes do *regulon pho* seria possível buscar por sequências conservadas em outros genes relevantes para a biologia da espécie, como por exemplo genes do metabolismo de nitrogênio ou produção de toxinas.

Em suma, o trabalho atingiu marcos experimentais importantes, superando desafios metodológicos, mas cumprindo as primeiras etapas para avanços no entendimento da regulação gênica em cianobactérias.

7. CONCLUSÃO

Foi possível induzir a expressão da proteína PhoB, responsável pela regulação da expressão gênica em resposta ao fosfato, em sistema recombinante e recuperar a proteína na fração solúvel em proporção suficiente para que fosse possível realizar a purificação, estabelecendo um protocolo efetivo. Foi possível também obter a proteína pura a partir da fração insolúvel após indução. A proteína pura foi testada em reações de ligação ao DNA.

Foi realizada a clonagem das regiões intergênicas que contêm elementos reguladores da transcrição do operon *phoBR* e *pstSCAB* em vetor plasmidial para obtenção do DNA para os ensaios de ligação com a proteína.

Foram realizados os ensaios de ligação, sendo eles, o *gel shift*, pelo qual foi possível observar a interação da proteína com as regiões intergênicas, e *DNase footprint*, que mostrou resultados promissores, mas também a necessidade de alguns ajustes no procedimento para um resultado mais preciso que permita o mapeamento dos sítios de ligação da proteína ao DNA.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Antunes, Jorge T.; Leão, Pedro N.; Vasconcelos, Vítor M. **CYLINDROSPERMOPSIS RACIBORSKII: REVIEW OF THE DISTRIBUTION, PHYLOGEOGRAPHY, AND ECOPHYSIOLOGY OF A GLOBAL INVASIVE SPECIES.** *Frontiers in Microbiology*, v. 6, p. 473, 2015.
- Azevedo, S. **TOXINAS DE CIANOBACTÉRIAS: CAUSAS E CONSEQUÊNCIAS PARA A SAÚDE PÚBLICA.** Rio de Janeiro. *Revista Virtual de Medicina* Volume 1, número 3. 1998.
- Bachhawat P, Swapna GV, Montelione GT, Stock AM. **MECHANISM OF ACTIVATION FOR TRANSCRIPTION FACTOR PhoB SUGGESTED BY DIFFERENT MODES OF DIMERIZATION IN THE INACTIVE AND ACTIVE STATES.** *Structure*. 2005.
- Beier, D., & Gross, R. **REGULATION OF BACTERIAL VIRULENCE BY TWO-COMPONENT SYSTEMS.** *Current opinion in microbiology*, 9(2), 143-152. 2006.
- Berrow, N. S., Büssow, K., Coutard, B., Diprose, J., Ekberg, M., Folkers, G. E., ... & Busso, D. (2006). **RECOMBINANT PROTEIN EXPRESSION AND SOLUBILITY SCREENING IN ESCHERICHIA COLI: A COMPARATIVE STUDY.** *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 62(10), 1218-1226.
- Blanco AG, Sola M, Gomis-Rüth FX, Coll M. **TANDEM DNA RECOGNITION BY PhoB, A TWO-COMPONENT SIGNAL TRANSDUCTION TRANSCRIPTIONAL ACTIVATOR.** *Structure*. May;10(5):701-13. 2002.
- Burford, M. A., Beardall, J., Willis, A., Orr, P. T., Magalhaes, V. F., Rangel, L. M., ... & Neilan, B. A. **UNDERSTANDING THE WINNING STRATEGIES USED BY THE BLOOM-FORMING CYANOBACTERIUM *CYLINDROSPERMOPSIS RACIBORSKII*.** *Harmful Algae*, 54, 44-53. 2016.
- Diniz, M. M. P., Goulart, C. L., Barbosa, L. C., Farache, J., Lery, L. M. S., Pacheco, A. B. F., ... & von Krüger, W. M. D. A. (2011). **FINE-TUNING CONTROL OF PHOBR EXPRESSION IN VIBRIO CHOLERAЕ BY BINDING OF PHOB TO MULTIPLE PHO BOXES.** *Journal of bacteriology*, 193(24), 6929-6938.

- Fitzgerald DM, Stringer AM, Smith C, Lapierre P, Wade JT. **GENOME-WIDE MAPPING OF THE ESCHERICHIA COLI PhoB REGULON REVEALS MANY TRANSCRIPTIONALLY INERT, INTRAGENIC BINDING SITES.** *mBio*. Jun 27;14(3):e0253522. 2023.
- Flores, E., Herrero, A. **COMPARTMENTALIZED FUNCTION THROUGH CELL DIFFERENTIATION IN FILAMENTOUS CYANOBACTERIA.** *Nat Rev Microbiol* 8, 39–50. 2010.
- Gardner SG, McCleary WR. **CONTROL OF THE PhoB REGULON IN ESCHERICHIA COLI.** 8:10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2019. 2019.
- Green, M. R., & Sambrook, J. **MOLECULAR CLONING.** A Laboratory Manual 4th, 448. 2012.
- Guedes, I. A., Pacheco, A. B. F., Vilar, M. C., Mello, M. M., Marinho, M. M., Lurling, M., & Azevedo, S. M. **INTRASPECIFIC VARIABILITY IN RESPONSE TO PHOSPHORUS DEPLETED CONDITIONS IN THE CYANOBACTERIA MICROCYSTIS AERUGINOSA AND RAPHIDIOPSIS RACIBORSKII.** *Harmful Algae*, 86, 96-105. 2019.
- Guedes, M. **OBTENÇÃO DA PROTEÍNA REGULADORA DE RESPOSTA A FOSFATO PHOB DE RAPHIDIOPSIS RACIBORSKII (CYANOBACTERIA) EM SISTEMA RECOMBINANTE.** Trabalho de conclusão de curso – Instituto federal de educação, ciência e tecnologia Rio de Janeiro, 2023.
- Jin, H., Wang, Y., Fu, Y., & Bhaya, D. **THE ROLE OF THREE-TANDEM Pho BOXES IN THE CONTROL OF THE C-P LYASE OPERON IN A THERMOPHILIC CYANOBACTERIUM.** *Environmental Microbiology*, 23(11), 6433-6449. 2021.
- Juntarajumnong, Waraporn et al. **PHOSPHATE SENSING IN SYNECHOCYSTIS SP. PCC 6803: SPHU AND THE SPHS–SPHR TWO-COMPONENT REGULATORY SYSTEM.** *Archives of microbiology*, v. 188, p. 389-402, 2007.
- Madigan, M. **MICROBIOLOGIA DE BROCK.** 14. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2016.
- Martín, Juan Francisco; Liras, Paloma. **MOLECULAR MECHANISMS OF PHOSPHATE**

SENSING, TRANSPORT AND SIGNALLING IN STREPTOMYCES AND RELATED ACTINOBACTERIA. International journal of molecular sciences, v. 22, n. 3, p. 1129, 2021.

QIAGEN, Qiaexpressionist

<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=79ca2f7d-42fe-4d62-8676-4cfa948c9435&lang=en>

Reece, JANE B. **BIOLOGIA DE CAMPBELL.** 10. ed. – Porto Alegre: Artmed, 2015.

Santos - Beneit, F. **THE PHO REGULON: A HUGE REGULATORY NETWORK IN BACTERIA.** EM FRONTIERS IN MICROBIOLOGY. (Vol. 6, Issue APR). Frontiers Media S.A. 2015.

Santos, T. **CIANOBACTÉRIAS: COMO ELAS TRANSFORMARAM A VIDA NA TERRA?** Disponível em: <http://www.invivo.fiocruz.br/biodiversidade/cianobacterias/>. Publicado em 3 de agosto de 2022. Acesso em maio de 2023.

Schindler, D.W. **THE DILEMMA OF CONTROLLING CULTURAL EUTROPHICATION OF LAKES.** Proc. R. Soc. Biol. Sci. 279, 4322–4333. 2012.

Su, Z., Olman, V., & Xu, Y. **COMPUTATIONAL PREDICTION OF Pho REGULONS IN CYANOBACTERIA.** BMC genomics, 8, 1-12. 2007.

Suzuki S, Ferjani A, Suzuki I, Murata N. **THE SPHS-SPHR TWO COMPONENT SYSTEM IS THE EXCLUSIVE SENSOR FOR THE INDUCTION OF GENE EXPRESSION IN RESPONSE TO PHOSPHATE LIMITATION IN SYNECHOCYSTIS.** J Biol Chem. 2004 Mar 26;279(13):13234-40. Epub 2004 Jan 5. PMID: 14707128.

Willis, A. et al. **DIFFERENTIAL EXPRESSION OF PHOSPHORUS ACQUISITION GENES IN RESPONSE TO PHOSPHORUS STRESS IN TWO RAPHIDIOPSIS RACIBORSKII STRAINS.** Harmful Algae, v. 82, 2019.