**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

**O papel de uma serina/treonina fosfatase do tipo eucariótico na virulência
de *Chromobacterium violaceum***

GREICY KELLY BONIFÁCIO PEREIRA

**Ribeirão Preto – SP
Brasil
2017**

GREICY KELLY BONIFÁCIO PEREIRA

**O papel de uma serina/treonina fosfatase do tipo eucariótico na virulência
de *Chromobacterium violaceum***

**The role of a eukaryotic-like serine/threonine phosphatase on the
virulence of *Chromobacterium violaceum***

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências – Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. José Freire da Silva Neto

Ribeirão Preto – SP

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pereira, Greicy Kelly Bonifácio

O papel de uma serina/treonina fosfatase do tipo eucariótico na virulência de *Chromobacterium violaceum*. Ribeirão Preto, 2017.

65 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: da Silva Neto, José Freire.

1. *Chromobacterium violaceum*. 2. Fosforilação. 3. Fosfatases. 4. Virulência.

Nome: PEREIRA, Greicy Kelly Bonifácio

Título: O papel de uma serina/treonina fosfatase do tipo eucariótico na virulência de *Chromobacterium violaceum*

Dissertação apresentada ao Departamento de
Biologia Celular e Molecular e Bioagentes
Patogênicos da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Biologia Celular e
Molecular

Orientador: Prof. Dr. José Freire da Silva Neto

Aprovado em: __ / __ / ____

Banca Examinadora:

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____
Julgamento: _____ Assinatura: _____

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 131/2015, sobre o projeto intitulado “*Caracterização das proteínas fosfatases do tipo eucariótico de Chromobacterium violaceum*”, sob a responsabilidade do **Professor Doutor José Freire da Silva Neto** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 28 de setembro de 2015.

We certify that the protocol nº 131/2015, entitled “*Characterization of eukaryotic-like protein phosphatases of Chromobacterium violaceum*”, is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the Ribeirão Preto Medical School of the University of São Paulo in 09/28/2015.

Ribeirão Preto, 28 de setembro de 2015.

Prof. Dr. Fernando Silva Ramalho
Presidente da CEUA – FMRP – USP

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. José Freire da Silva Neto, pela oportunidade de trabalhar e aprender sob sua orientação, pela paciência e ensinamentos durante esses dois anos;

A Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP) e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular pelo apoio estrutural e oportunidade; A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e FAPESP pelo apoio financeiro;

Aos técnicos, Cláudia, Domingos, Roberta (LMMM), Tuca e José (LMME) pelo suporte técnico e importante contribuição a este trabalho;

Aos funcionários que mantém o bom funcionamento do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, especialmente a Gabriela Bunhoto Zamoner pela ajuda e suporte;

Aos colegas de laboratório, Kelly, Renato, Júlia, Carlos e Juliana, pelos momentos compartilhados e em especial para Bianca e Maristela que me ajudaram em muitos ensaios que contribuíram para este trabalho;

A minha mãe Miriam, que sempre acreditou em mim, foi minha incentivadora, apoiadora e me deu todo o suporte para chegar até aqui, e sem o qual eu jamais teria chegado;

Ao meu pai Noel por seu bom coração e por ter estado ao meu lado e me ajudado sempre que pôde;

Ao meu padrinho Edison pelos conselhos, conversas, ensinamentos e por se fazer sempre presente;

Ao meu namorado Ronaldo, pelo amor, carinho, apoio, preocupação e incentivo que foram indispensáveis para ter chegado até aqui;

As amigas Barbara, Mariana, Alana e Esteice pela amizade e bons momentos que tivemos e ainda temos juntas;

Aos colegas do departamento Natália Melquie, Flávia e Relber pelas conversas e momentos compartilhados;

A todos que contribuíram de forma direta e indireta a este trabalho, muito obrigada.

RESUMO

Pereira, GKB. O papel de uma serina/treonina fosfatase do tipo eucariótico na virulência de *Chromobacterium violaceum*. 2017. 65 p. Dissertação (Mestrado em Ciências, Área Biologia Celular e Molecular) – Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.

As proteínas fosfatases desempenham um papel fundamental na modificação pós-traducional reversível de proteínas por fosforilação, ao atuarem na remoção do grupo fosforil estável de resíduos de serina, treonina e tirosina. Embora predominem em eucariotos, as serina/treonina fosfatases (STPs) também existem em bactérias, nas quais atuam controlando diversos aspectos fisiológicos e de virulência. Neste trabalho investigamos o papel das STPs na virulência e fisiologia de *Chromobacterium violaceum*, uma β -proteobactéria que atua como um patógeno ocasional de humanos e é amplamente encontrada em água e solos de regiões tropicais e subtropicais. Análises *in silico* revelaram a presença de quatro STPs no genoma de *C. violaceum*, sendo que duas possuem apenas o domínio de fosfatase (CV_0881 e CV_3848) e duas possuem um domínio adicional de regulador de resposta (CV_2644 e CV_3505). Mutantes nulos foram construídos para as quatro STPs e todas estas linhagens apresentaram crescimento semelhante ao da linhagem selvagem em meio rico e meio mínimo. As linhagens mutantes Δ 0881, Δ 2644 e Δ 3505 não apresentaram alteração de virulência em camundongos. Os mutantes Δ 2644 e Δ 3505 apresentaram menor formação de biofilme, o que sugere papel dessas fosfatases neste processo. Uma caracterização mais aprofundada da linhagem Δ 3848 por diferentes técnicas de microscopia revelou que este mutante apresenta células de tamanho diminuído, irregularidades no envelope celular e problemas na distribuição do DNA. Estes dados sugerem que CV_3848 tem papel em divisão celular, condensação do material genético e manutenção da parede celular. Nos ensaios de virulência o mutante Δ 3848 mostrou menor capacidade de causar morte e manter-se no fígado de camundongos, indicando que a STP CV_3848 é importante na patogenicidade de *C. violaceum*.

Palavras-chave: *Chromobacterium violaceum*, fosforilação, fosfatase, virulência.

ABSTRACT

Pereira, GKB. The role of a eukaryotic-like serine/threonine phosphatase on the virulence of *Chromobacterium violaceum*. 2017. 65 p. Dissertation – Department of Cell and Molecular Biology, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo.

Protein phosphatases play a key role in reversible post-translational modification of proteins through phosphorylation since they act removing the stable phosphoryl group of serine, threonine and tyrosine residues. Although dominant in eukaryotes, the serine/threonine phosphatases (STPs) also exist in bacteria, in which they act by controlling various physiological and virulence traits. In this work we investigated the role of STPs on the virulence and physiology of *Chromobacterium violaceum*, a β -proteobacterium that occasionally acts as a pathogen of humans and it is widely found in water and soil of tropical and subtropical regions. *In silico* analyzes revealed the presence of four STPs in the genome of *C. violaceum*, two of which have only the phosphatase domain (CV_0881 and CV_3848) and two that possess an additional domain of response regulator (CV_2644 and CV_3505). Null mutants were constructed for the four STPs and all of them showed similar growth to the wild type strain on rich and minimal medium. The mutant strains Δ 0881, Δ 2644 and Δ 3505 did not show any change in virulence in mice. The Δ 2644 and Δ 3505 mutants had lower biofilm formation, suggesting the role of these phosphatases in this process. Further characterization of Δ 3848 by different microscopy techniques revealed that this mutant presents cells of diminished size, irregularities in the cellular envelope and problem on the DNA distribution. These data suggest that CV_3848 has role in cell division, condensation of the genetic material and cell wall maintenance. In virulence assays the Δ 3848 mutant showed a lower ability to cause death and to remain in the liver of mice, indicating that the STP CV_3848 is important for the pathogenicity of *C. violaceum*.

Keywords: *Chromobacterium violaceum*, phosphorylation, phosphatase, virulence.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Linhagens e plasmídeos	22
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho	23
Tabela 3: Antibióticos utilizados no ensaio de antibiograma	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Sistemas de fosforilação/desfosforilação em bactérias.....	14
Figura 2: Proteínas fosfatases diversas de bactérias patogênicas selecionadas.....	17
Figura 3: Colônias de <i>C. violaceum</i> em meio ágar sangue.....	19
Figura 4: Serina/treonina fosfatases e seus domínios em <i>C. violaceum</i>	34
Figura 5: Esquema para construção dos mutantes nulos de STPs em <i>C. violaceum</i>	35
Figura 6: Confirmação da construção das linhagens mutantes de STPs.....	36
Figura 7: Clonagem, expressão e purificação da STP CV_3848.....	38
Figura 8: Ensaio de fosforilação/desfosforilação <i>in vitro</i>	39
Figura 9: Curvas de crescimento e ensaio de viabilidade das linhagens mutantes das STPs.....	40
Figura 10: Ensaio de formação de biofilme dos mutantes de STPs.....	41
Figura 11: Susceptibilidade a antibióticos das linhagens mutantes de STPs.....	42
Figura 12: Análise por microscopia eletrônica de varredura dos mutantes das STPs.....	43
Figura 13: Análise por microscopia eletrônica de transmissão da linhagem mutante $\Delta 3848$	45
Figura 14: Análise por microscopia multifóton do mutante $\Delta 3848$	46
Figura 15: Papel das STPs na virulência de <i>C. violaceum in vivo</i>	48

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Modificação pós-traducional por fosforilação em bactérias e eucariotos.....	13
1.2 Proteínas fosfatases do tipo eucariótico em bactérias	15
1.3 <i>Chromobacterium violaceum</i>	18
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Análise <i>in silico</i> de STPs no genoma de <i>C. violaceum</i>	22
3.2 Linhagens, plasmídeos e oligonucleotídeos.....	22
3.3 Meio de cultura e condições de cultivo de <i>E. coli</i>	24
3.4 Meios de cultura e condições de cultivo de <i>C. violaceum</i>	25
3.5 Técnicas básicas de Biologia Molecular	25
3.5.1 Clonagens: PCR, digestão, ligação, transformação e minipreparação de plasmídeo.....	25
3.5.2 Sequenciamento de DNA	26
3.6 Construção das linhagens mutantes	27
3.7 Complementação do mutante $\Delta 3848$	28
3.8 Clonagem, expressão e purificação da STP CV_3848	28
3.9 Produção de anticorpos policlonais.....	29
3.10 Ensaio de fosforilação/desfosforilação.....	29
3.11 Análise da virulência das linhagens mutantes.....	30
3.11.1 Ensaio de virulência em camundongos.....	30
3.11.2 Quantificação da carga bacteriana no fígado.....	30
3.12 Análise fenotípica das linhagens mutantes	31
3.12.1 Ensaio de formação de biofilme	31
3.12.2 Antibiógrama	31
3.12.3 Microscopia eletrônica de varredura	32
3.12.4 Microscopia eletrônica de transmissão	32
3.12.5 Microscopia Multifoton	33
3.13 Análise estatística	33
4. RESULTADOS	34
4.1 Identificação de STPs no genoma de <i>C. violaceum</i>	34

4.2 Obtenção de ferramentas para a caracterização das STPs de <i>C. violaceum</i>	35
4.2.1 Construção das linhagens mutantes de STPs.....	35
4.2.2 Purificação da STP CV_3848 e produção de anticorpo policlonal.....	37
4.3 Ensaio de (des)fosforilação de possíveis alvos da STP CV_3848.....	38
4.4 Caracterização fenotípica das linhagens mutantes de STPs.....	39
4.4.1 Curvas de crescimento e ensaios de viabilidade das linhagens mutantes.....	39
4.4.2 Formação de biofilme nas linhagens mutantes de STPs.....	41
4.4.3 Susceptibilidade das linhagens mutantes de STP a antibióticos.....	42
4.4.4 Análise da ultraestrutura das linhagens mutantes de STPs.....	42
4.4.4.1 Análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	42
4.4.4.2 Análise da linhagem mutante Δ 3848 por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia multifóton.....	44
4.5 Virulência das linhagens mutantes de STPs em camundongos.....	47
5. DISCUSSÃO	49
6. CONCLUSÃO	55
7. BIBLIOGRAFIA	56

1. INTRODUÇÃO

1.1 Modificação pós-traducional por fosforilação em bactérias e eucariotos

A fosforilação reversível de proteínas, considerada como sendo a linguagem universal para comunicação intracelular e intercelular, é uma das modificações pós-traducionais (PTM, do inglês *Post-Translational Modification*) mais importantes em vias de transdução de sinal tanto em bactérias quanto em eucariotos (GNAD et al., 2010; KYRIAKIS, 2014). Através de vias de transdução de sinal as bactérias sentem variações do ambiente e elaboram rápidas respostas adaptativas que garantem sua sobrevivência frente às mudanças das condições ambientais, enquanto em eucariotos estas vias controlam processos complexos como proliferação, diferenciação e morte celular, desenvolvimento, comportamento e resistência a patógenos (PEREIRA; GOSS; DWORKIN, 2011; CAPRA; LAUB, 2012; KYRIAKIS, 2014). A eficácia desta PTM reversível deve-se a carga negativa do grupo fosfato, que ao ser adicionado por proteínas quinases ou removido por proteínas fosfatases, em resíduos de serina (Ser), treonina (Thr), tirosina (Tyr), histidina (His) e aspartato (Asp), promove grande mudança estrutural, modificando a atividade das proteínas (KYRIAKIS, 2014).

Embora seja um processo universal, a fosforilação reversível de proteínas apresenta características distintas em eucariotos e procariotos, tanto nos resíduos de aminoácidos fosforilados e nas famílias de proteínas quinases e fosfatases envolvidas quanto na organização destes elementos nas vias de transdução de sinal. Em eucariotos, a sinalização ocorre através de cascatas de fosforilação de proteínas que requer a ação coordenada de um número de serina/treonina e tirosina quinases e suas respectivas fosfatases (PAWSON; NASH, 2000; BOEKHORST et al., 2008). Já em bactérias, a transdução de sinal ocorre principalmente pela ação dos sistemas de dois componentes (TCS, do inglês *Two-Component System*) (Fig. 1A), os quais realizam o reconhecimento de um sinal extracelular e fazem a transdução deste sinal e a consequente ativação de respostas (BARRETT; HOCH, 1998). Um TCS típico possui uma histidina quinase (HK) sensora acoplada à membrana que reconhece sinais estimulatórios extracelulares e que, quando ativada, se autofosforila em um resíduo His conservado. Então, o grupo fosforil é transferido para um resíduo

Asp conservado em um regulador de resposta (RR) citoplasmático (Fig. 1A). Os RRs são proteínas modulares que possuem geralmente dois domínios, o domínio regulador de resposta, o qual é fosforilado, e um domínio de saída efetor, que pode ser, por exemplo, um domínio com motivo de ligação ao DNA. Uma vez fosforilado, o RR irá mudar sua conformação e desencadear uma resposta, que dependendo do seu domínio de saída, pode ser a ativação de genes por sua ligação direta ao DNA e regulação transcricional, ou ainda interação proteína-proteína e atividades enzimáticas (BARRETT; HOCH, 1998; FOUSSARD et al., 2001; CAPRA; LAUB, 2012; BRETL; DEMETRIADOU; ZAHRT, 2011).

Figura 1: Sistemas de fosforilação/desfosforilação em bactérias. (A) O clássico sistema de dois componentes (TCS) formado por uma histidina quinase sensora (HK) e um regulador de resposta (RR). **(B)** Uma via de sinalização envolvendo serina/treonina quinase (STK) e serina/treonina fosfatase (STP) do tipo eucariótico. Notar a necessidade de fosfatases (STP) para desfosforilar resíduos de serina e treonina de proteínas-substrato (Sub) (Adaptado de DWORKIN, 2015).

Por muitos anos perdurou a visão de que em bactérias ocorre fosforilação apenas em resíduos de histidina e aspartato, como em um típico TCS, e que a fosforilação em resíduos de serina, treonina e tirosina ocorreria exclusivamente em eucariotos. No entanto, a partir da década de 90, graças a tecnologias como cristalografia de raios-x, sequenciamento genômico e espectrometria de massa, constatou-se que bactérias também possuem quinases e fosfatases

estruturalmente semelhantes às eucarióticas (Fig. 1B) (SHI; POTTS; KENNELLY, 1998; BAKAL; DAVIES, 2000; KENNELLY, 2002; PEREIRA; GOSS; DWORKIN, 2011) e que seus fosfoproteomas são também fosforilados em Ser, Thr e Tyr (MACEK et al., 2007; GE; SHAN, 2011). A partir de então, estas serina/treonina quinases (STK) e serina/treonina fosfatases (STP) do tipo eucariótico têm sido relacionadas ao controle de vários processos em bactérias, tais como divisão celular, esporulação, diferenciação celular, resistência a antibióticos, formação de biofilme e subversão de defesas do hospedeiro (JIN; PANCHOLI, 2006; BURNSIDE; RAJAGOPAL, 2011; PEREIRA; GOSS; DWORKIN, 2011; GRISHIN; BEYRAKHOVA; CYGLER, 2015).

1.2 Proteínas fosfatases do tipo eucariótico em bactérias

O rápido desligamento da resposta é fundamental em vias de transdução de sinal. Assim, é fácil entender porque a fosforilação predomina nestas vias, pois esta PTM é prontamente revertida através de reações de desfosforilação, catalisadas por proteínas fosfatases. Nos sistemas de dois componentes bacterianos, a natureza lábil dos resíduos de fosfohistidina e aspartil-fosfato, parece dispensar a existência de fosfatases específicas, sendo a remoção do grupo fosfato realizada por atividade de autofosfatase do regulador de resposta ou atividade de fosfatase de histidina quinases bifuncionais (Fig. 1A) (KENNELLY, 2001; CAPRA; LAUB, 2012). Por outro lado, a ligação covalente entre o grupo fosfato e o grupo hidroxila da cadeia lateral dos resíduos de serina, treonina e tirosina forma fosfomonoésteres de grande estabilidade, sendo assim necessária a existência de proteínas fosfatases específicas para a desfosforilação destes aminoácidos (Fig. 1B) (KENNELLY, 2001). Em eucariotos quatro superfamílias de fosfomonoéster proteínas fosfatases têm sido descritas: as famílias PPP (do inglês, *PhosphoProtein Phosphatase*) e PPM (do inglês, *Mg²⁺ or Mn²⁺-dependent Protein Phosphatase*) de serina/treonina fosfatases (STPs, do inglês *Ser/Thr Phosphatases*) e duas famílias de proteína tirosina fosfatases (PTP, do inglês *Protein Tyrosine Phosphatase*), a família PTP convencional e a família LMW-PTP (PTP de baixo peso molecular) (KENNELLY, 2001).

Ortólogos de todas estas famílias são encontrados em bactérias, em diferentes quantidades e associações (Fig. 2) (SHI; POTTS; KENNELLY, 1998; BAKAL; DAVIES, 2000; KENNELLY, 2002; BHADURI; SOWDHAMINI, 2005; PEREIRA; GOSS; DWORKIN, 2011). Em bactérias, o papel e o conhecimento a respeito de cada uma destas famílias de proteínas fosfatases do tipo eucariótico é bastante variável. Com relação as STPs, na família PPP os membros mais conhecidos são PrpA e PrpB de *E. coli*, envolvidas em resposta a estresse do envelope (KENNELLY, 2001). A família PPM de STPs possui domínios adicionais e motivos de sequência conservados que podem ajudar a determinar a especificidade do substrato (SHI, 2009). Essa família tem vários membros bem caracterizados, sobretudo em bactérias patogênicas (Fig. 2), sendo a maioria pertencente a subfamília PP2C. Nesta subfamília é bastante comum observar as proteínas fosfatases sendo cotranscritas com suas quinases cognatas (BURNSIDE; RAJAGOPAL, 2011; SAJID et al., 2015).

Neste grupo estão cinco proteínas de *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) (SpolIE, RsbP, RsbU, RsbX e PrpC) que controlam cascatas de fatores sigma alternativos envolvidos em esporulação e resposta geral a estresse e a proteína Stp1, que juntamente com a quinase Stk1, regula diversos processos em vários cocos Gram-positivos (Fig. 2) (KENNELLY, 2001; BURNSIDE; RAJAGOPAL, 2011). A única serina/treonina fosfatase (STP) de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) é codificada pelo gene *stpP*, o qual forma operon com duas STKs, *pknA* e *pknB*, e atua na correta divisão celular bacteriana, uma vez que mutantes nulos *stpP* formam células mais alongadas com sobrevivência comprometida (CHOPRA et al., 2003; SHARMA et al., 2016). Já em *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*), a STP PppA está relacionada com a secreção de proteínas a partir do sistema de secreção do tipo VI, regulação negativa da hemolisina por inibir a secreção da proteína co-reguladora de Hemolisina (Hcp1) (SAJID et al., 2015), e juntamente com sua quinase cognata é importante para crescimento sob estresse e durante a infecção de macrófagos em modelo murino (GOLDOVÁ et al., 2011). A STP de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) e sua quinase cognata (STP/STK) regulam a integridade da membrana, divisão celular, formação de septos e estrutura de peptidoglicanos. Além disso, também estão relacionadas à expressão de hemolisinas, que estão intimamente relacionadas à virulência da bactéria (Sajid et al., 2015; Burnside et al., 2010). No gênero *Streptococcus* as

STK e STP também são cotranscritas e tem grande papel na homeostase da parede celular (Fig. 2) (BURNSIDE; RAJAGOPAL, 2011; SAJID et al., 2015). Em *S. agalactiae* o par STK/STP controla crescimento celular e morfologia por fosforilar diversos substratos. Já em *S. pyogenes* STP se relaciona com divisão celular, formação de septos, produção de hemolisina, aderência celular, virulência e fagocitose (AGARWAL et al., 2011). Em *S. pneumoniae* o par STK/STP está envolvido com a síntese da parede celular, divisão celular e formação de septos (SAJID et al., 2015).

Figura 2: Proteínas fosfatases diversas de bactérias patogênicas selecionadas. A figura mostra exemplos caracterizados de proteínas fosfatases que desfosforilam resíduos de serina/treonina (STPs) e tirosina (PTP) envolvidas em virulência de importantes patógenos humanos (as cores relacionam as fosfatases com cada gênero bacteriano). As funções destas enzimas estão descritas no texto. (Adaptado de SAJID et al., 2015).

Em relação às PTP, a família LMW-PTP tem como principal função regular a síntese de exopolissacarídeos e de polissacarídeos capsulares em várias bactérias (STANDISH; MORONA, 2014). Finalmente, a família PTP convencional inclui tirosinas fosfatases secretadas (em muitos casos pelos sistemas de secreção do tipo III) que atuam diretamente desfosforilando alvos de vias de sinalização de células eucarióticas, subvertendo assim funções da célula hospedeira (Fig. 2). Exemplos bem caracterizados incluem YopH de *Yersinia pestis* (*Y. pestis*), MtpB de *M. tuberculosis* e SptP de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (*S. Typhimurium*) (GRISHIN; BEYRAKHOVA; CYGLER, 2015; SAJID et al., 2015). É possível também encontrar tirosinas fosfatases envolvidas com formação de biofilme e motilidade flagelar como a TpbA de *P. aeruginosa* (UEDA; WOOD, 2009; SAJID et al., 2015).

Embora esteja cada vez mais claro que em bactérias patogênicas a fosforilação de serina/treonina/tirosina controla vários aspectos da relação patógeno-hospedeiro, incluindo regulação da expressão de fatores de virulência (BURNSIDE; RAJAGOPAL, 2011, 2012; WRIGHT; ULJASZ, 2014; DWORKIN, 2015) ou modificação de vias de transdução de sinal na célula eucariótica (CANOVA; MOLLE, 2014; GRISHIN; BEYRAKHOVA; CYGLER, 2015), a maioria dos estudos estão focados principalmente nas proteínas quinases. Apenas alguns poucos trabalhos investigaram o papel direto das fosfatases em virulência, incluindo as PTP convencionais HopAO1 de *Pseudomonas syringae* (MACHO et al., 2014), YopH de *Yersinia* (BLISKA et al., 1991) e SptP de *S. Typhimurium* (CHOI et al., 2013) e as STPs de cocos Gram-positivos (AGARWAL et al., 2011; BURNSIDE; RAJAGOPAL, 2011; SAJID et al., 2015). Desta forma, muito ainda precisa ser feito para termos uma visão mais aprofundada do papel das fosfatases do tipo eucariótico na virulência e na fisiologia bacteriana, sobretudo o papel das STPs em bactérias Gram-negativas.

1.3 *Chromobacterium violaceum*

A *Chromobacterium violaceum* (*C. violaceum*) é um bacilo Gram-negativo e anaeróbico facultativo que em termos taxonômicos encontra-se alocada na classe Betaproteobacteria, ordem Neisseriales e família Chromobacteriaceae (NCBI Taxonomy). Esta bactéria é encontrada em água e solos de regiões

topicais e subtropicais, sendo comum em vários ecossistemas brasileiros (LIMA-BITTENCOURT et al., 2007). As colônias de *C. violaceum* produzem um pigmento de cor violeta insolúvel em água, a violaceína (Fig. 3), cuja expressão é controlada por *Quorum Sensing* (QS) (MCCLEAN et al., 1997). A produção de violaceína propicia que a *C. violaceum* seja usada como modelo para estudos de QS já que é um pigmento facilmente detectável e quantificável (KOTHARI; SHARMA; PADIA, 2017). Além de permitir que a *C. violaceum* seja utilizada como um repórter em estudos de QS, a violaceína apresenta significativa atividade biológica em estudos *in vitro*. Já foi descrita sua atividade anti-proliferativa sobre algumas linhagens cancerosas (HASHIMI; XU; WEI, 2015), atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas, tal como *S. aureus* multirresistente (CAZOTO et al., 2011), atividade antifúngica (SASIDHARAN et al., 2015), e antiparasitária (DURÁN et al., 2007). Além da violaceína, *C. violaceum* produz vários outros metabólitos secundários com potencial biotecnológico (DURÁN; MENCK, 2001), uma das razões que levaram ao sequenciamento do seu genoma, o qual consiste de um cromossomo circular com 4.75 Mb e conteúdo G+C em torno de 65% (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003).

Figura 3. Colônias de *C. violaceum* em meio ágar sangue. Notar a intensa pigmentação violeta decorrente da produção de violaceína. (Retirado de MARTINEZ; MATTAR, 2007).

A *C. violaceum* raramente acomete humanos, no entanto, a mesma pode se instalar no organismo, geralmente usando como rota de entrada lesões na pele expostas à água ou solo contaminado, e causar uma septicemia fatal

levando a óbito em poucos dias (CHATTOPADHYAY et al., 2002). Estima-se que a taxa de mortalidade seja superior a 50% em casos de infecção em humanos (LEE et al., 1999; YANG; LI, 2011; KARTHIK; PANCHARATNAM; BALAJI, 2012). O primeiro caso de infecção humana por *C. violaceum* foi descrito em 1927 na Malásia (SNEATH, 1953). Desde então por volta de 200 casos foram descritos na literatura médica ao redor do mundo, em países como Vietnã, Taiwan, Japão, Estados Unidos, Brasil, Argentina, Austrália, Senegal, Índia, Coreia, Sri Lanka e Nepal (YANG; LI, 2011; KARTHIK; PANCHARATNAM; BALAJI, 2012). São sintomas comuns de infecção por *C. violaceum*, abscessos na pele e em vários outros órgãos, principalmente pulmão, fígado e baço (CHATTOPADHYAY et al., 2002; YANG; LI, 2011; WINDER et al., 2012). Notoriamente, *C. violaceum* possui elevada resistência a diversos antibióticos o que, em alguns casos, complica consideravelmente o tratamento com drogas antibacterianas (ALDRIDGE et al., 1988; FANTINATTI-GARBOGGINI et al., 2004).

Vários potenciais fatores de virulência foram preditos no genoma de *C. violaceum*, incluindo lipopolissacarídeo (LPS), fímbrias do tipo IV, hemolisinas, enzimas degradativas e a presença de dois sistemas de secreção do tipo III, localizados nas ilhas de patogenicidade Cpi-1 e Cpi-2 (BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM, 2003; ALVES DE BRITO et al., 2004). Trabalhos recentes, utilizando camundongos como modelo experimental, confirmaram o alto potencial de virulência de *C. violaceum* e o papel central do sistema de secreção do tipo III localizado em Cpi-1. O quadro de formação de abscessos, sobretudo no fígado, seguido de sepse, foi reproduzido neste modelo animal (MIKI et al., 2010, 2011). A maioria dos fatores de virulência tem sua expressão altamente regulada, sendo ativados quando a bactéria entra em contato com o hospedeiro. Muito desta regulação envolve fatores de transcrição, que por sua vez, têm sua atividade modulada por sistemas de transdução de sinal envolvendo fosforilação. O genoma de *C. violaceum* tem uma proporção elevada de genes associados a mecanismos de transdução de sinal, sendo que a maioria ainda não foi estudada (HUNGRIA et al., 2004). Neste trabalho, investigamos o papel de quatro serina/treonina fosfatases do tipo eucariótico na virulência e em vários aspectos da fisiologia de *C. violaceum*.

2. OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi identificar e definir o papel das serina/treonina fosfatases do tipo eucariótico (STPs) na virulência e na fisiologia de *Chromobacterium violaceum*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Análise *in silico* de STPs no genoma de *C. violaceum*

As STPs estudadas neste trabalho foram identificadas no genoma de *C. violaceum* utilizando banco de dados específicos como o Pfam (<http://pfam.xfam.org>) e o MiST (<http://mistdb.com>), nos quais foi utilizada busca pelo domínio SpoIIIE, o SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de>), no qual foi feita a busca pelo domínio PP2C_SIG e o InterPro (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>), no qual a busca foi pelo domínio PPM-type phosphatase (IPR001932).

3.2 Linhagens, plasmídeos e oligonucleotídeos

As linhagens bacterianas e os plasmídeos utilizados para esse trabalho encontram-se listados na Tabela 1. Os oligonucleotídeos (Invitrogen) estão listados na Tabela 2.

Tabela 1: Linhagens e plasmídeos.

Linhagem	Fenótipo/genótipo	Origem/Referência
<i>E. coli</i> DH5α	F-Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZ</i> YA- <i>argF</i>) U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rK-, mK+) <i>phoA supE44 λ- thi-1 gyrA96 relA1</i>	HANAHAN, 1983
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	Superexpressão de proteínas	Novagen
<i>E. coli</i> S17-1	Conjugação de plasmídeos	SIMON et al., 1983
<i>E. coli</i> BL21(DE3) pETCV_3848 EXP	Linhagem superexpressando o gene CV_3848	Este trabalho
<i>Chromobacterium violaceum</i> ATCC 12472	Sequenciada, isolado de água, patogênica, produz violaceína	Fundação André Tosello (Campinas)
<i>C. violaceum</i> Δ0881	Mutante nulo para o gene CV_0881	Este trabalho
<i>C. violaceum</i> Δ2644	Mutante nulo para o gene CV_2644	Este trabalho

<i>C. violaceum</i> Δ3505	Mutante nulo para o gene CV_3505	Este trabalho
<i>C. violaceum</i> Δ3848	Mutante nulo para o gene CV_3848	Este trabalho
<i>C. violaceum</i> ΔDuplo	Mutante nulo para os genes CV_3848 e CV_3849	Este trabalho
<i>C. violaceum</i> Δ3848 COMP	Linhagem mutante Δ3848 complementada com o gene CV_3848	Este trabalho
<i>C. violaceum</i> + pMR20Φ	Linhagem selvagem com plasmídeo pMR20 vazio	Este trabalho
<i>C. violaceum</i> Δ3848 + pMR20Φ	Linhagem mutante Δ3848 com plasmídeo pMR20 vazio	Este trabalho
<i>C. violaceum</i> Δ3848 COMP OPERON	Linhagem mutante Δ3848 complementada com os genes CV_3848 e CV_3849	Este trabalho
Plasmídeos	Características*	Origem/Referência
pNPTS138	Vetor de clonagem, suicida, Can ^r	M.R.K. Alley
pET15b	Vetor de expressão; promotor induzido por IPTG; repressor <i>lacI</i> ; Amp ^r	Novagen
pMR20	Vetor para complementação, Tet ^r	ROBERTS et al., 1996

*Abreviações: Can, canamicina; Amp, ampicilina, Tet, tetraciclina, r, resistência.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

Nome	Sequência 5'→3'	Enzima de Restrição	Finalidade
CV_0881del1	agtgggccctggagcgcacagcggaag	Apal	Mutagênese
CV_0881del2	atcaagcttcgcaaacggcgtagcgcc	HindIII	Mutagênese
CV_0881del3	atcaagctttgagcgaacagttgaacctctc	HindIII	Mutagênese
CV_0881del4	gtagaattccccgtcccctccagcctg	EcoRI	Mutagênese
CV_2644del1	agtggggcccaaatcgccggacgggtgag	Apal	Mutagênese
CV_2644del2	atcaagcttagtgaaagtgcgatccatggg	HindIII	Mutagênese

CV_2644del3	atcaagcttagcttggtttaccacggcagc	HindIII	Mutagênese
CV_2644del4	cttgatccagcgcgagcaaacggccag	BamHI	Mutagênese
CV_3505del1	agtgggccctccaaggatggcgtcaccgc	Apal	Mutagênese
CV_3505del2	atcaagcttggtgccccaaacccggaacat	HindIII	Mutagênese
CV_3505del3	atcaagcttgaggctggtgttggaacctg	HindIII	Mutagênese
CV_3505del4	gtagaattctgattctgtccgacgtggacc	EcoRI	Mutagênese
CV_3848del1	agtggggccgtgagcaatttctccgcgcg	Apal	Mutagênese
CV_3848del2	atcaagctccggctttctgaaagatgga	HindIII	Mutagênese
CV_3848del3	atcaagctgaaaagacgccgccgcaaaag	HindIII	Mutagênese
CV_3848del4	gtagaattccaccacgttcatatcgggtctc	EcoRI	Mutagênese
Duplodel1	atcaagcttctcgatcagcacggcctca	HindIII	Mutagênese
Duplodel2	cttgatccgctgaaaccgcccatcgaca	BamHI	Mutagênese
Duplodel3	atcgatccgaaaagacgccgccgcaaaag	BamHI	Mutagênese
Duplodel4	gtagaattccaccacgttcatatcgggtctc	EcoRI	Mutagênese
CV_3848-EXP-FW	ttactgcatatgaaactgtccatcttcagg	NdeI	Expressão
CV_3848-EXP-RV	ttacgtggatcctcagctgtcctgtccacctg	BamHI	Expressão
CV_3849-COMP-FW	ccgattaagcttgatgctcaatatcatgcgg	HindIII	Complementação
CV_3848-COMP-RV	ttaccgggatccggataaagaagatcgacggcg	BamHI	Complementação
CV_3848-COMP-FW	ccaatcaagcttctggtcggctggatcaagg	HindIII	Complementação

3.3 Meio de cultura e condições de cultivo de *E. coli*

Todas as linhagens de *E. coli* foram cultivadas em meio LB líquido (composição: triptona 10 g/L; extrato de levedura 5 g/L; NaCl 10 g/L; pH 7,4), a 37°C, agitação de 250 rpm ou em placas com acréscimo de ágar (15 g/L) e mantidas em estufa a 37°C. Quando necessário as culturas foram suplementadas com os antibióticos ampicilina (100 µg/mL), canamicina (50 µg/mL) e tetraciclina (12 µg/mL).

3.4 Meios de cultura e condições de cultivo de *C. violaceum*

As linhagens de *C. violaceum* foram cultivadas em três diferentes meios de cultura, de acordo com o ensaio em questão. Cultivo em meio LB líquido a 37°C, rotação de 250 rpm e em placas LB (estufa a 37°C), para cultivo de rotina e na maioria dos ensaios. Para o antibiograma as linhagens foram retiradas do freezer em placas LB, posteriormente repassadas em placas de ágar Müller-Hinton (MH) (Sigma-Aldrich) e posteriormente cultivadas em MH a 37°C, agitação de 250 rpm por 24h. Para ensaio em meio mínimo, *C. violaceum* foi cultivada em meio M9 (AUSUBEL et al., 2001), suplementado com 0,1% de hidrolisado de caseína.

3.5 Técnicas básicas de Biologia Molecular

3.5.1 Clonagens: PCR, digestão, ligação, transformação e minipreparação de plasmídeo

A amplificação dos fragmentos de DNA de interesse foi feita através de reações de PCR com enzima de alta fidelidade *Phusion* (Thermo Scientific). Para cada reação foi utilizada: 50 ng de DNA genômico de *C. violaceum*, 0,5 µM de cada oligonucleotídeo (Tabela 2), 0,2 mM de cada dNTP, 0,6 U de DNA polimerase *Phusion*, DMSO 3% e 1X de tampão da enzima *Phusion* 5X HF. Condições no termociclador:

98 °C – 3 min	} (30 ciclos)
98 °C – 10 seg	
64 °C – 30 seg	
72 °C – 30 seg/kb	
72 °C – 7 min	
4 °C - ∞	

Em seguida, os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese em gel de agarose 1% em tampão de corrida TBE 0,5X (Tris 44 mM, ácido bórico 44 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) a 100 V pelo tempo necessário. Para visualização, as amostras foram coradas com brometo de etídio 0,5 µg/mL e em seguida visualizadas com auxílio de luz ultravioleta. As bandas correspondentes aos

fragmentos de interesse foram extraídas do gel, purificadas e eluídas com o kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up* (Macherey-nagel).

As reações de digestão com enzimas de restrição foram feitas usando diretamente os produtos do PCR (os sítios de reconhecimento destas enzimas foram adicionados nos oligonucleotídeos, Tabela 2) ou os vetores de interesse (Tabela 1). Além do DNA, em cada reação de digestão foi adicionado 10 U de enzima de restrição em tampão apropriado (Thermo Scientific) e as reações foram mantidas a 37°C por 2h. Após remoção das enzimas com o kit *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up*, os insertos foram ligados aos vetores utilizando a enzima T4 DNA Ligase (Biolabs) em tampão fornecido pelo fabricante, a 16°C por 16h.

Um volume de 2 a 5 µL da ligação foi utilizado para eletroporação em *E. coli* DH5α eletrocompetente (AUSUBEL et al., 2001) em cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad) nas condições de 2,5 kV, 200 Ω e 25 µF. Após a eletroporação, as bactérias foram recuperadas em 600 µL de meio LB líquido a 250 rpm, 37°C por 1h. Em seguida, verteu-se cada alíquota em placas LB com o antibiótico adequado e X-gal e então as placas foram mantidas a 37°C por 24h. A seguir, as colônias brancas foram usadas como molde em PCR de colônia para verificar a clonagem dos insertos nos vetores. Aquelas colônias em que a clonagem foi confirmada foram inoculadas em 5 mL de meio LB com antibiótico adequado a 37°C e 250 rpm de agitação e, após 24h de cultivo foi feita extração do DNA plasmidial utilizando como sistema de minipreparação de plasmídeo o kit *NucleoSpin Plasmid QuickPure* (Macherey-nagel). Nos casos em que a construção obtida foi transferida para *C. violaceum*, o DNA plasmidial de um clone correto de cada minipreparação foi eletroporado em *E. coli* S17-1, nas mesmas condições já mencionadas.

3.5.2 Sequenciamento de DNA

Os fragmentos clonados nos vetores foram submetidos ao sequenciamento automático, utilizando os oligonucleotídeos universais M13Fw ou M13Rv, que flanqueiam a região de clonagem. As reações de sequenciamento consistiram de: 0,1 µg de minipreparação de DNA plasmidial, 3,2pmol de um dos oligonucleotídeos, tampão do fabricante e 1 µL de *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems). As condições das

reações de sequenciamento foram: 95°C por 5 min; 35 ciclos de 95°C por 30 seg, 52°C por 20 seg e 60°C por 4 min.

As amostras foram precipitadas com isopropanol 75% e lavadas duas vezes com etanol 70%. O sequenciamento foi realizado em um aparelho ABI-3100 *DNA Sequencer*, pelo serviço de sequenciamento do Centro de Estudos do Genoma Humano e Células Tronco, IB-USP. Comparou-se os fragmentos com o banco de dados do *GenBank*, utilizando a ferramenta BLAST (ZANG; MADDEN, 1997).

3.6 Construção das linhagens mutantes

Os mutantes nulos não polares das quatro STPs (CV_0881, CV_2644, CV_3505 e CV_3848), bem como o mutante duplo do operon CV_3849-3848, foram construídos por dupla recombinação homóloga em vetor suicida, um método já padronizado em nosso grupo para *C. violaceum* (da SILVA NETO et al., 2012). As construções contendo as regiões flangeadoras clonadas no vetor pNPTS138 de cada gene a ser deletado, foram obtidas da seguinte forma: cada uma das duas regiões foi amplificada por PCR com oligonucleotídeos específicos (Tabela 2), os fragmentos obtidos foram digeridos internamente com a mesma enzima de restrição, ligados entre si e usados como molde para reação de PCR com os oligonucleotídeos del1/del4. Estes insertos contendo as regiões flangeadoras unidas foram então digeridos externamente com enzimas de restrição (Tabela 2) e clonados no vetor pNPTS138. Todas estas construções foram transferidas para *C. violaceum* por conjugação, misturando de forma homogênea *C. violaceum* ATCC 12472 com *E. coli* S17-1 contendo cada construção, em placa de meio LB. Após 16h a 37°C, a mistura foi ressuspensa em 1 mL de meio LB líquido e espalhada em placas LB com ampicilina (100 µg/mL) e canamicina (50 µg/mL). As colônias isoladas foram então confirmadas por PCR para o evento de primeira recombinação. Em seguida, foram inoculadas em 5 mL de LB líquido e encubadas por dois dias em rotação a 250 rpm, 37°C. Logo, foi utilizado 1 µL de cada inóculo em placas de LB sem NaCl e com 15% de sacarose. As colônias resultantes dessas placas foram repassadas em placas LB e posteriormente em placas LB com canamicina. As colônias sensíveis a

canamicina foram testadas por PCR de colônia com os oligonucleotídeos del1 e del4 para confirmação dos mutantes nulos.

3.7 Complementação do mutante $\Delta 3848$

Para a complementação da linhagem mutante $\Delta 3848$ foram utilizadas duas diferentes construções, obtidas pela clonagem de diferentes fragmentos no vetor pMR20: uma construção que inclui o gene CV_3848 possivelmente sem região promotora e outra que inclui o operon CV_3849-3848, com o promotor na frente do gene CV_3849. Ambos os fragmentos foram amplificados por PCR usando oligonucleotídeos específicos (Tabela 2) com enzima de alta fidelidade e clonados como insertos HindIII/BamHI no vetor pMR20 digerido com as mesmas enzimas de restrição. Após confirmação da clonagem por PCR de colônia, foi feita extração do DNA plasmidial e estas construções foram introduzidas em *E. coli* S17-1, assim como o vetor pMR20 vazio. Por meio de conjugação, todas estas construções foram transferidas para *C. violaceum*, resultando nas linhagens *C. violaceum* WT com pMR20 Φ ; mutante $\Delta 3848$ com pMR20 Φ ; mutante $\Delta 3848$ complementado somente com CV_3848; mutante $\Delta 3848$ complementado com o operon CV_3849-3848 (Tabela 1).

3.8 Clonagem, expressão e purificação da STP CV_3848

A região codificadora do gene CV_3848 foi amplificada por PCR com oligonucleotídeos específicos (Tabela 2) e clonada no vetor pET15b, usando as enzimas de restrição NdeI e BamHI. Após confirmação da clonagem por PCR de colônia, foi feita extração do DNA plasmidial e esta construção foi introduzida em *E. coli* BL21(DE3). Então, uma colônia foi inoculada em 500 mL de meio LB com ampicilina. O inóculo permaneceu em rotação de 250 rpm a 37°C, até alcançar a DO_{600nm} de 0,5. A expressão da proteína recombinante foi induzida com IPTG 1 mM por 2h 37°C e agitação de 250 rpm. Após sonicação (10 pulsos de amplitude de 85% por 30 segundos) e centrifugação, as frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (precipitado) foram submetidas a gel SDS-PAGE para verificar a expressão e a solubilidade da proteína. A proteína de fusão His-CV_3848 então foi purificada a partir da fração solúvel por cromatografia de

afinidade em coluna com resina de níquel equilibrada em tampão fosfato, como descrito pelo fabricante (Qiagen). A proteína foi eluída em 500 mM de imidazol e estocada em tampão de estocagem (Tris-Cl 20 mM pH 7.4, NaCl 100 mM, glicerol 5%), após passagem em coluna de filtração em gel PD-10 (GE Healthcare).

3.9 Produção de anticorpos policlonais

A imunização para a produção de anticorpos policlonais foi feita pela injeção da proteína purificada CV_3848 em animais fêmeas BALB/c em 3 doses. A cada dose foi injetado por via subcutânea aproximadamente 0,05 mg de proteína com adição de adjuvante de Freund. As doses foram feitas a cada 15 dias e após as duas doses reforço foi feita a sangria total dos animais e coleta do soro após centrifugação. A presença de anticorpos no soro contra a proteína CV_3848 injetada foi testada por *western blot*, utilizando extratos de *C. violaceum*. Os soros foram utilizados na diluição 1:1000 e a detecção foi feita com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, utilizando o kit *Protein Detector LumiGLO Western Blotting*, conforme recomendado pelo fabricante (KPL). O protocolo experimental foi aprovado pela Comissão de Ética Animal da FMRP-USP com número 131/2015.

3.10 Ensaio de fosforilação/desfosforilação

Ensaio para detectar atividade de fosforilação/desfosforilação de extratos totais de proteínas de linhagens de *C. violaceum* foram realizados conforme protocolo previamente descrito (SUN et al., 2012). As linhagens foram cultivadas em 50 mL de meio LB até DO_{600nm} de aproximadamente 1,0. Após centrifugação a 5000 rpm por 10 minutos a 4°C, os pellets de bactérias foram ressuspensos em 1 mL de tampão de lise (Tris HCl 20 mM; MgCl 250 mM; DTT 1 mM, EDTA 0,1 mM; Glicerol 5%). Em seguida, as células foram lisadas por sonicação (4 pulsos de 10 segundos e amplitude de 85%) e centrifugadas a 15000 rpm por 15 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C. Após quantificação pelo método de Bradford, estes extratos proteicos foram utilizados nos ensaios de fosforilação/desfosforilação.

A mistura de reação consistiu de 1 µg ou 10 µg de extrato proteico e 0,7 µL de [γ - ^{32}P] ATP em tampão de fosforilação (50 mM Tris-HCl pH7,5; 0,1 mM EDTA; 1 mM MnCl_2). Em seguida, os tubos foram encubados a 37°C e após 30 minutos foi adicionado SDS *loading buffer* para parar a reação. As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE. Após a corrida, o gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue* (BioRad) por 1 hora e posteriormente revelado por autorradiografia.

3.11 Análise da virulência das linhagens mutantes

3.11. 1 Ensaio de virulência em camundongos

Para cada linhagem mutante e também para a linhagem selvagem de *C. violaceum* ATCC 12472 foram feitos inóculos em meio LB ($\text{DO}_{600\text{nm}}=0,01$) que permaneceram por 20h a 250 rpm, 37°C. Em seguida, os inóculos foram centrifugados a temperatura ambiente, 13000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de PBS. Então, foi feita uma diluição seriada e a diluição 10^{-3} , contendo 10^6 unidades formadoras de colônia (UFC), foi utilizada para o ensaio. As fêmeas BALB/c de cinco semanas passaram uma semana para aclimação nas instalações livres de patógenos do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP/USP. A injeção foi por via intraperitoneal e a sobrevivência dos animais foi monitorada diariamente por até duas semanas (MIKI et al., 2010). Ensaio de viabilidade em triplicata foram feitos para averiguar a correta dose de UFC utilizada. Para isso foram utilizadas placas LB para contagem de colônias. Todos os ensaios de virulência em camundongos foram realizados conforme o protocolo experimental número 131/2015, aprovado pela Comissão de Ética Animal da FMRP-USP.

3.11.2 Quantificação da carga bacteriana no fígado

A linhagem selvagem de *C. violaceum* ATCC 12472 e o mutante $\Delta 3848$ foram inoculados em meio LB e cultivados por 20h a 250 rpm, 37°C. Em seguida, os inóculos foram centrifugados a temperatura ambiente, 13000 rpm por 4 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de

PBS. Então, foi feita uma diluição seriada e a dose de 10^6 UFC foi utilizada para o ensaio, sendo que a injeção foi feita pela via intraperitoneal. No dia seguinte (aproximadamente 16h após a inoculação) os animais foram sacrificados e foi feita a extração imediata dos órgãos de forma bastante asséptica para que não houvesse contaminação. Os órgãos foram mantidos em 1 mL de PBS e posteriormente processados em homogeneizador por 20 segundos seguido por diluição seriada e plaqueamento das diluições em meio LB. As placas permaneceram por 24h a 37°C para contagem de colônias.

3.12 Análise fenotípica das linhagens mutantes

3.12.1 Ensaio de formação de biofilme

As culturas de *C. violaceum* ATCC 12472 e dos mutantes foram diluídas ($DO_{600nm}=0,01$) e cultivadas em 2 mL de LB em tubos de polipropileno a 37°C sem agitação. Após 16h, as células em suspensão foram removidas e as paredes dos tubos foram lavadas 3 vezes com água destilada. Em seguida, o material nos tubos foi corado com cristal violeta 0,1% por 10 minutos e o excesso de corante foi lavado com água. Para a quantificação, o cristal violeta foi solubilizado com etanol e quantificado em espectrofotômetro em DO_{600nm} .

3.12.2 Antibiograma

Para ensaio de antibiograma as linhagens mutantes e selvagem *C. violaceum* ATCC 12472 foram primeiramente retiradas do freezer em placa LB, sendo no dia seguinte repicadas em placas de meio Müller-Hinton (MH). Após 24h em MH, as bactérias foram coletadas e diluídas em PBS para DO_{600nm} de 0,1. Estes inóculos foram semeados em placas MH com auxílio de Swab de forma que toda a placa fosse uniformemente coberta. Os discos em papel filtro com diâmetro de 6 mm impregnados com os antibióticos (*BD BBL™ Sensi-Disc™ Antimicrobial Susceptibility Test Discs*) foram colocados depois da secagem das placas (Tabela 3). Os halos de inibição de crescimento em volta dos discos foram medidos com régua.

Tabela 3: Antibióticos utilizados no ensaio de antibiograma.

Antibiótico	Classe	Abreviação
Ampicilina	Penicilinas	AM
Amoxicilina	Penicilinas	AMC
Piperacilina	Penicilinas	PIP
Ticarcilina	Penicilinas	TIC
Imipenem	Carbapenêmicos	IPM
Meropenem	Carbapenêmicos	MEM
Cefotaxima	Cefalosporinas	CTX
Cefoperazona	Cefalosporinas	CFP
Cefoxitina	Cefalosporinas	FOX
Ceftazidima	Cefalosporinas	CAZ
Astreonamina	Monobactâmicos	ATM

3.12.3 Microscopia eletrônica de varredura

Foram feitos pré-inóculos em 5 mL de LB para a linhagem selvagem *C. violaceum* ATCC 12472 e para a linhagem mutante $\Delta 3848$, os quais permaneceram por 16h a 250 rpm, 37°C. Então, os pré-inóculos foram diluídos para DO_{600nm} de 0,1 em 1 mL de LB em placas de 12 poços e lamínulas de 13 mm foram adicionadas. As placas permaneceram por 16h a 100 rpm, 37°C. Em seguida, o meio LB foi retirado, as lamínulas foram lavadas 2 vezes com PBS e as bactérias foram fixadas nas lamínulas com 1 mL de glutaraldeído 3% por 3h a temperatura ambiente, seguida da retirada do fixador e adição do tampão fosfato de sódio. As amostras permaneceram a 4°C até que o protocolo restante da preparação fosse seguido. As próximas etapas foram realizadas conforme protocolos do Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos.

3.12.4 Microscopia eletrônica de transmissão

Culturas saturadas da linhagem selvagem *C. violaceum* ATCC 12472 e da linhagem mutante $\Delta 3848$ foram diluídas para DO_{600nm} de 0,01 em 5 mL de

LB. Após cultivo por 16h a 250 rpm e 37°C, as culturas foram centrifugadas a 13000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado. O pellet de células foi lavado 3 vezes com 1 mL de PBS e em seguida ressuspensionado com o fixador paraformaldeído 2%. O fixador permaneceu por 3h e em seguida as bactérias foram centrifugadas e o fixador descartado. O tampão fosfato de sódio foi adicionado e as amostras foram acondicionadas a 4°C até que o restante do protocolo fosse seguido. As próximas etapas foram realizadas conforme protocolos do Laboratório Multiusuário de Microscopia Eletrônica do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos.

3.12.5 Microscopia Multifóton

O pré-inóculo da linhagem selvagem *C. violaceum* ATCC 12472 e da linhagem mutante $\Delta 3848$ foi diluído para DO_{600nm} de 0,01 em 2 mL de meio LB e as linhagens foram cultivadas em placas de 12 poços, nas quais foram adicionadas lamínulas de 13 mm. As placas permaneceram a 100 rpm, a 37°C por 16h. O meio LB foi retirado e a lamínula foi lavada duas vezes com PBS e então o fixador paraformaldeído 2% foi adicionado por 15 minutos. Em seguida, lavou-se o fixador duas vezes com PBS. Então, as bactérias aderidas na lamínula foram coradas com DAPI 50 μM por 10 minutos ao abrigo da luz. As imagens foram produzidas no Laboratório de Microscopia Multifoton do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos. As análises do comprimento das bactérias e da distribuição do DNA marcado com DAPI foram realizadas com o programa ImageJ.

3.13 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o programa GraphPad Prism versão 6 através do teste t Student ou teste Mann Whitney. Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Identificação de STPs no genoma de *C. violaceum*

A busca *in silico* em quatro diferentes bancos de dados (Pfam, InterPro, MiST e SMART) por proteínas com domínio de fosfatase da família PPM levou a identificação de quatro proteínas serina/treonina fosfatases (STPs) do tipo eucariótico no genoma de *C. violaceum*: CV_0881, CV_2644, CV_3505 e CV_3848 (Fig. 4). As proteínas identificadas estão mostradas na figura 4 com o domínio de fosfatase do banco de dados SMART (PP2C_SIG, acesso SM00331). As proteínas CV_0881 e CV_3848 são pequenas e formadas apenas pelo domínio de fosfatase, enquanto as proteínas CV_2644 e CV_3505 possuem, além do domínio de fosfatase, um domínio de regulador de resposta (REC), o qual é encontrado em proteínas que atuam como reguladores de resposta em sistemas de dois componentes. Além desses dois domínios, CV_2644 também possui um domínio ATPase tipo histidina quinase na região carboxi-terminal. Portanto, *C. violaceum* tem pelo menos quatro proteínas com potencial de atuarem com STPs, inclusive em vias de sinalização.

Figura 4: Serina/treonina fosfatases e seus domínios em *C. violaceum*. As quatro proteínas serina/treonina fosfatases possuem o domínio PP2C, característico das fosfatases da família PPM. As proteínas CV_2466 e CV_3505 possuem também um domínio de regulador de resposta, e CV_2466 também possui um domínio ATPase tipo histidina quinase. Representação dos domínios de acordo com o banco de dados SMART e identificação dos genes de acordo com anotação original do genoma.

4.2 Obtenção de ferramentas para a caracterização das STPs de *C. violaceum*

4.2.1 Construção das linhagens mutantes de STPs

A fim de estudar a função das STPs de *C. violaceum*, linhagens mutantes nulas não polares foram construídas para cada STP. Os genes foram deletados por troca alélica em vetor suicida, procedimento que envolve a introdução na bactéria de uma construção no vetor contendo duas porções de homologia com as regiões flanqueadoras do gene que será deletado (Fig. 5). Uma primeira recombinação ocorre dentro de uma das regiões que é idêntica entre a construção plasmidial e o cromossomo, que integra todo o plasmídeo dentro do cromossomo. Depois disso, uma segunda recombinação pode ocorrer entre as regiões duplicadas, o que provoca a deleção do gene de interesse (Fig. 5).

Figura 5: Esquema para construção dos mutantes nulos de STPs em *C. violaceum*.

O esquema retrata a construção plasmidial utilizada em vetor suicida e os dois eventos de recombinação homóloga envolvendo as regiões flanqueadoras clonadas de cada STP a ser deletada do genoma de *C. violaceum*. Tracejado indica o evento mostrado.

Então, os mutantes nulos para cada uma das quatro STPs foram obtidos ($\Delta 0881$, $\Delta 2644$, $\Delta 3505$ e $\Delta 3848$) e ainda, um quinto mutante foi construído (Fig.

6) utilizando a mesma estratégia acima. Esse quinto mutante é nulo para a STP CV_3848 e para a STK CV_3849. Esses genes se encontram em operon no genoma de *C. violaceum* e o códon de terminação de CV_3849 está imbricado e sobreposto com o códon de iniciação de CV_3848 (Fig. 6). Esse mutante (Duplo Δ) foi construído para entender o papel deste operon STK/STP.

Figura 6: Confirmação da construção das linhagens mutantes de STPs. (A) Esquema mostrando a posição dos genes CV_3849 e CV_3848 no genoma de *C. violaceum*, destacando a organização em operon STK/STP e a sobreposição de códon. **(B)** As linhagens mutantes de todas as STPs e o mutante duplo foram confirmadas por PCR de colônia com oligonucleotídeos que hibridizam no começo e final da região flangeadora de cada gene (del1/4). (M) Marcador de peso molecular 1Kb plus DNA Ladder (Thermo Scientific); (1) controle WT *C. violaceum*; (2) primeira recombinação; (3) linhagem mutante. As bandas dos tamanhos esperados estão indicadas.

Os mutantes foram confirmados por PCR de colônia com oligonucleotídeos flanqueadores del1/del4, respectivos de cada gene. Na Figura 6B é possível observar a confirmação da deleção feita para cada gene com base nos tamanhos esperados em cada caso. Assim, no controle WT *C. violaceum* (canaleta 1) observa-se uma banda maior, na primeira recombinação (canaleta 2) observa-se a banda com tamanho maior e uma banda menor e, finalmente na linhagem mutante (canaleta 3) observa-se apenas a banda menor, confirmando a deleção do gene de interesse.

4.2.2 Purificação da STP CV_3848 e produção de anticorpo policlonal

Para melhor caracterizar a STP CV_3848, foi realizada a clonagem do seu gene em vetor de expressão para tentar purificá-la a partir de expressão heteróloga em *E. coli*. A clonagem no vetor pET15b foi confirmada por PCR (Fig. 7A). A proteína His-CV_3848 de 35 kDa foi então purificada por cromatografia de afinidade em coluna de níquel com alto grau de pureza (canaleta 4), embora o rendimento tenha sido baixo (Fig. 7B). O principal motivo para este baixo rendimento foi que grande parte da proteína induzida ficou insolúvel na forma de corpos de inclusão (não mostrado).

A proteína purificada foi utilizada para imunização de camundongos a fim de produzir anticorpos policlonais. O soro dos animais foi utilizado em ensaios de *western blot* com extratos proteicos de várias linhagens de *C. violaceum* (Fig. 7C). Foi possível observar a banda do tamanho esperado nas duas linhagens complementadas (Δ 3848 COMP e Δ 3848 COMP OPERON) e esta mesma banda em quantidade quase indetectável em *C. violaceum* WT e *C. violaceum* WT com pMR20 vazio (banda indicada por seta). Isto indica a proteína STP CV_3848 provavelmente é produzida em níveis muito baixos em condições normais de cultivo de *C. violaceum* e que a complementação com o gene clonado no vetor pMR20 está produzindo a proteína em quantidades bem maiores, sobretudo a construção contendo o operon. Não foi possível observar esta banda no mutante Δ 3848, no controle Δ 3848 com pMR20 vazio e no mutante duplo Δ , o que confirma a deleção de CV_3848 nessas linhagens. O soro também reconheceu uma banda inespecífica forte que está presente em todas as canaletas (indicada por asterisco).

Figura 7: Clonagem, expressão e purificação da STP CV_3848. (A) Confirmação da clonagem de CV_3848 no vetor de expressão pET15b por PCR de colônia com oligos específicos. Banda do tamanho esperado analisada em gel de agarose 1% com marcador de peso molecular 100 pb plus DNA Ladder (Thermo Scientific). (B) Indução e purificação da proteína CV_3848 analisadas em gel SDS-PAGE. M é marcador de peso molecular BenchMark Protein Ladder (Invitrogen); 1 corresponde a extrato da cultura antes da adição do indutor IPTG; 2 e 3 é o tempo em horas após a indução com IPTG; 4 indica a proteína purificada. (C) *Western blot* com soro anti-CV_3848 usando extratos das linhagens indicadas de *C. violaceum*. Banda específica indicada por seta e banda inespecífica indicada por asterisco.

4.3 Ensaio de (des)fosforilação de possíveis alvos da STP CV_3848

Para verificar possíveis alvos desfosforilados pela STP CV_3848, extratos totais de proteínas (1 μ g e 10 μ g de proteína) de diferentes linhagens de *C. violaceum* foram utilizados em ensaio de fosforilação/desfosforilação na presença de ATP radioativo (Fig. 8). As amostras foram aplicadas em gel SDS-PAGE 10%, o qual foi corado com *Coomassie* para verificar o carregamento igual de proteínas e exposto em filme para detectar proteínas fosforiladas. Foi possível observar duas bandas com sinal radioativo, de aproximadamente 15 kDa e 25 kDa. A de 15 kDa foi observada tanto em 1 μ g quanto em 10 μ g de extrato, enquanto a banda de 25 kDa só foi possível ser observada na quantidade maior.

Comparando entre as linhagens de *C. violaceum*, percebe-se que no mutante $\Delta 3848$ as bandas estão mais fortes, ou seja, mais fosforiladas do que nas demais linhagens, sugerindo que na ausência da STP CV_3848 estas proteínas-alvo estão sendo menos desfosforiladas. As linhagens complementadas apresentaram fosforilação equivalente à cepa selvagem de *C. violaceum*, indicando mais uma vez a complementação do mutante $\Delta 3848$ nas linhagens $\Delta 3848$ COMP e $\Delta 3848$ COMP OPERON.

Figura 8: Ensaio de fosforilação/desfosforilação *in vitro*. Extratos de proteína total (1 µg e 10 µg) das linhagens indicadas foram submetidos a ensaio de fosforilação com [γ - 32 P] ATP. É possível observar um aumento da fosforilação e/ou diminuição da desfosforilação nos alvos indicados (setas) na linhagem mutante $\Delta 3848$ em comparação com as outras linhagens. Abaixo está indicada a coloração do gel com *Coomassie*.

4.4 Caracterização fenotípica das linhagens mutantes de STPs

As linhagens mutantes das quatro STPs ($\Delta 0881$, $\Delta 2644$, $\Delta 3505$ e $\Delta 3848$), assim como o mutante duplo do operon CV_3849-3848 (Duplo Δ), foram submetidas a diferentes ensaios fenotípicos.

4.4.1 Curvas de crescimento e ensaios de viabilidade das linhagens mutantes

As curvas de crescimento foram feitas para todas as linhagens mutantes em meio rico LB (Fig. 9A) e em meio mínimo M9 com 0,1% de hidrolisado de caseína (Fig. 9B). Nas duas condições dos ensaios não foi observada diferença

de crescimento dos mutantes quando comparado com a linhagem WT de *C. violaceum* (WT). Ensaio de viabilidade de todas as linhagens também foi realizado. Nesse ensaio as linhagens foram cultivadas durante 20h em meio LB e, após diluição seriada, foram plaqueadas para a contagem de colônias. Foi possível identificar uma pequena diferença na viabilidade apenas da linhagem mutante de CV_0881 quando comparada à linhagem WT (Fig. 9C). Esses dados indicam que nenhuma das STPs é essencial para o crescimento de *C. violaceum* em meio rico LB e em meio mínimo M9, sugerindo que devem ter papel apenas em condições específicas.

Figura 9: Curvas de crescimento e ensaio de viabilidade das linhagens mutantes das STPs. (A) Curvas de crescimento de todas as linhagens em meio rico LB a 37°C por 48 horas. A absorbância a 600nm de cada cultura foi medida em intervalos de 1h até a oitava hora. **(B)** Curvas de crescimento de todas as linhagens em meio mínimo M9 a 37°C por 48 horas, medidas da mesma forma. **(C)** Sobrevivência das linhagens após serem cultivadas em meio LB por 20h (100 μ L da diluição 10^{-7} foram plaqueados em LB para a contagem das UFC). * indica a significância estatística pelo Teste t ($p < 0.05$).

4.4.2 Formação de biofilme nas linhagens mutantes de STPs

O biofilme é uma comunidade microbiana sésil em que células são anexadas a uma superfície ou a outras células e incorporadas em uma matriz extracelular protetora. O biofilme também propicia uma maior chance de sucesso durante a infecção, já que fornece defesa contra vários mecanismos de *clearance* do hospedeiro, incluindo aqueles do sistema imune, como os macrófagos (LISTER; HORSWILL, 2014; SCHERR et al., 2014). Para analisar o papel das STPs na formação de biofilme em *C. violaceum*, as linhagens mutantes e selvagem foram cultivadas em tubos de polipropileno e sua adesão foi medida por absorbância a 600nm, após coloração com cristal violeta. Observou-se pequena diferença na formação de biofilme para o mutante do gene CV_3505 e uma diferença um pouco maior no mutante de CV_2644 quando comparadas com a linhagem selvagem (Fig. 10). Esses dados sugerem que os genes CV_2644 e CV_3505 possuem um papel na formação do biofilme em *C. violaceum*.

Figura 10: Ensaio de formação de biofilme dos mutantes de STPs. As linhagens foram cultivadas em meio LB por 16h sem agitação. A quantificação do biofilme, feita por medida de absorbância (DO_{600nm}), foi realizada após coloração com cristal violeta 0,1% e solubilização com etanol. Significância estatística pelo Teste Mann Whitney *($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$).

4.4.3 Susceptibilidade das linhagens mutantes de STP a antibióticos

As linhagens mutantes e selvagem foram testadas para susceptibilidade a antibióticos por meio de antibiograma. Os antibióticos escolhidos foram aqueles relacionados à síntese da parede celular (beta-lactâmicos, Tabela 3), já que previamente foi observado papel de STPs no metabolismo da parede celular bacteriana (CAMERON et al., 2012). Para a grande maioria dos antibióticos não foi observada diferença na medição dos halos formados das linhagens mutantes em relação a linhagem selvagem (Fig. 11). Porém, os mutantes $\Delta 2644$ e $\Delta 3848$ foram mais resistentes ao antibiótico ticarcilina, da classe das penicilinas, sugerindo que os genes CV_2644 e CV_3848 tem papel na resistência a esse antibiótico atuante na síntese da parede celular (Fig. 11).

Figura 11: Susceptibilidade a antibióticos das linhagens mutantes de STPs. (A) Ensaio de difusão em disco para as linhagens mutantes e selvagem com diferentes antibióticos beta-lactâmicos (ver Tabela 3). **(B)** Ensaio de difusão em disco para o antibiótico ticarcilina. Nos valores dos halos está incluído o diâmetro dos discos (0,6 cm). * indica a significância estatística pelo Teste t ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$).

4.4.4 Análise da ultraestrutura das linhagens mutantes de STPs

4.4.4.1 Análises por microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Estudos anteriores comprovaram o papel de STPs na correta divisão celular e na morfologia da célula bacteriana (AGARWAL et al., 2011). Para

verificar a integridade e estrutura da parede celular e o formato da célula bacteriana foram realizadas análises por MEV dos mutantes das STPs (Fig. 12).

Figura 12: Análise por microscopia eletrônica de varredura dos mutantes das STPs. (A) Imagens evidenciando as células bacterianas das diferentes linhagens mutantes e selvagem de *C. violaceum*. Menor aumento: 1,000x; maior aumento 12,000x. As setas amarelas e vermelhas evidenciam células bacterianas de tamanho diminuído em $\Delta 3505$ e $\Delta 3848$, respectivamente. (B) Gráfico expressando a média do comprimento de células ($n \cong 524$) das linhagens indicadas. *** indica a significância estatística pelo Teste Mann Whitney ($p < 0.001$). As células foram medidas aleatoriamente.

Na maioria dos mutantes não foi possível observar mudança na morfologia da célula bacteriana, porém, na imagem de menor aumento (x1,000) é possível observar uma maior quantidade de células bacterianas de menor tamanho nas linhagens mutantes $\Delta 3505$ e $\Delta 3848$ (Fig. 12A). Para confirmar essa diferença, aproximadamente 500 células de cada linhagem foram medidas aleatoriamente e plotadas na figura 12B. Então, foi possível confirmar o tamanho diminuído das células dessas linhagens, evidenciando o possível papel de CV_3505 e CV_3848 na divisão celular em *C. violaceum*. Análise em maior aumento de células individuais dos quatro mutantes de STPs não mostrou diferenças morfológicas significativas (Fig. 12A, painéis a direita).

4.4.4.2 Análise da linhagem mutante $\Delta 3848$ por microscopia eletrônica de transmissão e microscopia multifóton

Nos ensaios de MEV acima foi possível observar o tamanho diminuído de muitas células bacterianas da linhagem mutante $\Delta 3848$ (Fig. 12B). Assim, para analisar mais a fundo a morfologia desse mutante foi realizado ensaio de microscopia eletrônica de transmissão (MET) (Fig. 13). No aumento de 10k x não foi possível observar grandes diferenças estruturais do mutante $\Delta 3848$ em relação a linhagem selvagem de *C. violaceum* (Fig. 13A). No entanto, em maior aumento (40k x e 80k x) foi possível observar diferenças no envelope celular do mutante, o qual apresenta irregularidades quando comparado ao envelope da linhagem selvagem. Enquanto o envelope celular da linhagem selvagem se mantém uniforme e regular, o da linhagem mutante apresenta ondulações, bem evidenciadas em maior aumento (80k x) (Fig. 13B). Também foi observada diferença no aspecto do conteúdo intracelular entre as linhagens selvagem e mutante $\Delta 3848$. Enquanto na selvagem notamos um interior mais “escurecido”, a linhagem mutante apresentou conteúdo mais “claro” (Fig. 13). Essa diferença pode ser decorrente de alterações na condensação do material genético na linhagem mutante.

Figura 13: Análise por microscopia eletrônica de transmissão da linhagem mutante $\Delta 3848$. (A) MET das linhagens selvagem WT de *C. violaceum* e mutante $\Delta 3848$ em aumento 10k x. Não é possível notar grandes diferenças entre as linhagens. No campo há maior número de células do mutante em relação a selvagem. (B) MET das linhagens selvagem e mutante $\Delta 3848$ nos aumentos 40k x e 80k x, evidenciando irregularidades no envelope celular da linhagem mutante e conteúdo intracelular mais claro do que o conteúdo da selvagem.

Para investigar essa hipótese de alteração na condensação do DNA foi realizado ensaio de microscopia multifóton com marcação por DAPI nas linhagens selvagem e mutante $\Delta 3848$ (Fig. 14). A marcação por DAPI mostrou

uma distribuição homogênea do DNA dentro das células na linhagem selvagem, enquanto na linhagem mutante $\Delta 3848$ o DNA se encontra distribuído de forma aparentemente irregular, estando provavelmente, mais condensado do que na linhagem selvagem (Fig. 14A). A quantificação da fluorescência de ambas linhagens indicou que a intensidade de fluorescência no mutante $\Delta 3848$ é significativamente menor quando comparado à linhagem selvagem (Fig. 14B).

Figura 14: Análise por microscopia multifóton do mutante $\Delta 3848$. (A) As linhagens selvagem e mutante $\Delta 3848$ foram marcadas com DAPI e visualizadas por microscopia de fluorescência (DAPI) e de campo claro (DIC). A sobreposição também está mostrada (MERGE). (B) Quantificação da intensidade de fluorescência das linhagens selvagem e mutante $\Delta 3848$. A fluorescência foi quantificada usando o programa ImageJ de células escolhidas aleatoriamente. *** indica a significância estatística pelo Teste t ($p < 0.001$).

4.5 Virulência das linhagens mutantes de STPs em camundongos

As STPs já foram vistas estando relacionadas com a virulência de diversas bactérias como as dos gêneros *Streptococcus* e *Staphylococcus* (SAJID et al., 2015). Assim, decidimos investigar se as STPs poderiam contribuir também para a virulência de *C. violaceum* em um modelo de infecção por via intraperitoneal em camundongos (Fig. 15). Estes ensaios de infecção *in vivo* mostraram que para a maioria dos mutantes não foi observada mudança no padrão de morte dos animais infectados. Porém, o gene CV_3848 mostrou-se relacionado à virulência de *C. violaceum* pois, enquanto na infecção com a linhagem selvagem a grande maioria dos animais morreram até o terceiro dia, na infecção com o mutante Δ 3848 alguns dos animais sobreviveram até o oitavo dia, tendo ainda um animal se recuperado da infecção e sobrevivido, portanto, apresentando uma atenuação na virulência (Fig. 15A). Para testar se essa atenuação é devida à falta de CV_3848, cepas complementadas foram testadas quanto à sua virulência. Como já dito anteriormente, CV_3848 está em operon com CV_3849 (Fig. 6A), estando a região promotora do operon à frente de CV_3849. Por isso, duas construções para complementação foram construídas, uma contendo os genes CV_3849 e CV_3848 e chamada de Δ 3848 COMP OPERON, e outra contendo somente o gene CV_3848 chamada de Δ 3848 COMP. Nenhuma das duas construções conseguiu recuperar o padrão de virulência visto na linhagem selvagem. Ao contrário, ambas apresentaram um padrão ainda mais atenuado de virulência do que o mutante Δ 3848, algo que foi mais pronunciado ainda na linhagem Δ 3848 COMP OPERON, já que pouquíssimos animais infectados com essa linhagem morreram (Fig. 15A). Como em ambas as linhagens a proteína CV_3848 está sendo expressa em níveis elevados (Fig. 7C), esses resultados negativos podem estar relacionados com efeito de dose ou algum problema nas construções. No caso da linhagem Δ 3848 COMP OPERON é possível que também a expressão da STK CV_3849 esteja bastante elevada, sugerindo que altos níveis da quinase contribuam para atenuação da virulência. O mutante duplo do operon CV_3849-3848 não mostrou atenuação de virulência (Fig. 15A), indicando que a ausência deste par STK/STP não altera virulência e que o fenótipo do mutante Δ 3848 deve ser devido a alvos que estão deixando de ser desfosforilados nesta linhagem.

Figura 15: Papel das STPs na virulência de *C. violaceum* in vivo. (A) Curvas de sobrevivência de fêmeas de camundongos BALB/c infectadas por via intraperitoneal com 10^6 UFC de cada linhagem bacteriana. ** indica a significância estatística pelo Teste t ($p < 0.01$). **(B)** Fígados de animais infectados com 10^6 UFC da linhagem selvagem e do mutante $\Delta 3848$ foram coletados 16h após a infecção, homogeneizados e as UFC foram contadas após diluição seriada. ** indica a significância estatística pelo Teste t ($p < 0.01$). **(C)** Fotos dos fígados de camundongos (setas) infectados com a linhagem selvagem de *C. violaceum* e o mutante $\Delta 3848$.

Para melhor investigar o padrão de infecção de $\Delta 3848$ foi feito um ensaio de recuperação da carga bacteriana do fígado de camundongos infectados, sendo observada uma significativa redução da carga bacteriana no fígado dos animais infectados com o mutante $\Delta 3848$ em relação à linhagem selvagem (Fig. 15B). Além disso, foi possível observar que os fígados dos animais infectados com o mutante $\Delta 3848$ pareciam mais saudáveis do que aqueles infectados com a linhagem selvagem (Fig. 15C). Esses resultados indicam um importante papel de CV_3848 na virulência de *C. violaceum*.

5. DISCUSSÃO

A partir da década de 90 tornou-se claro que a fosforilação de proteínas realizada por proteínas quinases e geralmente acoplada a reações de desfosforilação catalisadas por proteínas fosfatases em resíduos de serina e treonina não era exclusiva de eucariotos (SHI; POTTS; KENNELLY, 1998; GE; SHAN, 2011). Desde então, as serina/treonina quinases e suas fosfatases cognatas têm sido caracterizadas em várias bactérias, com predominância clara dos estudos com as quinases em detrimento das fosfatases (COZZONE, 2006; BURNSIDE; RAJAGOPAL, 2011; PEREIRA; GOSS; DWORKIN, 2011). Neste trabalho identificamos através de análise *in silico* quatro serina/treonina fosfatases (STPs) do tipo eucariótico no genoma de *C. violaceum* e por meio de abordagens genéticas e microbiológicas exploramos o efeito de cada uma delas na fisiologia e na virulência deste patógeno oportunista de humanos. Uma destas STPs, a CV_3848, foi caracterizada de modo mais detalhado como sendo necessária tanto para a virulência de *C. violaceum* quanto para processos ligados a divisão celular e manutenção do envelope celular.

Apesar de já terem sido descritas como essenciais para o crescimento bacteriano como em *S. agalactiae*, onde a ausência da STP ocasiona fase lag aumentada (RAJAGOPAL; CLANCY; RUBENS, 2003; RAJAGOPAL et al., 2005), nossos resultados indicam que os mutantes nulos para os genes CV_0881, CV_2644, CV_3505, CV_3848 e para o operon CV_3849-3848 não apresentaram deficiência em seu crescimento em meio rico ou em meio mínimo. Portanto, nenhuma das STPs de *C. violaceum* é essencial para seu crescimento nas condições testadas fora do hospedeiro. No entanto, observamos que exclusivamente o mutante $\Delta 0881$ apresentou viabilidade um pouco reduzida em nossos experimentos realizados com culturas de fase estacionária. Considerando que o gene CV_0881 parece formar um operon com os genes *rsbR*, *rsbS* e *rsbT*, os quais fazem parte de uma cascata de sinalização que ativa o fator sigma B de resposta geral a estresse em *B. subtilis* (YANG et al., 1996), pode-se especular que em *C. violaceum* CV_0881 possa fazer parte de uma via semelhante de controle do sigma S de fase estacionária análogo. É plausível considerar que quando submetidas a diferentes tipos de estresse como temperatura elevada, baixo pH e estresse oxidativo, o crescimento das demais

linhagens mutantes das STPs possa ser afetado, como observado para os mutantes $\Delta phpP$ de *S. pneumoniae*, que apresentaram dificuldade de crescimento sob essas condições (ULRYCH et al., 2016).

Sabidamente um fator de virulência crucial para bactérias é a formação de biofilme, que confere às bactérias vantagens como a capacidade de escape de predadores e do sistema imune do hospedeiro, além de conferir resistência a antibióticos, já que as bactérias que produzem biofilme são bem mais resistentes a antibióticos do que aquelas que somente possuem a forma planctônica. Um dado recente mostra que 80% das doenças infecciosas são causadas por bactérias que formam biofilme (NADELL et al., 2008; KALIA; WOOD; KUMAR, 2014). Nesse aspecto, os mutantes $\Delta 2644$ e $\Delta 3505$ apresentaram menor formação de biofilme quando comparado à linhagem selvagem de *C. violaceum*. As STPs CV_2644 e CV_3505 possuem, além do domínio de fosfatase (PP2C), um domínio de regulador de resposta (REC) e um domínio HATPase, no caso de CV_2644. Análise por alinhamento de sequência de aminoácidos revelou que CV_2644 é ortóloga (37% de identidade e 97% de cobertura) a uma proteína composta pelos domínios PP2C, REC e HTPase codificada pelo gene PA3346 de *P. aeruginosa* PAO1. A atividade de fosfatase de PA3346 é estimulada por fosforilação de seu domínio REC (HSU et al., 2008). O gene PA3346 é parte de um operon com PA3345 e PA3347, o qual codifica elementos de um complexo relê de fosforilação em um sistema de transdução de sinal que controla formação de biofilme e motilidade em PAO1 (HSU et al., 2008; BHUWAN et al., 2012). Assim, nossos dados sugerem que as STPs codificadas por CV_2644 e CV_3505 estão relacionadas a vias de produção de biofilme em *C. violaceum* e, no caso de CV_2644, pode ser por uma via semelhante àquela descrita para PA3346 de *P. aeruginosa*. Vale mencionar também que CV_3505 é parálogo de CV_2644 (42% de identidade e 76% de cobertura) em *C. violaceum*, sugerindo que ambas STPs poderiam atuar por mecanismos semelhantes no controle da formação de biofilme.

C. violaceum é um patógeno oportunista conhecido por sua grande resistência a uma gama de antibióticos, como ampicilina, penicilina, ceftazidima e cefotaxima, um fenômeno que dificulta o tratamento dos doentes acometidos por essa bactéria (FANTINATTI-GARBOGGINI et al., 2004; MADI et al., 2015; RICHARD et al., 2015). Tendo em vista esse cenário, as linhagens mutantes

para STPs foram submetidas a ensaio de difusão de disco (antibiograma) com antibióticos envolvidos na síntese da parede celular. Curiosamente, os mutantes $\Delta 2644$ e $\Delta 3848$ foram menos susceptíveis ao antibiótico ticarcilina do que a linhagem selvagem e os demais mutantes. Um resultado parecido foi visto na linhagem USA 300 de *S. aureus*, onde uma mutação por inserção no domínio de ligação a metal altamente conservado de uma fosfatase da família PP2C causou maior resistência ao antibiótico vancomicina em ensaio de mínima concentração inibitória (MIC) (PASSALACQUA et al., 2012). No nosso trabalho não testamos vancomicina pois trata-se de um antibiótico usado em bactérias Gram-positivas, porém, trata-se também de um antibiótico que atua na síntese da parede celular, assim como ticarcilina. Portanto, pode-se dizer que de alguma forma, CV_2644 e CV_3848 possuem um papel na resistência a antibióticos em *C. violaceum*.

Outros fenótipos relacionados às STPs são morfologia e divisão celular (BURNSIDE; RAJAGOPAL, 2011; PEREIRA; GOSS; DWORKIN, 2011; SAJID et al., 2015). Com o propósito de investigar a morfologia dos mutantes de STPs construídos nesse trabalho foram feitas microscopias eletrônicas de varredura (MEV) e transmissão (MET). Enquanto em linhagens depletadas para STPs em *M. tuberculosis* as células se mostraram mais alongadas do que na selvagem e formaram longas cadeias de células (SHARMA et al., 2016), em MEV das linhagens mutantes $\Delta 3505$ e $\Delta 3848$ foi possível observar células de menor tamanho em relação aos outros mutantes e a linhagem selvagem de *C. violaceum*. O nosso resultado encontrado é comparável ao observado em *S. pneumoniae*, onde as células depletadas para *phpP* apresentaram tamanho significativamente menor do que aquelas da linhagem selvagem (ULRYCH et al., 2016). Além disso, o trabalho de ULRYCH et al., 2016 constatou que esse fenótipo observado foi semelhante ao fenótipo encontrado quando a quinase *stkP* cognata de *phpP* foi superexpressa, um achado importante e curioso que poderia ser testado futuramente para este estudo no caso do operon CV_3848 e CV_3849, já que provavelmente a serina/treonina quinase codificada por CV_3849 é cognata à fosfatase codificada por CV_3848. Outra possibilidade passível de ser testada futuramente é a MEV para a linhagem mutante Duplo Δ , já que em *S. agalactiae* o par Stp1/Stk1 foi visto envolvido com a correta divisão celular e a linhagem mutante nula para os dois genes formam cadeias extensas de células alongadas (RAJAGOPAL; CLANCY; RUBENS, 2003). Portanto, esses

dados nos permitem sugerir que as STPs codificadas pelos genes CV_3505 e CV_3848 estão relacionadas à correta divisão celular em *C. violaceum*.

Ainda no que concerne o aspecto morfológico das células bacterianas de *C. violaceum*, a MET nos mostrou irregularidades no envelope celular da linhagem mutante $\Delta 3848$ e nos chamou atenção para seu conteúdo celular. Analisando as imagens, pôde-se perceber um aspecto ondulado e parede celular mais grossa na linhagem mutante do que na linhagem selvagem, o que sugere uma alteração na composição e/ou estrutura dos peptidoglicanos formadores da parede celular, fenômenos visto anteriormente em estudos com mutantes de STPs em *S. aureus* e *S. pyogenes* (BELTRAMINI; MUKHOPADHYAY; PANCHOLI, 2009; AGARWAL et al., 2011). O que nos leva a crer que CV_3848 está de alguma forma relacionada à síntese e/ou manutenção do envelope celular em *C. violaceum*, e ainda, pode-se hipotetizar que a maior resistência vista no mutante $\Delta 3848$ para o antibiótico ticarcilina que atua na síntese da parede possa estar relacionada a esse fenótipo irregular do envelope celular.

Ademais, a MET nos levou a investigar o material genético da linhagem $\Delta 3848$ já que o conteúdo intracelular dessa linhagem se mostrou diferente da linhagem selvagem nesse ensaio. Por microscopia multifóton e marcação por DAPI pôde-se constatar um provável problema na distribuição do material genético dessa linhagem, já que a marcação mostra irregularidades na sua distribuição quando comparada à linhagem selvagem, e a quantificação também mostrou que a fluorescência na linhagem mutante está em menor intensidade. Sendo assim, além de provavelmente estar relacionada ao envelope celular e correta divisão das células, CV_3848 pode também ter algum papel no que diz respeito a condensação do material genético, todos estes fenótipos inéditos em *C. violaceum*.

A *C. violaceum* é encontrada em solo e água em regiões tropicais e subtropicais. Embora os casos sejam raros, casualmente esta bactéria pode atuar como um patógeno oportunista de grande poder de virulência. Os doentes acometidos por essa bactéria apresentam desde lesões cutâneas localizadas até múltiplos abscessos em órgãos vitais e septicemia fatal (PARAJULI et al., 2016). Mutantes duplos para as STPs e suas STKs cognatas já foram reportados como estando envolvidas na virulência de bactérias como *S. agalactiae*, e também mutantes nulos somente para STP em *Streptococcus* do grupo B (RAJAGOPAL;

CLANCY; RUBENS, 2003; BURNSIDE et al., 2011). Por esse motivo avaliamos se as STPs de *C. violaceum* possuem papel em sua virulência. A maioria dos mutantes não apresentou fenótipo diminuído para virulência, incluindo o mutante duplo para STP/STK (CV_3848 e CV_3849). No entanto, o mutante $\Delta 3848$ apresentou um fenótipo de atenuação de virulência, pois os camundongos infectados com esta linhagem demoraram vários dias a mais para morrer. Fenótipo semelhante foi observado para os mutantes de STPs em *S. pyogenes*, *S. aureus*, *M. tuberculosis* e *Listeria monocytogenes* (ARCHAMBAUD et al., 2005; BURNSIDE et al., 2010; AGARWAL et al., 2011; SHARMA et al., 2016). Contagem da carga bacteriana no fígado dos animais, um órgão que *C. violaceum* infecta prioritariamente, confirmou que o mutante $\Delta 3848$ tem virulência atenuada. Com isso, foi possível concluir que CV_3848 possui um papel na virulência de *C. violaceum*. Apesar de as STPs já terem sido descritas envolvidas na virulência das bactérias citadas acima, este é o primeiro estudo que mostra o papel de uma STP na virulência de *C. violaceum* e um dos poucos a mostrar isto em bactérias Gram-negativas de modo geral.

Dados anteriores do nosso laboratório com um mutante $\Delta 3849$ (Mestrado Juliana Batista) e o fato de que o mutante duplo causou morte nos animais da mesma forma que a linhagem selvagem indicam que a ausência da possível quinase cognata codificada por CV_3849 não afeta a virulência. Então, podemos hipotetizar que a diminuição da virulência se deve a algum alvo fosforilado pela quinase CV_3849 e desfosforilado pela fosfatase CV_3848 (tal como um fator de virulência) e que o fenótipo observado no mutante $\Delta 3848$ se deve ao fato deste alvo estar mais fosforilado nesta linhagem, já que a fosfatase não está presente para desfosforilá-lo. Por isso, no mutante duplo para os dois genes não observamos diferença no padrão de virulência, pois não existe a fosforilação mediada por CV_3849. Também, a observação de que a linhagem complementada $\Delta 3848$ COMP OPERON (que contém os genes CV_3849 e CV_3848) mostrou-se ainda mais atenuada em virulência do que o mutante $\Delta 3848$, nos leva a acreditar nessa hipótese, pois pensamos que apesar de CV_3848 estar agora presente, nessa complementação a quinase CV_3849 provavelmente está sendo mais expressa do que na linhagem selvagem. A realização de ensaios de *western blot* com anticorpo anti-CV_3849 poderá nos ajudar a melhor esclarecer os níveis de expressão dessa proteína nessa

linhagem complementada. Além disso, uma análise histológica dos fígados dos animais infectados nos ajudará a elucidar o papel de CV_3848 na patogênese de *C. violaceum*, como também ensaios em modelos celulares como linhagens imortalizadas de hepatócitos e macrófagos a fim de avaliar invasão e crescimento nessas células.

O ensaio de fosforilação/desfosforilação nos permitiu verificar os níveis de fosforilação um pouco aumentados em algumas possíveis proteínas alvos de CV_3848. Uma análise feita por fosfoproteoma e espectrometria de massas das bandas mais fosforiladas na linhagem Δ 3848 poderá nos indicar os verdadeiros alvos dessa proteína. Ainda, um ensaio de fosforilação com as proteínas CV_3848 e CV_3849 purificadas poderá nos dizer se CV_3848 realmente desfosforila os alvos fosforilados por CV_3849, atuam assim como um par cognato STK/STP.

Os próximos passos desse trabalho incluem a realização de ensaios de microarranjo de DNA comparando o transcriptoma de Δ 3848 com o transcriptoma da linhagem selvagem para entender as redes de regulação controladas por CV_3848. Além disso, a construção de uma linhagem que superexpressa a STK CV_3849 nos ajudará a entender os fenótipos encontrados para virulência e também será importante para compreensão deste operon STP/STK. Ainda, buscaremos avaliar o comportamento do mutante Δ 3848 frente a modelos celulares de infecção.

6. CONCLUSÃO

Nesse trabalho identificamos quatro serina/treonina fosfatases (STPs) do tipo eucariótico no genoma de *C. violaceum* e investigamos o papel de todas elas em vários aspectos da fisiologia e patogenicidade desta bactéria. Nossos resultados mais expressivos apontam para um papel importante da STP CV_3848 na homeostase do envelope celular e na virulência de *C. violaceum*. Seguem abaixo as principais conclusões deste trabalho:

- Nenhuma das quatro STPs é essencial para sobrevivência de *C. violaceum* em condições favoráveis de cultivo *in vitro*, pois mutantes nulos foram facilmente obtidos para todas elas e nenhum dos mutantes mostrou deficiência no crescimento;
- As STPs CV_CV2644 e CV_3505 possuem domínio adicional de regulador de resposta e parecem estar envolvidas na regulação de formação de biofilme;
- As STPs CV_0881, CV_CV2644 e CV_3505 não parecem estar envolvidas no controle da virulência de *C. violaceum*;
- A STP CV_3848 parece estar envolvida com divisão celular, síntese e/ou manutenção do envelope celular e condensação do material genético, uma vez que o mutante Δ 3848 mostrou-se mais resistente ao antibiótico ticarcilina que atua na síntese da parede celular, apresentou células com tamanho reduzido e com defeitos morfológicos no envelope e mostrou irregularidades na distribuição do seu DNA;
- A STP CV_3848 é um importante determinante de patogenicidade de *C. violaceum*, pois o mutante Δ 3848 mostrou atenuação de virulência em camundongos e reduzida capacidade de disseminação e/ou manutenção no fígado destes animais.

7. BIBLIOGRAFIA

AGARWAL, S.; AGARWAL, S.; JIN, H.; PANCHOLI, P.; PANCHOLI, V. Serine/threonine phosphatase (SP-STP), secreted from streptococcus pyogenes, is a pro-apoptotic protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 12, p. 9147–9167, 2012.

AGARWAL, S.; AGARWAL, S.; PANCHOLI, P.; PANCHOLI, V. Role of serine/threonine phosphatase (SP-STP) in Streptococcus pyogenes physiology and virulence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 48, p. 41368–41380, 2011.

ALVES DE BRITO, C. F.; CARVALHO, C. M. B.; SANTOS, F. R.; GAZZINELLI, R. T.; OLIVEIRA, S. C.; AZEVEDO, V.; TEIXEIRA, S. M. R. *Chromobacterium violaceum* genome: Molecular mechanisms associated with pathogenicity. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 1, p. 148–161, 2004.

ARCHAMBAUD, C.; GOUIN, E.; PIZARRO-CERDA, J.; COSSART, P.; DUSSURGET, O. Translation elongation factor EF-Tu is a target for Stp, a serine-threonine phosphatase involved in virulence of *Listeria monocytogenes*. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 2, p. 383–396, 2005.

AUSUBEL F. M., et al. Short Current Protocols in Molecular Biology. **Greene Publishing Associates**, 2001.

BAKAL, C. J.; DAVIES, J. E. No longer an exclusive club: Eukaryotic signalling domains in bacteria. **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 1, p. 32–38, 2000.

BARRETT, J. F.; HOCH, J. A. Two-component signal transduction as a target for microbial anti-infective therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 7, p. 1529–1536, 1998.

BELTRAMINI, A. M.; MUKHOPADHYAY, C. D.; PANCHOLI, V. Modulation of cell wall structure and antimicrobial susceptibility by a *Staphylococcus aureus* eukaryote-like serine/threonine kinase and phosphatase. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 4, p. 1406–1416, 2009.

BHADURI, A.; SOWDHAMINI, R. Genome-wide survey of prokaryotic O-protein phosphatases. **Journal of Molecular Biology**, v. 352, n. 3, p. 736–752, 2005.

BHUWAN, M.; LEE, H.J.; PENG, H.L.; CHANG, H.Y. Histidine-containing phosphotransfer protein-B (HptB) regulates swarming motility through partner-switching system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 strain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 3, p. 1903-1914, 2012.

BLISKA, J. B.; GUAN, K. L.; DIXON, J. E.; FALKOW, S. Tyrosine phosphate hydrolysis of host proteins by an essential *Yersinia* virulence determinant. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, n. 4, p. 1187–91, 1991.

BOEKHORST, J.; VAN BREUKELEN, B.; HECK, A. J.; SNEL, B. Comparative phosphoproteomics reveals evolutionary and functional conservation of phosphorylation across eukaryotes. **Genome Biology**, v. 9, n. 10, p. R144, 2008.

BRAZILIAN NATIONAL GENOME PROJECT CONSORTIUM. The complete genome sequence of *Chromobacterium violaceum* reveals remarkable and exploitable bacterial adaptability. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 20, p. 11660–5, 2003.

BRETL, D. J.; DEMETRIADOU, C.; ZAHRT, T. C. Adaptation to Environmental Stimuli within the Host: Two-Component Signal Transduction Systems of *Mycobacterium tuberculosis*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 4, p. 566–582, 2011.

BURNSIDE, K.; LEMBO, A.; DE LOS REYES, M.; ILIUK, A.; BINHTRAN, N. T.; CONNELLY, J. E.; LIN, W. J.; SCHMIDT, B. Z.; RICHARDSON, A. R.; FANG, F. C.; TAO, W. A.; RAJAGOPAL, L. Regulation of hemolysin expression and virulence of *Staphylococcus aureus* by a serine/threonine kinase and phosphatase. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, 2010.

BURNSIDE, K.; LEMBO, A.; HARRELL, M. I.; GURNEY, M.; XUE, L.; BINHTRAN, N. T.; CONNELLY, J. E.; JEWELL, K. A.; SCHMIDT, B. Z.; DE LOS REYES, M.; TAO, W. A.; DORAN, K. S.; RAJAGOPAL, L. Serine/threonine phosphatase Stp1 mediates post-transcriptional regulation of hemolysin, autolysis, and virulence of Group B *Streptococcus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 51, p. 44197–44210, 2011.

BURNSIDE, K.; RAJAGOPAL, L. Aspects of eukaryotic-like signaling in Gram-

positive cocci: a focus on virulence. **Future microbiology**, v. 6, n. 7, p. 747–61, 2011.

BURNSIDE, K.; RAJAGOPAL, L. Regulation of prokaryotic gene expression by eukaryotic-like enzymes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 15, n. 2, p. 125–131, 2012.

CAMERON, D. R.; WARD, D. V.; KOSTOULIAS, X.; HOWDEN, B. P.; MOELLERING, R. C.; ELIOPOULOS, G. M.; PELEG, A. Y. Serine/threonine phosphatase *stp1* contributes to reduced susceptibility to vancomycin and virulence in staphylococcus aureus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 205, n. 11, p. 1677–1687, 2012.

CANOVA, M. J.; MOLLE, V. Bacterial serine/threonine protein kinases in host-pathogen interactions. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 14, p. 9473–9479, 2014.

CAPRA, E. J.; LAUB, M. T. Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. **Annual Review of Microbiology**, v. 66, n. 1, p. 325–347, 2012.

CAZOTO, L. L.; MARTINS, D.; RIBEIRO, M. G.; DURÁN, N.; NAKAZATO, G. Antibacterial activity of violacein against Staphylococcus aureus isolated from bovine mastitis. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, n. 5, p. 395–397, 2011.

CHATTOPADHYAY, A.; KUMAR, V.; BHAT, N.; RAO, P. L. N. G. Chromobacterium violaceum infection: A rare but frequently fatal disease. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 37, n. 1, p. 108–110, 2002.

CHOI, H. W.; BROOKING-DIXON, R.; NEUPANE, S.; LEE, C. J.; MIAO, E. A.; STAATS, H. F.; ABRAHAM, S. N. Salmonella Typhimurium Impedes Innate Immunity with a Mast-Cell-Suppressing Protein Tyrosine Phosphatase, SptP. **Immunity**, v. 39, n. 6, p. 1108–1120, 2013.

CHOPRA, P.; SINGH, B.; SINGH, R.; VOHRA, R.; KOUL, A.; MEENA, L. S.; KODURI, H.; GHILDIYAL, M.; DEOL, P.; DAS, T. K.; TYAGI, A. K.; SINGH, Y. Phosphoprotein phosphatase of Mycobacterium tuberculosis dephosphorylates serine-threonine kinases PknA and PknB. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 311, n. 1, p. 112–120, 2003.

COZZONE, A. J. Role of protein phosphorylation on serine/threonine and tyrosine in the virulence of bacterial pathogens. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 9, n. 3–4, p. 198–213, 2006.

DA SILVA NETO J. F., NEGRETTO C. C., NETTO L. E. S. Analysis of the organic hydroperoxide response of *Chromobacterium violaceum* reveals that OhrR is a cys-based redox sensor regulated by thioredoxin. **Plos One** v. 7; 2012.

DURÁN, N.; JUSTO, G.Z.; FERREIRA, C.V.; MELO, P.S.; CORDI, L.; MARTINS, D. Violacein: properties and biological activities. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 48, p. 127-133, 2007.

DURÁN, N.; MENCK, C. F. M. *Chromobacterium violaceum*: A Review of Pharmacological and Industrial Perspectives. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 201–222, 2001. **Current Opinion in Microbiology**, v. 24, p. 47–52, 2015.

FANTINATTI-GARBOGGINI, F.; ALMEIDA, R. de; PORTILLO, V. do A.; BARBOSA, T. A. P.; TREVILATO, P. B.; NETO, C. E. R.; COELHO, R. D.; SILVA, D. W.; BARTOLETI, L. A.; HANNA, E. S.; BROCCHI, M.; MANFIO, G. P. Drug resistance in *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 3, n. 1, p. 134–47, 2004.

GE, R.; SHAN, W. Bacterial Phosphoproteomic Analysis Reveals the Correlation Between Protein Phosphorylation and Bacterial Pathogenicity. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 9, n. 4–5, p. 119–127, 2011.

GNAD, F.; FORNER, F.; ZIELINSKA, D. F.; BIRNEY, E.; GUNAWARDENA, J.; MIKI, T. et al. *Chromobacterium* pathogenicity island 1 type III secretion system is a major virulence determinant for *Chromobacterium violaceum*-induced cell death in hepatocytes. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 855–872, 2010.

GOLDOVÁ, J.; ULRYCH, A.; HERCÍK, K.; BRANNY, P. A eukaryotic-type signalling system of *Pseudomonas aeruginosa* contributes to oxidative stress resistance, intracellular survival and virulence. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 437, 2011.

GRISHIN, A. M.; BEYRAKHOVA, K. A.; CYGLER, M. Structural insight into effector proteins of Gram-negative bacterial pathogens that modulate the

phosphoproteome of their host. **Protein Science**, v. 24, n. 5, p. 604–620, 2015.

HASHIMI, S. M.; XU, T.; WEI, M. Q. Violacein anticancer activity is enhanced under hypoxia. **Oncology Reports**, v. 33, n. 4, p. 1731–1736, 2015.

HSU, J. L.; CHEN, H. C.; PENG, H. L.; CHANG, H. Y. Characterization of the histidine-containing phosphotransfer protein B-mediated multistep phosphorelay system in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 283, n. 15, p. 9933–9944, 2008.

HUNGRIA, M.; NICOLÁS, M. F.; GUIMARÃES, C. T.; JARDIM, S. N.; GOMES, E. A.; DE VASCONCELOS, A. T. R. Tolerance to stress and environmental adaptability of *Chromobacterium violaceum*. **Genetics and Molecular Research**, v. 3, n. 1, p. 102–116, 2004.

JIN, H.; PANCHOLI, V. Identification and biochemical characterization of a eukaryotic-type serine/threonine kinase and its cognate phosphatase in *Streptococcus pyogenes*: Their biological functions and substrate identification. **Journal of Molecular Biology**, v. 357, n. 5, p. 1351–1372, 2006.

KALIA, V. C.; WOOD, T. K.; KUMAR, P. Evolution of Resistance to Quorum-Sensing Inhibitors. **Microbial Ecology**, v. 68, n. 1, p. 13–23, 2014.

KARTHIK, R.; PANCHARATNAM, P.; BALAJI, V. Fatal *Chromobacterium violaceum* septicemia in a South Indian adult. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 6, n. 10, p. 751–755, 2012.

KENNELLY, P. J. Protein phosphatases - A phylogenetic perspective. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 8, p. 2291–2312, 2001.

KENNELLY, P. J. Protein kinases and protein phosphatases in prokaryotes: A genomic perspective. **FEMS Microbiology Letters**, v. 206, n. 1, p. 1–8, 2002.

KOTHARI, V.; SHARMA, S.; PADIA, D. Recent research advances on *Chromobacterium violaceum*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 8, p. 744–752, 2017.

KYRIAKIS, J. M. In the beginning, there was protein phosphorylation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 14, p. 9460–9462, 2014.

LEE, J.; KIM, J. S.; NAHM, C. H.; CHOI, J. W.; KIM, J.; PAI, S. H.; MOON, K. H.; LEE, K.; CHONG, Y. Two cases of *Chromobacterium violaceum* infection after injury in a subtropical region. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 2068–2070, 1999.

LIMA-BITTENCOURT, C. I.; ASTOLFI-FILHO, S.; CHARTONE-SOUZA, E.; SANTOS, F. R.; NASCIMENTO, A. M. Analysis of *Chromobacterium* sp. natural isolates from different Brazilian ecosystems. **BMC Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 58, 2007.

LISTER, J. L.; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, n. December, p. 1–9, 2014.

MANN, M. Evolutionary Constraints of Phosphorylation in Eukaryotes, Prokaryotes, and Mitochondria. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 9, n. 12, p. 2642–2653, 2010.

MACEK, B.; MIJAKOVIC, I.; OLSEN, J. V.; GNAD, F.; KUMAR, C.; JENSEN, P. R.; MANN, M. The Serine/Threonine/Tyrosine Phosphoproteome of the Model Bacterium *Bacillus subtilis*. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 6, n. 4, p. 697–707, 2007.

MACHO, A. P.; SCHWESSINGER, B.; NTOUKAKIS, V.; BRUTUS, A.; SEGONZAC, C.; ROY, S.; KADOTA, Y.; OH, M.-H.; SKLENAR, J.; DERBYSHIRE, P.; LOZANO-DURAN, R.; MALINOVSKY, F. G.; MONAGHAN, J.; MENKE, F. L.; HUBER, S. C.; HE, S. Y.; ZIPFEL, C. A Bacterial Tyrosine Phosphatase Inhibits Plant Pattern Recognition Receptor Activation. **Science**, v. 343, n. 6178, p. 1509–1512, 2014.

MADI, D. R.; VIDYALAKSHMI, K.; RAMAPURAM, J.; SHETTY, A. K. Case report: Successful treatment of *chromobacterium violaceum* sepsis in a south indian adult. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 93, n. 5, p. 1066–1067, 2015.

MARTINEZ, P.; MATTAR, S. Fatal septicemia caused by *Chromobacterium violaceum* in a child from Colombia. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 49, n. 6, p. 391–393, 2007.

MCCLEAN, K.H.; WINSON, M.K.; FISH, L.; TAYLOR, A.; CHHABRA, S.R.; CAMARA, M.; DAYKIN, M.; LAMB, J.H.; SWIFT, S.; BYCROFT, B.W.; STEWART, G.S.A.B.; WILLIAMS, P. Quorum-sensing and *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. **Microbiology**, v. 143, p. 3703-3711, 1997.

MIKI, T.; AKIBA, K.; IGUCHI, M.; DANBARA, H.; OKADA, N. The *Chromobacterium violaceum* type III effector CopE, a guanine nucleotide exchange factor for Rac1 and Cdc42, is involved in bacterial invasion of epithelial cells and pathogenesis. **Molecular Microbiology**, v. 80, n. 5, p. 1186–1203, 2011.

MIKI, T.; IGUCHI, M.; AKIBA, K.; HOSONO, M.; SOBUE, T.; DANBARA, H.; OKADA, N. *Chromobacterium* pathogenicity island 1 type III secretion system is a major virulence determinant for *Chromobacterium violaceum*-induced cell death in hepatocytes. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 4, p. 855–872, 2010.

NADELL, C. D.; XAVIER, J. B.; LEVIN, S. A.; FOSTER, K. R. The evolution of quorum sensing in bacterial biofilms. **PLoS Biology**, v. 6, n. 1, p. 0171–0179, 2008.

PARAJULI, N. P.; BHETWAL, A.; GHIMIRE, S.; MAHARJAN, A.; SHAKYA, S.; SATYAL, D.; PANDIT, R.; KHANAL, P. R. Bacteremia caused by a rare pathogen – *Chromobacterium violaceum*: A case report from Nepal. **International Journal of General Medicine**, v. 9, p. 441–446, 2016.

PASSALACQUA, K. D.; SATOLA, S. W.; CRISPELL, E. K.; READ, T. D. A mutation in the PP2C phosphatase gene in a *Staphylococcus aureus* USA300 clinical isolate with reduced susceptibility to vancomycin and daptomycin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n.10, p. 5212–5223, 2010.

PAWSON, T.; NASH, P. Protein – protein interactions define specificity in signal transduction Protein – protein interactions define specificity in signal transduction. **Genes and Development**, n. 416, p. 1027–1047, 2000.

PEREIRA, S. F. F.; GOSS, L.; DWORKIN, J. Eukaryote-Like Serine/Threonine Kinases and Phosphatases in Bacteria. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 75, n. 1, p. 192–212, 2011.

RAJAGOPAL, L.; CLANCY, A.; RUBENS, C. E. A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation, and virulence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 16, p. 14429–14441, 2003.

RAJAGOPAL, L.; VO, A.; SILVESTRONI, A.; RUBENS, C. E. Regulation of purine biosynthesis by a eukaryotic-type kinase in *Streptococcus agalactiae*. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 1329–1346, 2005.

RICHARD, K. R.; LOVVORN, J. J.; OLIVER, S. E.; ROSS, S. A.; BENNER, K. W.; KONG, M. Y. F. *Chromobacterium Violaceum* sepsis: Rethinking conventional therapy to improve outcome. **American Journal of Case Reports**, v. 16, p. 740–744, 2015.

ROBERTS, R. C.; TOOCHINDA, C.; AVEDISSIAN, M.; BALDINI, R. L.; GOMES, S. L.; SHAPIRO, L. Identification of a *Caulobacter crescentus* operon encoding *hrcA*, involved in negatively regulating heat-inducible transcription, and the chaperone gene *grpE*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 7, p. 1829–1841, 1996.

SAJID, A.; ARORA, G.; SINGHAL, A.; KALIA, V. C.; SINGH, Y. Protein Phosphatases of Pathogenic Bacteria: Role in Physiology and Virulence. **Annual Review of Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 527–547, 2015.

SASIDHARAN, A.; SASIDHARAN, N. K.; AMMA, D. B. N. S.; VASU, R. K.; NATARAJA, A. V.; BHASKARAN, K. Antifungal activity of violacein purified from a novel strain of *Chromobacterium* sp. NIIST (MTCC 5522). **Journal of Microbiology**, v. 53, n. 10, p. 694–701, 2015.

SCHERR, T. D.; HEIM, C. E.; MORRISON, J. M.; KIELIAN, T. Hiding in plain sight: Interplay between staphylococcal biofilms and host immunity. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. FEB, p. 1–7, 2014.

SHARMA, A. K.; ARORA, D.; SINGH, L. K.; GANGWAL, A.; SAJID, A.; MOLLE, V.; SINGH, Y.; NANDICOORI, V. K. Serine/threonine protein phosphatase *pstP* of *Mycobacterium tuberculosis* is necessary for accurate cell division and survival of pathogen. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 46, p. 24215–24230,

2016.

SHI, L.; POTTS, M.; KENNELLY, P. J. The serine , threonine , and/or tyrosine-specific protein kinases and protein phosphatases of prokaryotic organisms: a family portrait. **FEMS Microbiology Reviews** v. 22, 1998.

SHI, Y. Serine/Threonine Phosphatases: Mechanism through Structure. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 468–484, 2009.

SNEATH, P.H.A et al. Fatal infection by *Chromobacterium violaceum*. **The Lancet**, v. 262, p. 276-277, 1953.

STANDISH, A.J.; MORONA, R. The role of bacterial protein tyrosine phosphatases in the regulation of the biosynthesis of secreted polysaccharides. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 20, p. 2274-2289, 2014.

SUN, F. et al. Protein cysteine phosphorylation of SarA/MgrA family transcriptional regulators mediates bacterial virulence and antibiotic resistance. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, [s.l.], v. 109, n. 38, p.15461-15466, 2012.

UEDA, A.; WOOD, T. K. Connecting quorum sensing, c-di-GMP, pel polysaccharide, and biofilm formation in *Pseudomonas aeruginosa* through tyrosine phosphatase TpbA (PA3885). **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 6, p. 1–15, 2009.

ULRYCH, A.; HOLEČKOVÁ, N.; GOLDOVÁ, J.; DOUBRAVOVÁ, L.; BENADA, O.; KOFROŇOVÁ, O.; HALADA, P.; BRANNY, P. Characterization of pneumococcal Ser/Thr protein phosphatase phpP mutant and identification of a novel PhpP substrate, putative RNA binding protein Jag. **BMC Microbiology**, v. 16, n. 1, p. 247, 2016.

WINDER, M. M.; INGRAM, D.; VAUGHAN, L.; WARNER, H. *Chromobacterium violaceum* Hepatic Abscesses in a Previously Healthy Child. **Infectious Diseases in Clinical Practice**, v. 20, n. 3, p. 219–220, 2012.

WRIGHT, D. P.; ULIJASZ, A. T. Regulation of transcription by eukaryotic-like serine-threonine kinases and phosphatases in Gram-positive bacterial pathogens. **Virulence**, v. 5, n. 8, p. 863–85, 2014.

YANG, C. H.; LI, Y. H. Chromobacterium violaceum infection: A clinical review of an important but neglected infection. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 74, n. 10, p. 435–441, 2011.

YANG, X.; KANG, C.M.; BRODY, M.S.; PRICE, C.W. Opposing pairs of serine protein kinases and phosphatases transmit signals of environmental stress to activate a bacterial transcription factor. **Genes and Development**, v. 10, n. 18, p. 2265-2275, 1996.