

Nicole Gonçalves Picinin

Supressão da mutação $\Delta phoU$ em *Pseudomonas aeruginosa*

São Paulo

2024

Nicole Gonçalves Picinin

Supressão da mutação $\Delta phoU$ em *Pseudomonas aeruginosa*

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de mestre em microbiologia
Área de concentração: Microbiologia
Orientador: Beny Spira

São Paulo
2024

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Gonçalves Picinin, Nicole

Supressão da mutação Δ phoU em *Pseudomonas aeruginosa* / Nicole
Gonçalves Picinin; orientador Beny Spira. -- São Paulo, 2024.

69 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de
Ciências Biomédicas.

1. Regulon Pho. 2. Fosfato. 3. Polifosfato. 4. Mutação.
5. Supressão. I. Spira, Beny, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Nicole Gonçalves Picinin

Título da Dissertação/Tese: Supressão da mutação $\Delta phoU$ em *Pseudomonas aeruginosa*

Orientador: Beny Spira

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone(11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

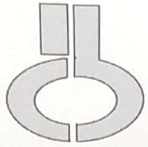
CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB nº **1134/2020** referente ao projeto intitulado: "**Supressão da mutação Δ phoU em Pseudomonas aeruginosa**, sob a responsabilidade do(a) aluno(a) **Nicole Gonçalves Picinin**, e orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) **Beny Spira**, do Departamento de Microbiologia, foi analisado pela **CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais e pelo **CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº 466/2012.

São Paulo, 05 de outubro de 2020.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora CEPSH ICB/USP



Certificado



Certificamos que **Nicole Gonçalves Picinin** participou do Treinamento em Biossegurança realizado no Departamento de Microbiologia/ICB-USP, no dia 10 de junho de 2015, com carga horária total de 8 horas.

Gabriel Padilla

Prof. Dr. Gabriel Padilla
Responsável pelo Treinamento

Tatiana Alves dos Reis

Tatiana Alves dos Reis
Técnica Responsável pelo Treinamento



Declaro, para os devidos fins, que

Nicole Gonçalves Picinin

concluiu o Curso "Armazenamento, Manuseio e Descarte de Produtos Químicos",
realizado no Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

São Paulo, 5 de setembro de 2022
(Declaração válida por 5 anos)

Profa. Dra. Katiucia Batista da Silva Paiva
Presidente da Comissão de Segurança Química

Profa. Dra. Patricia Gama
Diretora do ICB

Nicole Gonçalves Picinin

Supressão da mutação $\Delta phoU$ em *Pseudomonas aeruginosa*

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de mestre em microbiologia
Área de concentração: Microbiologia
Orientador: Beny Spira

Orientador

Professora Dra.
Convidado

Professor Dr.
Convidado

Dra.
Convidado

São Paulo
2024

Este trabalho é dedicado ao José da Costa e Sousa
e ao João de Oliveira dos Passos Silva e à minha família
pela rede de apoio oferecida nos últimos anos.

Agradecimentos

Em especial um agradecimento ao orientador Beny Spira por ser fundamental na minha formação acadêmica, desde a Iniciação Científica até agora. E também por ter aberto a porta do seu laboratório.

Gostaria de agradecer ao José da Costa e Sousa e ao João de Oliveira dos Passos Silva por toda a diretriz ofertada e sempre mostrar que posso ser capaz de tudo que almejo. Com certeza este trabalho não seria possível sem toda a assistência dada.

À minha mãe e irmã, Fernanda dos Santos Gonçalves e Stephanie Gonçalves Picinin, por me apoiar e acreditar em mim, por nunca ter me deixado desistir e também por toda a paciência (muitas vezes necessárias) ao longo desde trabalho. Ao meu padrinho Nilo Sérgio Casaes por ser a minha figura paterna desde os 06 anos de idade e também por sempre me apoiar e me oferecer uma palavra quando preciso. E também pela amizade do José Guilherme Casaes desde sempre e por ser um homem carinhoso e que com certeza posso contar para sempre.

Aos meus amigos do laboratório (Cláudia, Felipe, Gabriella, Taissa, Marina e Ynés) que tornaram o dia a dia mais leve e também pela ajuda em experimentos e afins. E um agradecimento especial ao Luiz Gustavo de Almeida que mesmo não estando no laboratório, me ajudou prontamente sempre que enviei e-mails.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior -Brasil (CAPES) -Código de Financiamento 001.

*"It is not the strongest of the species that survives, nor the most intelligent,
but rather the one most adaptable to change."
(Charles Darwin)*

Resumo

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* pode ser encontrada em diversos ambientes, tais como em corpos d'água, solo, animais e plantas. Para sobreviver e procriar em ambientes tão diversos, a bactéria possui vários sistemas gênicos que irão auxiliá-la em sua adaptação. A baixa disponibilidade de fosfato no ambiente gera a ativação dos genes pertencentes ao regulon PHO, tais como *phoA*, que codifica uma fosfatase alcalina periplasmática e o operon *pst* que codifica um sistema de captação de Pi. Cinco genes compõem o operon *pst* - *pstA*, *pstB*, *pstC*, *pstS* e *phoU*. O último gene não participa do transporte de fosfato mas atua como repressor do regulon PHO em ambientes com excesso de fosfato. O genes de PHO são regulados pelo sistema de dois componentes PhoB/PhoR, onde a proteína PhoB atua como um regulador de resposta e PhoR atua como uma histidina quinase. O nocaute do gene *phoU* resulta na constitutividade do regulon PHO, e conseqüentemente aumenta a captação de Pi via Pst. O excesso de fosfato intracelular é armazenado na forma de grânulos de polifosfato, porém o excedente de fosfato no interior da célula é tóxico gerando uma pressão seletiva para aquisição de mutações supressoras, que ocorrem geralmente em *phoB* ou em um dos outros 4 genes do operon *pst*. Neste trabalho, foram isolados e caracterizados dezenas de mutantes supressores derivados da cepa $\Delta phoU$ de *P. aeruginosa*. Estes mutantes foram submetidos a diversos ensaios fenotípicos, tais como, a captação de Pi do meio, o nível de acúmulo do polifosfato, e a atividade quantitativa da enzima fosfatase alcalina, entre outros. Os resultados mostram que as mutações adquiridas pelos mutantes supressores designados como NAP revertem todos os fenótipos apresentados pelo mutante $\Delta phoU$ e os tornam similares à cepa selvagem PA14, enquanto que as mutações apresentadas pelos supressores LAP revertem parte dos efeitos nocivos causados pelo excesso de Pi no interior da célula. Neste trabalho, não foi observado nenhum mutante supressor do tipo HAP, visto que todos os possíveis candidatos se assemelham, fenotipicamente, à cepa ancestral $\Delta phoU$ e nenhuma mutação relevante foi encontrada nestes isolados.

Palavras-chaves: Regulon PHO, fosfato, polifosfato, mutação, supressão, *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract

The bacterium *Pseudomonas aeruginosa* can be found in various environments, such as water bodies, soil and animals. To adapt to these environments the bacterium carries several genes and operons responsible for the adaptation to the different conditions. The low availability of phosphate in the environment generates the activation of genes belonging to PHO regulon, such as *phoA*, which encodes a periplasmic alkaline phosphatase and *pst* operon, that encodes a Pi uptake system. Five genes make up the operon *pst* - *pstA*, *pstB*, *pstC*, *pstS* and *phoU*. The last gene does not participate in phosphate transport but acts as a negative regulator of PHO regulon. The PHO regulon is regulated by the PhoB/PhoR two-component system, where the PhoB protein acts as a response regulator and PhoR acts as a histidine kinase sensor. Mutations in the *phoU* gene result in the constitutive expression of the PHO regulon, and consequently increase the rate of Pi uptake via Pst. The excess of intracellular phosphate is stored in the form of polyP granules, but Pi-surplus is toxic generating a selective pressure for the acquisition of suppressive mutations, which usually occur in PhoB or in one of the other genes of the *pst* operon. In *E. coli* was observed three classes of suppressor mutants derived from $\Delta phoU$, which were classified according to their morphology - NAP (No AP phenotype), LAP (Low AP phenotype) and HAP (High AP phenotype). In the present study, suppressor mutants derived from the strain $\Delta phoU$ of *P. aeruginosa* were isolated and characterized. Several phenotypic assays were performed on the compensatory mutants, such as the rate of Pi removal from the medium, accumulation of polyphosphate, alkaline phosphatase activity, among others. The results show that the mutations acquired by the NAP mutants reversed all $\Delta phoU$ phenotypes. The LAP suppressors were able to reverse the harmful effects caused by excess Pi, but were still able to take up more phosphate and accumulate high amounts of polyphosphate. The last class of suppressor mutants - HAP- behaves very similar to the ancestral strain $\Delta phoU$.

Keywords:PHO regulon, phosphate, polyP, mutation, suppression, *Pseudomonas aeruginosa*.

Sumário

	Sumário	13
	Lista de tabelas	15
	Lista de ilustrações	16
1	Introdução	17
1.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17
1.1.1	Motilidades de <i>P. aeruginosa</i>	17
1.1.2	Metabólitos secundários Pioverdina e Piocianina	18
1.2	Regulon PHO	18
1.3	Operon <i>pst</i>	19
1.4	Polifosfato	20
1.5	Fosfatase alcalina	21
1.6	O regulon PHO de <i>P. aeruginosa</i>	22
1.7	O regulon PHO e a virulência bacteriana	23
1.8	Mutante $\Delta phoU$	24
2	Materiais e métodos	26
2.1	Bactérias utilizadas	26
2.2	Meios de cultura	27
2.3	Isolamento de mutantes supressores derivados de PA14 $\Delta phoU$	29
2.4	Rendimento da cultura dos mutantes supressores	29
2.5	Determinação da concentração de Pi residual	30
2.6	Extração de poliP	30
2.7	Ensaio de FA	31
2.8	Sequenciamento de <i>phoB</i> e <i>pstS</i>	32
2.9	Avaliação da virulência de <i>P. aeruginosa</i>	32
2.10	Motilidade do tipo Swarming	33
2.11	Mensuração de piocianina e pioverdina	33
3	Resultados	34
3.1	Mutantes supressores isolados	34
3.2	Rendimento dos mutantes supressores	35
3.3	Capacidade de remoção de Pi do meio	38
3.4	Acúmulo de poliP nos mutantes supressores	41
3.5	Nível de FA dos mutantes supressores	44
3.5.1	Comparação da atividade da FA a partir de culturas líquidas e de colônias	48
3.6	Identificação das mutações supressoras	50
3.7	Efeito das mutações compensatórias sobre a virulência de <i>P. aeruginosa</i>	52

3.8	Efeito das mutações supressoras sobre a motilidade <i>Swarming</i>	53
3.9	Efeito das mutações supressoras de $\Delta phoU$ sobre a produção de pigmentos	55
4	Discussão	57
	REFERÊNCIAS	62
5	Anexo	66
5.1	Anexo A- Região promotora e ORF do gene <i>phoB</i> da cepa PA14	66
5.2	Anexo B- Região promotora e ORF do gene <i>pstS</i> da cepa PA14	67

Lista de tabelas

Tabela 1 – Bactérias utilizadas	26
Tabela 2 – Comparação entre os métodos utilizados para a detecção da atividade de FA	44
Tabela 3 – Mutações supressoras em <i>phoB</i>	50
Tabela 4 – Mutações supressoras em <i>pstS</i>	51

Lista de ilustrações

Figura 1 – Regulon PHO	20
Figura 2 – Polifosfato	21
Figura 3 – Hidrólise do substrato p-nitrofenilfosfato em p-nitrofenol e Pi	22
Figura 4 – Diferença na sequência genética do operon <i>pst</i>	23
Figura 5 – Isolamento de supressores	29
Figura 6 – Morfologia das colônias dos mutantes supressores	35
Figura 7 – Rendimento dos mutantes supressores NAP	36
Figura 8 – Rendimento dos mutantes supressores LAP	37
Figura 9 – Rendimento dos mutantes supressores HAP	38
Figura 10 – Porcentagem de Pi removido do meio HGP6MgFe pelos mutantes NAP	39
Figura 11 – Taxa de Pi removido do meio HGP6MgFe pelos mutantes LAP	40
Figura 12 – Taxa de Pi removido do meio HGP6MgFe pelos mutantes HAP	41
Figura 13 – Acúmulo de poliP pelos mutantes supressores NAP	42
Figura 14 – Acúmulo de poliP pelos mutantes supressores LAP	43
Figura 15 – Acúmulo de poliP pelos mutantes supressores HAP	43
Figura 16 – Detecção da enzima FA dos mutantes NAP	45
Figura 17 – Detecção da FA dos mutantes LAP	46
Figura 18 – Detecção da enzima FA dos mutantes HAP	48
Figura 19 – Detecção da enzima FA a partir de culturas e de colônias	49
Figura 20 – Sobrevivência de <i>Galleria mellonella</i> infectada com PA14 e mutantes	52
Figura 21 – Efeito das mutações supressoras sobre a motilidade swarming	54
Figura 22 – Produção de piocianina	55
Figura 23 – Produção de pioverdina pela cepa selvagem e pelas cepas mutantes	56

1 Introdução

1.1 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa, aeróbia e apresenta o formato microscópico baciliforme. Podendo ser encontrada em plantas, águas, animais e humanos. A habilidade de colonização em diversos ambientes é proveniente da sua capacidade de utilizar fontes nutricionais diversas e alto potencial de adaptação a novos meios. Esta habilidade decorre, em parte, da presença de dezenas de sistemas de dois componentes, tendo sido descritas 63 proteínas histidinas quinases (HK) e 64 proteínas reguladoras de respostas (RR) (1). A primeira *P. aeruginosa* que teve o genoma inteiramente sequenciado foi a cepa PA01, e, em seguida, a cepa PA14 (organismo modelo utilizado neste trabalho). A bactéria PA01 apresenta 54 ORFs que estão ausentes na cepa PA14 e, em compensação, há a presença de 58 ORFs na cepa PA14 que não são encontradas na cepa PA01 (2).

P. aeruginosa é conhecida principalmente por ser um patógeno oportunista em pacientes portadores de fibrose cística, imunocomprometidos (pacientes sob tratamento com quimioterápicos, portadores de HIV/Aids) e vítimas de queimaduras. A bactéria é amplamente conhecida pela capacidade intrínseca de resistir aos efeitos de antimicrobianos, formação de biofilmes impermeáveis a medicamentos e pela presença de diversos fatores de virulência, apresentando desta forma um grande desafio para a saúde pública. (3).

1.1.1 Motilidades de *P. aeruginosa*

A fim de adaptar-se no ambiente por um longo período de tempo, a *P. aeruginosa* é apta a alternar entre o estilo de vida planctônico ou móvel. O estilo de vida móvel pode ocorrer a partir de três tipos de motilidade superficial, sendo elas: *swimming*, *swarming* e *twitching* (4).

A motilidade *swimming* é dependente da estrutura flagelar, permitindo a translocação em ambientes com baixas concentrações de ágar, em torno de 0,3-0,4%. Enquanto que o *swarming* é realizado em meios viscosos onde a concentração do ágar encontra-se entre 0,5 e 0,7%. A presença de flagelos múltiplos, a produção do biosurfactante rhamnolipídios, a existência de determinados nutrientes disponíveis no meio (ferro, cobre, nitrogênio, carbono) e uma concentração celular específica são fatores necessários para que ocorra a translocação. Já quando a bactéria situa-se em meio sólido, concentração de ágar $\pm 1\%$, as motilidades *swimming* e *swarming* são desfavoráveis, e a translocação do tipo

twitching é praticada. A estrutura requerida é o pilus tipo IV (5).

1.1.2 Metabólitos secundários Pioverdina e Piocianina

P. aeruginosa apresenta, como característica notável, a produção de pigmentos extra-celulares - piocianina e pioverdina. O metabólito piocianina é capaz de causar diversos danos celulares no hospedeiro, tais como a inibição da respiração celular, da função ciliar, liberação de prostaciclina e alteração nos níveis de cálcio. Além disso, desempenha um papel relevante na manutenção de *P. aeruginosa* nos pulmões de indivíduos com fibrose cística. (3, 6).

A piocianina é um composto sintetizado a partir do corismato, envolvendo diversas etapas mediadas pelos produtos de dois operons - *phzA1-G1* e *phzA2-G2* e dos genes *phzH*, *phzM*, *phzS* (7, 8). A produção deste composto é regulada pelo sistema de *quorum sensing* (QS), sendo que pelo menos dois sistemas foram detectados em *P. aeruginosa* – *las* e *rhl*. O sistema *las* compreende a proteína ativadora da transcrição LasR e a proteína LasI, responsável pela síntese do auto indutor PAI-1 "N-(3-oxododeca-*o*il)-L-homoserina lactona". Este sistema também foi atribuído a ativação de alguns genes de virulência, tais como: *lasB*, *lasA* e *toxA*. O sistema *rhl* é composto pelas proteínas RhlR (ativadora da transcrição) e RhlI (síntese do auto indutor PAI-2 "N-butiril-1-homoserina lactona"). Este sistema coordena os genes *rhlI* e *rhlAB*, responsáveis por codificar a enzima ramnosil transferase (9).

A pioverdina apresenta como principal função a absorção do ferro presente no ambiente, ao secretar a pioverdina as bactérias são capazes de quelar o ferro e transportá-lo para o interior da célula, tendo em vista que a sua atuação principal é como quelante de Fe, a produção da pioverdina é induzida sob carência do nutriente. A síntese da pioverdina é iniciada no citoplasma e finalizada no periplasma, por onde é excretada para o exterior da célula pela bomba de efluxo PvdRT-OpmQ (10, 11).

1.2 Regulon PHO

Bactérias habitam diversos nichos ambientais, sendo, parte deles, suscetíveis a mudanças bruscas. Para a adaptação bacteriana é necessário a existência de agentes sinalizadores, como os sistemas de dois componentes, que compreendem a regulação de uma enorme variedade de funções fisiológicas, como motilidade, metabolismo, virulência e respostas a diversos tipos de estresse (12). Durante o ciclo de vida bacteriano, é comum haver carência de macronutrientes. Bactérias como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* dependem da captação de ortofosfato ou fosfato inorgânico (PO_4^{3-} –

ou Pi) para a sua manutenção e crescimento (13), uma vez que este compõe as moléculas de DNA e RNA, fosfolipídeos, agem como fonte de energia, e outras funções (14).

O regulon PHO é um conjunto de genes que respondem à disponibilidade de Pi no meio. Os genes pertencentes ao regulon PHO possuem, em seus promotores, sequências consenso denominadas PHO-boxes, substituindo a sequência clássica -35. O regulon PHO é regulado por um sistema de dois componentes composto pelas proteínas PhoR e PhoB. PhoR atua como uma histidina quinase e a proteína PhoB como uma proteína reguladora de resposta. Em concentrações inferiores a 4 μM de Pi, PhoR se auto-fosforila e transfere o grupo Pi para um resíduo de aspartato em PhoB. PhoB sofre uma mudança conformacional, dimeriza e se liga às PHO-boxes (15). Em concentrações de Pi superiores a 4 μM , a proteína PhoR atua como repressora, desfosforilando PhoB. Na ausência do resíduo Pi, PhoB desliga-se das PHO-boxes e a transcrição dos genes de PHO é cessada (Figure 1).

1.3 Operon *pst*

O operon *pst*, pertencente ao regulon PHO, é composto por cinco genes (*pstS*, *pstA*, *pstC*, *pstB* e *phoU*) que codificam um sistema de transporte de Pi de alta afinidade do tipo ABC. Os quatro primeiros genes codificam proteínas que atuam diretamente no transporte de Pi, a saber: PstS, localizada no periplasma, cuja função é ligar-se ao ortofosfato e transporta-lo até o canal transmembrânico formado pelas proteínas PstA e PstC e a proteína PstB, que atua como uma ATPase, fornecendo energia ao transportador. Enquanto que o quinto gene, *phoU*, codifica uma proteína de mesmo nome que não participa do transporte de Pi para o interior da célula, mas juntamente com as demais proteínas, atua como um repressor do regulon PHO quando a bactéria encontra-se em um ambiente com excesso de Pi (16, 17). Além disso, foi sugerido que a proteína PhoU regula o transporte de Pi via Pst, impedindo que a bactéria capte Pi em demasia (18). A presença de mutações deletérias em qualquer gene do operon *pst* causa a constitutividade de todo o regulon PHO (mutantes PHO-constitutivos), isto significa que, independentemente da concentração de fosfato presente no ambiente, a proteína PhoR segue fosforilando PhoB, mantendo a transcrição dos genes pertencentes ao regulon PHO (19).

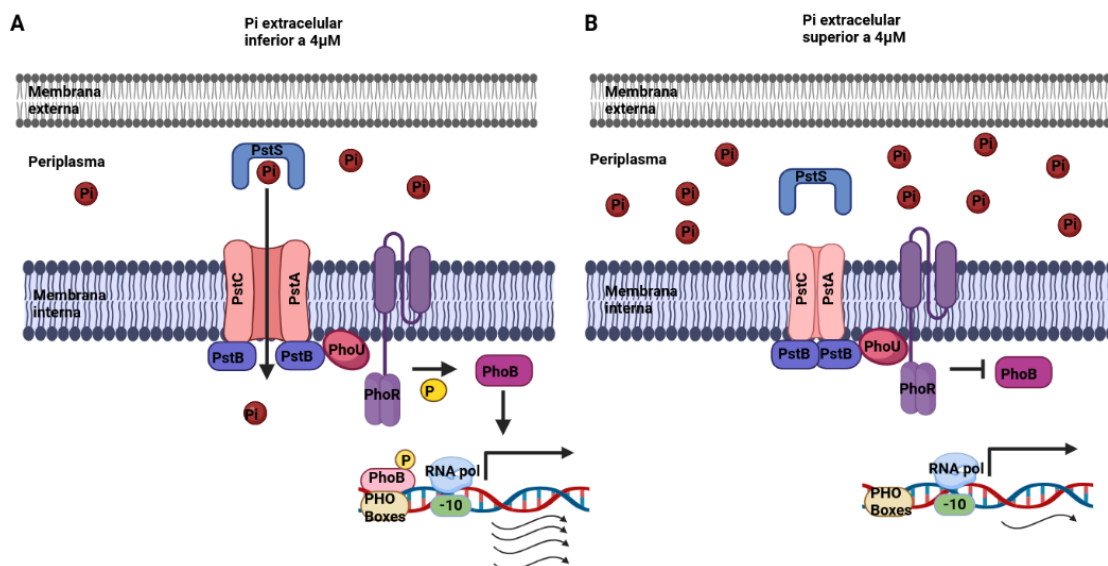


Figura 1 – Modelo de regulação do Regulon PHO: Em excesso de Pi, a proteína PstS encontra-se saturada e um sinal é conduzido para PhoR, que passa a atuar como repressora, desfosforilando PhoB. Em condições de carência de Pi, ou de inativação de qualquer gene do operon *pst*, a proteína PhoR é autofosforilada, e, em seguida, fosforila PhoB, que se liga às PHO-boxes, induzindo a transcrição dos genes de PHO. Adaptação de [Chekabab, Harel e Dozois\(2014\)](#)

1.4 Polifosfato

O polifosfato inorgânico (poliP) é uma cadeia linear composta por dezenas ou centenas de moléculas de Pi unidas por ligações de alta energia denominadas fosfoanidrílicas, conforme mostrado na [Figure 2](#). O polímero de poliP está presente em todos os organismos até agora estudados – bactérias, arqueias, fungos, plantas e animais. A maior taxa de acúmulo de poliP ocorre na fase estacionária ([21](#)).

Conforme revisto por [Albi e Serrano, \(2016\)](#), o poliP apresenta inúmeras funções em organismos procarióticos e eucarióticos. Em seres unicelulares, o poliP atua como reservatório de Pi, quelante de cátions e proteção contra estresses. Já em organismos multicelulares, apresenta como funções o fornecimento de energia celular, resposta a estresses e aclimação à carência nutricional.

O metabolismo de poliP em bactérias é controlado, principalmente, por duas enzimas: poliP quinase (PPK) e exopolifosfatase (PPX). A enzima PPK apresenta como função a síntese do poliP a partir do ATP e também a conversão de ADP para ATP, conforme mostrado na [Equation 1](#) e na [Equation 2](#), respectivamente. A enzima PPX tem como função a hidrólise das extremidades da cadeia de poliP produzindo Pi, como representado pela [Equation 3](#) ([21](#)).

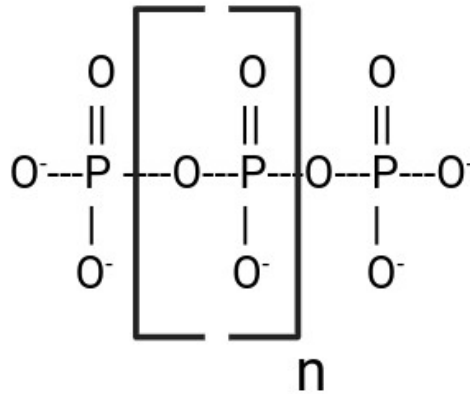
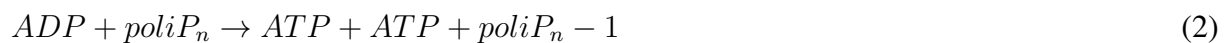


Figura 2 – Ilustração de um polímero de poliP A letra n corresponde ao número de moléculas de Pi presentes na cadeia de poliP.



P. aeruginosa carrega um segundo gene *ppk*, que codifica a proteína PPK2, que catalisa a síntese de poliP a partir de GTP. Assim como em *E. coli*, os genes *ppk* e *ppx* de *P. aeruginosa* estão adjacentes no cromossomo. Porém, em *P. aeruginosa* não há a formação de um operon, já que estão em orientações opostas (23, 24).

1.5 Fosfatase alcalina

A enzima fosfatase alcalina (FA) é uma proteína amplamente distribuída na natureza, abrangendo seres procarióticos e eucarióticos. A principal função atribuída a esta enzima é a hidrólise de ésteres de monofosfato, liberando moléculas de Pi. A atividade ótima da enzima ocorre em pH alcalino. (25, 26).

Em organismos procarióticos, três famílias distintas de fosfatases alcalinas são observadas: PhoA; PhoX e PhoD. As proteínas PhoD e PhoX são monoméricas, sendo capazes de hidrolisar moléculas de fosfomonoésteres e fosfodiésteres, apresentando como co-fator Ca^{2+} . Ao passo que PhoA é uma enzima homodimérica, ativada por Mg^{2+} e Zn^{2+} , hidrolisando fosfomonoésteres (27). O gene *phoA* de *P. aeruginosa* pertence ao regulon PHO e assim como os demais genes de PHO, apresenta a síntese elevada em ambientes escassos de Pi (19). A [Figure 3](#) representa a hidrólise do substrato p-nitrofenilfosfato (pNPP), utilizado no laboratório para medir a atividade da FA, resultando na liberação de p-nitrofenol e Pi.



Figura 3 – Hidrólise do substrato p-nitrofenilfosfato em p-nitrofenol e Pi

1.6 O regulon PHO de *P. aeruginosa*

O Regulon PHO de *P. aeruginosa* difere de *E. coli* pelo número de Pho-boxes (putativas) encontradas ao longo do genoma bacteriano - 237 e 121, respectivamente (28, 29). Tanto *E. coli*, como *P. aeruginosa*, carregam 2 PHO-boxes no operon *pst*, mas dispostas de forma diferente ([Figure 4](#)). Em *P. aeruginosa*, uma PHO-box está localizada a montante do gene *pstS* e a segunda na região intergênica entre os genes *pstS* e *pstC*. Ao passo que em *E. coli*, é observado um único promotor com duas PHO-boxes a montante de *pstS*, conforme ilustrado na [Figure 4](#) (30, 31).

A taxa de identidade entre o transportador Pst de *P. aeruginosa* e de *E. coli* também foi analisada, a começar pela proteína periplasmática PstS apresentando uma taxa de identidade de 22,1%, enquanto

que a taxa de identidade entre o canal transmembrânico, PstA e PstC, de *P. aeruginosa* e de *E. coli* é de 16,4% e 14,1%, respectivamente, em relação a proteína PstB é apresentado 52,2% de identidade. Por último, a identidade da sequência de PhoU é de 44,9%.

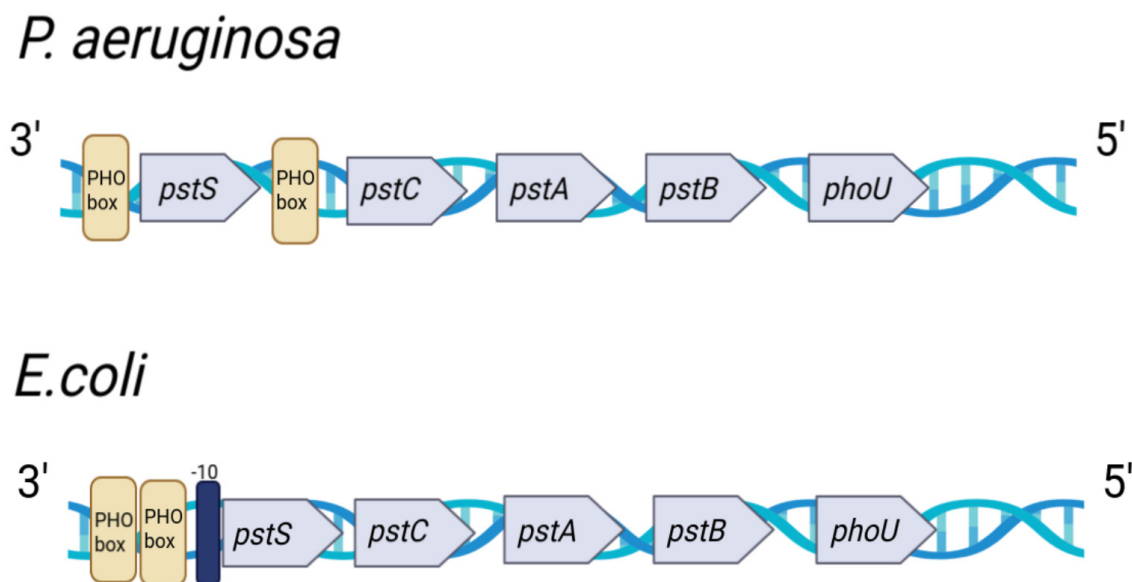


Figura 4 – Arranjo genético dos operons *pst* de *E. coli* e de *P. aeruginosa*

1.7 O regulon PHO e a virulência bacteriana

A presença de diversos fatores de virulência como apêndices de superfícies (flagelo, pili tipo IV), toxinas (ExoS, ExoU, ExoA, entre outras), sistema de secreção (T1SS, T2SS, T3SS, T5SS, T6SS), componentes da membrana (Lipopolissacarídeo), exopolissacarídeos (Alginato), protease (Protease IV), sideróforos (Pioverdina), além da regulação QS e formação do biofilme são características de *P. aeruginosa* (32).

Há na literatura diversos exemplos da participação dos genes do regulon PHO em processos associados à virulência. Em *E. coli* extra-intestinal, foi demonstrado uma relação entre a virulência e os genes do regulon PHO (33). Os autores relataram que o nocaute de *phoU* causou a perda parcial da capacidade de colonizar o trato urinário de ratos quando comparado com a cepa selvagem. Em adição ao gene *phoU* outros componentes do operon *pst* mostraram-se importantes na virulência. Por exemplo, a deleção do operon *pst* de *E. coli* enteropatogênica (EPEC) atenuou a virulência da bactéria (34). Inserções nos genes *pstS* e *pstC* causaram atenuação na virulência da bactéria *Proteus mirabilis* (35). A expressão dos genes relacionados à virulência é atenuada no mutante *phoB* de *Vibrio cholerae* (36).

No estudo realizado por [Zaborina et al. \(2008\)](#) foi demonstrado que cepas de *P. aeruginosa* multi-resistentes a antibióticos apresentam como fator de virulência a adesão epitelial intestinal por meio da formação de apêndices ricos em PstS, auxiliando a bactéria a adquirir Pi do hospedeiro quando encontra-se em carência de Pi, enquanto que em suficiência de Pi estes apêndices são completamente suprimidos.

1.8 Mutante $\Delta phoU$

No estudo realizado por [Gardner et al. \(2014\)](#) ficou demonstrado que PhoU atua como uma proteína reguladora do transportador Pst quando a célula encontra-se em um ambiente rico em Pi, ademais Phou interage com o domínio PAS de PhoR e com a proteína PstB, intermediando o contato entre PhoR e PstB. Qualquer mutação nula (perda de função) em um dos genes de *pst*, causa a expressão constitutiva do regulon PHO (38). Colônias de mutantes PHO-constitutivos podem ser observadas em placas de meio de cultura contendo o substrato cromogênico da fosfatase alcanina, 5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (X-P), apresentando uma coloração azul.

Em *E. coli*, o nocaute do gene *phoU* resulta em efeitos pleiotrópicos, causados, ao menos em parte, pelo elevado consumo de Pi inorgânico e alto acúmulo de poliP (39). O mutante *phoU* de *P. aeruginosa*, em adição à constitutividade do regulon PHO, apresenta alto consumo de Pi, elevado acúmulo de polifostato, colônias visivelmente menores quando comparadas com as colônias derivadas da cepa selvagem, menor resistência a estresses ambientais e a antibióticos (40).

A inativação do gene *phoU* em *E. coli* leva à aquisição de mutações compensatórias indicando que a alta expressão de Pst é prejudicial para a célula. Essas mutações supressoras ocorrem nos genes *phoB* ou em um dos genes do operon *pst*. Mutações em *phoB* resultam na inativação, parcial ou total, do regulon PHO, enquanto que mutações nos genes *pst* resultam na inativação ou atenuação do sistema de transporte de Pi. Em ambas as classes de mutações supressoras é verificado uma diminuição no transporte de Pi, evitando os efeitos tóxicos do alto acúmulo da molécula (38, 41). [Hirota et al. \(2013\)](#) reconheceram três tipos de mutações compensatórias do mutante $\Delta phoU$ de *E. coli*, denominadas NAP (*No AP phenotype*), LAP (*Low AP phenotype*) e HAP (*High AP phenotype*). O mutante NAP apresenta colônias de tamanho similar ao da cepa selvagem, com diâmetro de ± 5 mm, após 24 horas de incubação em meio LB. Enquanto que o mutante HAP apresenta colônias com uma forte coloração azul indicando níveis elevados de FA e um diâmetro de ± 3 mm, após 24

horas de incubação. Nenhum dos mutantes mencionados apresenta acúmulo de poliP, por este fato os mutantes foram designados como NAP[-] e HAP[-], onde o símbolo [-] indica que não há acúmulo de poliP. Por outro lado, o mutante LAP apresenta colônias maiores e levemente azuladas, indicando baixa expressão constitutiva de FA. Este mutante foi designado como LAP[+] uma vez que apresenta elevado acúmulo de poliP.

Mutantes NAP[-] de *E. coli* carregam mutações *nonsense* na ORF de *phoB* resultando na ausência da proteína PhoB e inativação do regulon PHO, como pode ser evidenciado pela incapacidade de produzir FA. Mutantes HAP[-] apresentam mutações na região promotora do operon *pst* e, como resultado, há transcrição constitutiva dos genes do regulon PHO, caracterizada por uma alta atividade de FA, e ausência/diminuição do transporte de Pi via Pst. Já o mutante LAP[+] apresenta mutações compensatórias no domínio de ligação ao DNA de PhoB, causando uma redução considerável na atividade constitutiva do regulon. Esse mutante mostrou níveis de expressão dos genes de PHO mais modestos, aliviando os efeitos tóxicos causados pela constitutividade. Porém o acúmulo de poliP permanece elevado. O objetivo principal deste trabalho foi o de caracterizar as mutações supressoras oriundas do mutante $\Delta phoU$ de *P. aeruginosa*.

2 Materiais e métodos

2.1 Bactérias utilizadas

As cepas utilizadas estão listadas na [Table 1](#). A classificação dos mutantes supressores foi realizada a partir da ordem de isolamento. Por exemplo: O primeiro mutante isolado foi designado como 1, o segundo isolado como 2 e assim sucessivamente até o último mutante. As letras que sucedem os números são as abreviações das características morfológicas - N (NAP), L (LAP), H (HAP).

Tabela 1 – Bactérias utilizadas

Cepas	Característica morfológica	Referência
PA14	Cepa selvagem	(42)
PA14 $\Delta phoU$	$\Delta phoU$	(43)
1N	NAP	Este trabalho
2H	HAP	Este trabalho
2N	NAP	Este trabalho
3N	NAP	Este trabalho
4N	NAP	Este trabalho
5H	HAP	Este trabalho
6N	NAP	Este trabalho
7N	NAP	Este trabalho
8N	NAP	Este trabalho
9L	LAP	Este trabalho
9N	NAP	Este trabalho
10N	NAP	Este trabalho
11L	LAP	Este trabalho
12H	HAP	Este trabalho
13N	NAP	Este trabalho
15N	NAP	Este trabalho
16N	NAP	Este trabalho
18N	NAP	Este trabalho
19N	NAP	Este trabalho
20N	NAP	Este trabalho
21N	NAP	Este trabalho
22H	HAP	Este trabalho
23N	NAP	Este trabalho
24N	NAP	Este trabalho
26N	NAP	Este trabalho

Continuação na próxima página

Tabela 1 – Continuação da página anterior

Cepas	Característica morfológica	Referência
27N	NAP	Este trabalho
28N	NAP	Este trabalho
29N	NAP	Este trabalho
30N	NAP	Este trabalho
31L	LAP	Este trabalho
32N	NAP	Este trabalho
33N	NAP	Este trabalho
34N	NAP	Este trabalho
35N	NAP	Este trabalho
36N	NAP	Este trabalho
37L	LAP	Este trabalho
38L	LAP	Este trabalho
39L	LAP	Este trabalho
40N	NAP	Este trabalho
42N	NAP	Este trabalho
43L	LAP	Este trabalho
44N	NAP	Este trabalho
45N	NAP	Este trabalho
46N	NAP	Este trabalho
47N	NAP	Este trabalho
48N	NAP	Este trabalho
49L	LAP	Este trabalho

2.2 Meios de cultura

- **Meio LB (Lysogeny Broth):** 10 g/L Bacto-triptona; 5 g/L Extrato de levedura; 10 g/L NaCl. Quando suplementado com ágar, será chamado de meio LA.
- **H-salts:** 0,02 M glicose; 0,02 M casaminoácido; NaCl (0,08 M); KCl (0,02 M); NH₄Cl (0,02 M); HEPES (1,2 M); MgCl₂ · 6H₂O (0,0009 M); Na₂SO₄ (0,002 M); CaCl₂ (0,01 M); FeCl₃ (0,01 M); ZnCl₂ (0,01 M); em pH 7,5 (ajustado com HCl concentrado).
- **HGP0,1.MgFe:** Meio H-salts acrescido de 0,1 mM de KH₂PO₄, 6 mM MgSO₄ e 50 µM FeCl₃.

- **HGP1.MgFe:** Meio H-salts acrescido de 1 mM de KH_2PO_4 , 6 mM MgSO_4 e 50 μM FeCl_3 .
- **HGP6.MgFe:** Meio H-salts acrescido de 6 mM de KH_2PO_4 , 6 mM MgSO_4 e 50 μM FeCl_3 .
- **Meio Swarming:** 20 mM NH_4Cl ; 12 mM Na_2HPO_4 ; 22 mM KH_2PO_4 ; 8,6 mM NaCl ; 11 mM glicose; 0,5% casaminoácido; 1 mM MgSO_4 ; 1 mM CaCl_2 . H_2O ; 0,5% ágar Bacto Difco.

2.3 Isolamento de mutantes supressores derivados de PA14 $\Delta phoU$

Para este experimento foram realizados 24 cultivos independentes do mutante $\Delta phoU$ em 4 ml de meio LB por 16 horas a 37°C. Em seguida as culturas foram lavadas com solução salina (0,9% NaCl) e a densidade óptica a 600 nm foi tomada. Após isso, as culturas foram diluídas até 10^6 bactérias/ml em meio LB fresco e incubadas novamente a 37°C, sob agitação, por 16 horas. Este processo foi realizado novamente, totalizando 3 *overnights* (O.N). No final do 3º O.N, as culturas foram diluídas 10^6 vezes em solução salina 0,9%. Alíquotas de 200 μ l foram plaqueadas em HGP ágar contendo XP. As placas foram incubadas a 37°C por 2 dias. Colônias com morfologias distintas foram isoladas e congeladas a -80°C.

A [Figure 5](#) apresenta um esquema representativo do processo realizado para o isolamento dos mutantes supressores.

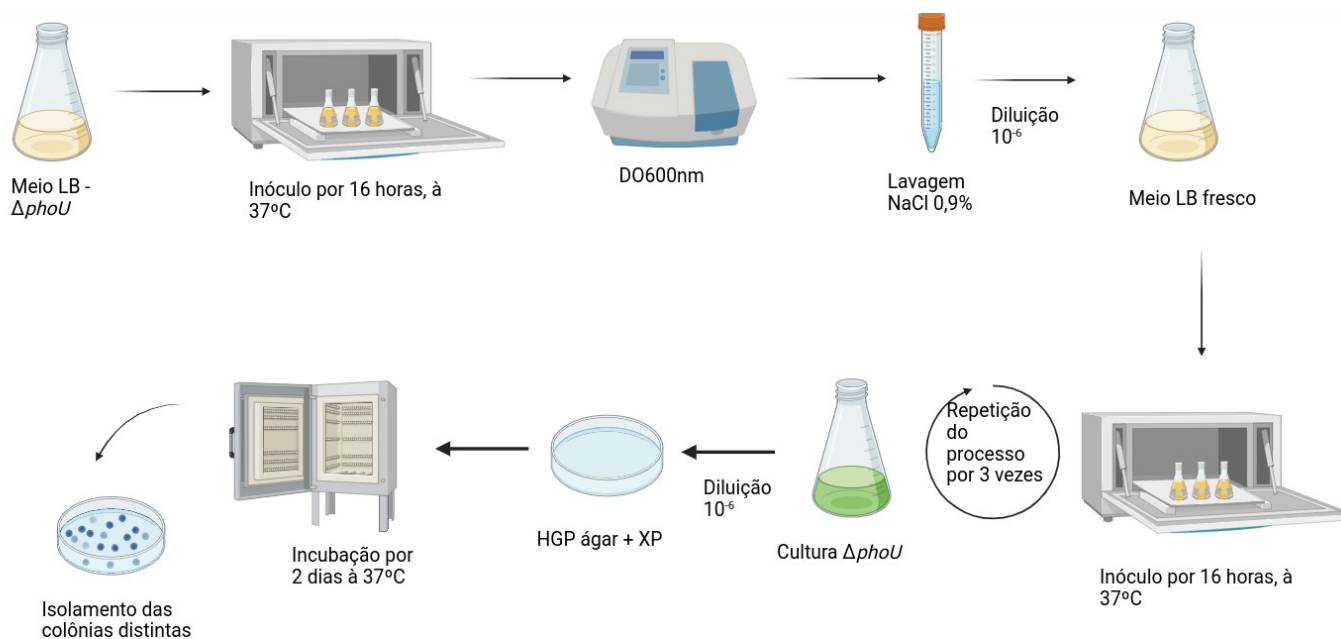


Figura 5 – Processo de isolamento dos mutantes supressores derivados da cepa PA14 $\Delta phoU$.

2.4 Rendimento da cultura dos mutantes supressores

Para determinar o rendimento da cultura dos mutantes supressores, as cepas supressoras foram cultivadas no meio HGP6.MgFe durante 24 horas sob agitação, a 37°C. Posteriormente as culturas foram diluídas 10^6 vezes em solução salina 0,9%. Alíquotas de 100 μ l foram plaqueadas em LB ágar contendo XP e as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Em seguida, as UFCs foram contadas e o número total de colônias foi multiplicado pela respectiva diluição.

Para averiguar se os resultados obtidos são estatisticamente diferentes em relação ao mutante $\Delta phoU$, foi empregado o teste *t* de *Student*.

2.5 Determinação da concentração de Pi residual

Para determinar a concentração de Pi residual presente no sobrenadante do inóculo bacteriano foi utilizado o método descrito por [Chen, Toribara e Warner \(1956\)](#), com algumas adaptações. Foram preparadas as seguintes soluções: 167 mM de ácido sulfúrico, 10% de ácido ascórbico, 2,5% de molibdato de amônio. O reagente de trabalho é composto por: 1 volume de ácido sulfúrico, 1 volume de ácido ascórbico, 1 volume de molibdato de amônio e 2 volumes de água deionizada. A cada experimento diário, foi obtida uma curva de calibração com soluções decrescentes de KH_2PO_4 : 160 μM ; 80 μM ; 40 μM ; 20 μM ; 10 μM .

As bactérias foram cultivadas no meio HGP6MgFe durante 24 horas, sob agitação, a 37°C. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 7000 rpm por 5 minutos. Uma alíquota de 10 μl do sobrenadante foi coletada e adicionada a 990 μl de H_2O deionizada, seguido da adição de 1 ml da solução de trabalho. A reação foi incubada por 15 minutos a 37°C e a leitura da densidade ótica foi realizada na absorvância de 820 nm. Os valores obtidos foram convertidos em mM de Pi utilizando a equação gerada pela curva de calibração. A normalização dos resultados foi realizada pelo número de bactérias presente nas culturas, através da contagem das UFCs.

Para averiguar se os resultados obtidos são estatisticamente diferentes em relação ao mutante $\Delta phoU$, foi empregado o teste *t* de *Student*.

2.6 Extração de poliP

Foram testados alguns protocolos de extração e medição de poliP. O primeiro protocolo a ser testado já havia sido utilizado em nosso laboratório ([43](#)). Neste protocolo, foi aplicado o uso do tampão LETS (100mM LiCl; 10mM EDTA; 10mM Tris -Cl; 0,2% SDS), fenol ácido e clorofórmio para a extração seguido da utilização do ácido perclórico para quelar o poliP em Pi. O segundo protocolo testado foi descrito por [Canadell et al. \(2016\)](#) diferenciando-se do primeiro método pelo uso do tampão AE (50mM de acetato de sódio pH 5.3; 10mM EDTA), fenol básico e tratamento com Dnase/Rnase para a realização da extração e o mesmo tratamento do protocolo anterior foi utilizado para quelar o poliP em moléculas de Pi. Diversas tentativas foram realizadas com as metodologias

descritas acima, porém surtiram resultados conflitantes. Sendo assim, optamos pela repadronização do ensaio da quantificação de poliP. Ao final, o protocolo utilizado para a realização deste trabalho foi baseado naquele proposto por [Aravind, Saranya e Kanmani \(2015\)](#). As bactérias foram cultivadas em 4 ml de meio HGP6MgFe, sob agitação, por 22 horas a 37°C. Após este tempo, as culturas foram centrifugadas por 10.000 rpm durante 2 minutos seguido da lavagem do pellet bacteriano com solução salina 0,9%. O pellet foi ressuspensionado em 4 ml de NaOH 0.2 M, e mantido sob agitação a 37°C, durante 20 horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 6000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi separado em partes iguais, onde uma parte foi utilizada para quantificar o poliP presente na amostra e a segunda parte foi utilizada para quantificar o Pi residual na amostra. A primeira fração foi adicionada a uma solução de HCl 1M e incubada a 100°C por 10 minutos. Após a hidrólise do poliP, 100 µl foram retirados e adicionados a 900 µl de água deionizada, juntamente com 1 ml da solução de trabalho (descrita na [subseção 2.5](#)). A reação foi mantida por 15 minutos a 37°C e a da leitura densidade ótica em 820 nm foi realizada sendo os valores convertidos em mM de Pi a partir da curva de calibração gerada.

Este processo foi realizado também com a segunda fração, da qual foi obtida a concentração de Pi residual na amostra e esta foi subtraída do valor oriundo da hidrólise do poliP, conforme segue:

$$Pi \text{ procedente do poliP} = Pi \text{ total} - Pi \text{ residual.}$$

A normalização dos resultados foi realizada pelo número de bactérias presente nas culturas, através da contagem das UFCs. Para averiguar se os resultados obtidos são estatisticamente diferentes em relação ao mutante $\Delta phoU$, foi empregado o teste *t* de Student.

2.7 Ensaio de FA

O cultivo das bactérias foi realizado a 37°C por 24 horas, sob agitação. Dois meios de cultura foram utilizados, HGP1.MgFe em suficiência de Pi e HGPO,1.MgFe em carência de Pi. Foram adicionados 100 µl da cultura em 900 µl de p-NPP (P-nitrofenil-fosfato) dissolvido em 1 M Tris pH 9 na concentração de 1 mg/ml. As reações foram incubadas à 37°C até a obtenção da coloração amarela, sendo interrompidas pela adição de 250 µl de Na₂HPO₄. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 2 minutos e a leitura da densidade ótica na absorvância de 410 nm foi realizada. A atividade específica da FA foi calculada de acordo com a seguinte equação: $U.E. = \frac{A_{410} \times K}{min \times n^{\circ} bac}$; onde A_{410} é a absorvância do produto da reação; K é uma constante que corresponde a 10^{10} , min é o tempo de

reação e $n^{\circ} bac$ é o número de bactérias presentes no ensaio. A concentração de bactérias foi medida, no dia seguinte, por meio da contagem de UFCs em diluições das culturas.

Para averiguar se os resultados obtidos são estatisticamente diferentes em relação ao mutante $\Delta phoU$, foi empregado o teste t de *Student*.

2.8 Sequenciamento de *phoB* e *pstS*

O DNA genômico do mutante $\Delta phoU$ e dos mutantes supressores foi extraído por fervura das colônias (47). Os amplicons de *phoB* e *pstS* foram obtidos utilizando os seguintes iniciadores: PA-*phoB* F (5' CGGAACCTGTTGAGCATAGC 3'), PA-*phoB* R (5' AGTCTTGGTTCACGACGGAT 3'), PA-*pstS* F (5' ATCCTGCATGAAACGGATGG 3') e PA-*pstS* R (5' GACAGCAACATGACGCAACA 3'). Após a realização da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), os fragmentos foram purificados empregando o uso do EasyPure® Quick Gel Extraction Kit conforme instruções do fabricante. As amostras foram sequenciadas no Centro de Estudos do Genoma Humano e Células-Tronco- USP utilizando o método de sequenciamento de Sanger.

2.9 Avaliação da virulência de *P. aeruginosa*

A virulência das bactérias foi avaliada no modelo de larvas de *Galleria mellonella*, comumente conhecidas como traça-da-cera. Os insetos foram mantidos na incubadora B.O.D a 30°C sem a presença de iluminação em restos de nichos de abelhas. Foram selecionadas larvas que apresentaram massa entre 130 e 220 mg. No total, foram utilizadas 50 larvas por linhagem bacteriana. O experimento descrito abaixo foi realizado com a colaboração do Doutorando Danilo Ribeiro Ferraz, do Laboratório de Biologia Molecular de Nematoides do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo.

As bactérias foram cultivadas em meio HGP6.MgFe sob agitação, a 37°C por 24 horas. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas durante 2 minutos a 9000 rpm e lavadas três vezes com solução salina 0,9%. As suspensões de bactérias foram diluídas até a obtenção de inóculos aproximados de 10^2 bactérias/ml e a quantidade exata de bactérias inoculadas foi confirmada através da contagem de UFC. Como controle foi realizado inóculos de solução salina 0,9% nas larvas. As injeções foram realizadas utilizando a seringa Hamilton, modelo 701N, por perfuração do último par de proleg. Após o inóculo, as larvas foram mantidas a 37°C e avaliadas a cada 24 horas durante 4 dias e, consideradas

mortas quando não apresentaram movimentos após estímulo pelo toque da pinça em sua extremidade posterior.

2.10 Motilidade do tipo Swarming

Os inóculos das bactérias foram realizados em meio LB e incubados sob agitação, à 37°C, por 24 horas. No dia seguinte, a DO_{600} foi medida e as culturas foram diluídas para a $DO_{600} = 0,1$ em LB fresco e cultivadas a 37°C até atingir a DO_{600} de 3,0. Em seguida, 5µl da cultura foram aplicados no centro da placa contendo o meio Swarming (subseção 2.2), as placas foram incubadas durante 16 horas no interior de um saco plástico a fim de minimizar a evaporação de água do meio a 37°C e fotografadas.

2.11 Mensuração de piocianina e pioverdina

Para a extração do pigmento piocianina, o protocolo utilizado foi uma adaptação de [Carlsson et al. \(2011\)](#) e de [Shouman et al. \(2023\)](#). As bactérias foram cultivadas em 10 ml do meio HGP6.MgFe durante 24 horas, a 37°C, sob agitação. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos a 4°C e 5 ml do sobrenadante foram coletados e misturados a 3 ml de clorofórmio. As soluções foram agitadas fortemente por 30 segundos e, em seguida, centrifugadas por 10 minutos a 10000 rpm, a 4°C. Após a centrifugação 2,5 ml da fase orgânica foi coletada e transferida para um novo tubo falcon e 1 ml de HCl 0,2 M foi adicionado. Novamente as soluções foram agitadas vigorosamente por 30 segundos e centrifugadas por 2 minutos a 10000 rpm, a 4°C. A fim de quantificar a produção de piocianina a porção de coloração rosa foi coletada e medida na DO_{520} e a concentração foi calculada a partir da equação: $Conc. \text{ de piocianina } (\mu\text{g/ml}) = DO_{520} \times 17,072$.

Para quantificar a pioverdina as bactérias foram cultivadas em meio HGP6.MgFe durante 24 horas, sob agitação, a 37°C. Após esse período, as culturas foram centrifugadas a 7000 rpm por 5 minutos e o sobrenadante foi coletado. Com base no valor obtido pela leitura da DO_{405} , a concentração de pioverdina foi estimada a partir da seguinte equação: $Conc. \text{ de pioverdina } (\mu\text{Mol/L}) = \frac{DO_{405}}{19000} \times 10^6$ (50, 51).

Para averiguar se os resultados obtidos são estatisticamente diferentes em relação ao mutante ΔphoU , foi empregado o teste t de Student.

3 Resultados

3.1 Mutantes supressores da mutação $\Delta phoU$

É sabido que a deleção do gene *phoU* de *E. coli* e de *P. aeruginosa* afeta negativamente o crescimento bacteriano (52, 40). Isto ocorre principalmente porque a expressão constitutiva do sistema Pst em suficiência de Pi no meio resulta no influxo de grandes quantidades deste nutriente, quebrando a homeostase de Pi (38, 53). Mediante a pressão seletiva causada pelo influxo exacerbado de Pi, o mutante $\Delta phoU$ tende a adquirir mutações compensatórias em *phoB*, *phoR* ou em *pstSCAB*, diminuindo, assim, a expressão do sistema de transporte Pst e conseqüentemente a captação de Pi (54).

A fim de estudar a natureza das mutações supressoras de $\Delta phoU$ em *P. aeruginosa*, o mutante PA14 $\Delta phoU$ foi submetido a um mini-experimento de evolução, no qual a bactéria foi cultivada suscetivas vezes em batelada no meio LB. O estudo realizado por Rice et al. (2009) observou a presença de mutantes compensatórios derivados da cepa $\Delta phoU$ em *E. coli* quando cultivada em LB, portanto decidimos utilizar o mesmo meio para isolar os mutantes supressores. Ao final, as culturas foram diluídas e plaqueadas em meio definido HGP contendo XP, o substrato cromogênico da FA. Foram isolados 47 colônias (ver Table 1), que foram classificados da seguinte forma:

- NAP [-] - Colônias brancas de diâmetro similar ao da cepa selvagem PA14
- LAP [+] - Colônias levemente azuladas de diâmetro maior do que o do mutante $\Delta phoU$
- HAP [+] - Colônias fortemente azuladas e com diâmetro similar ao do mutante $\Delta phoU$

Os símbolos [-] e [+] representam a capacidade de acumular poliP, que será testada mais adiante. A Figure 6 ilustra as três classes de mutantes isolados e os controles PA14 (cepa selvagem) e $\Delta phoU$.

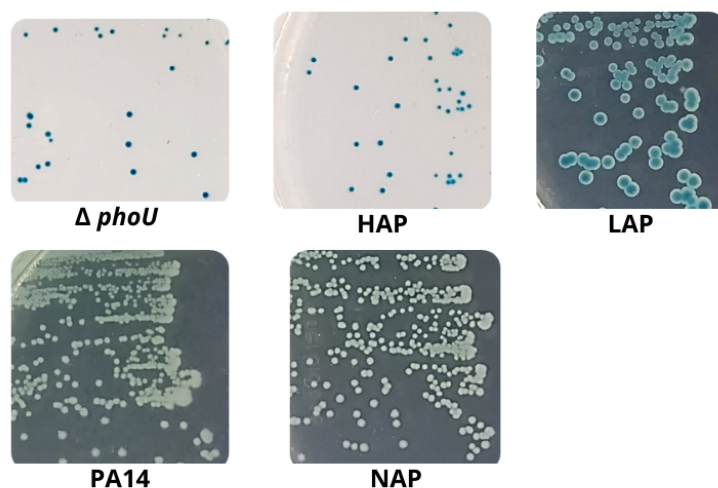


Figura 6 – Morfologia das colônias dos mutantes supressores Representação das colônias dos mutantes HAP (*High AP phenotype*), LAP (*Low AP phenotype*), NAP (*No AP phenotype*). As colônias fortemente azuladas na presença de XP (HAP e $\Delta phoU$) foram fotografadas em fundo claro, enquanto que os registros fotográficos das cepas PA14, NAP e LAP foram feitos em fundo escuro a fim de garantir uma melhor visualização.

3.2 Efeito das mutações compensatórias sobre o rendimento bacteriano

A inativação do gene *phoU* em cepas de *E. coli* e de *P. aeruginosa* apresenta efeitos pleiotrópicos, dentre eles, uma redução significativa no rendimento celular (52, 40). Para analisar o efeito que as mutações compensatórias exercem sobre o rendimento, as cepas supressoras isoladas foram cultivadas no meio HGP6.MgFe, conforme descrito na subseção 2.4. Para uma melhor compreensão dos resultados, os mesmos foram agrupados em três figuras distintas, conforme a classificação da mutação.

A Figure 7, Figure 8 e a Figure 9 apresentam os rendimentos das cepas (em UFC/ml). É possível observar que o rendimento do mutante $\Delta phoU$ é, aproximadamente, duas vezes menor quando comparado com a cepa selvagem. Este dado corrobora com os resultados já descritos na literatura (52, 40).

Na Figure 7 é observado o rendimento dos mutantes NAP. Apesar de que a maioria dos mutantes NAP apresentar rendimento superior ao do mutante $\Delta phoU$, os testes estatísticos mostraram que apenas cinco mutantes - 2N, 3N, 13N, 23N e 24N - são significativamente diferentes em relação ao mutante $\Delta phoU$. Outros mutantes também mostraram um alto rendimento (maior do que 6×10^9 bactérias) - 1N, 4N, 6N, 8N, 9N, 10N, 13N, 19N, 27N, 28N, 29N, 33N, 36N, 44N, 47N - porém não

apresentaram uma diferença significativa em relação à cepa ancestral. Este fato pode ser explicado pelo erro inerente ao método de contagem de colônias, visto que são realizadas sucessivas diluições das amostras de bactérias. Ademais, foram utilizadas apenas três replicas biológicas de cada cepa supressora para a execução do ensaio.

Alguns mutantes NAP - 16N, 26N, 34N, 35N, 40N - mostraram rendimento celular similar ao do mutante $\Delta phoU$ (menor do que $4,5 \times 10^9$ bactérias). Por último, alguns mutantes - 7N, 15N, 18N, 20N, 21N, 30N, 32N, 45N, 46N, 48N - apresentaram rendimento intermediário (maior do que $4,7 \times 10^9$ bactérias e menor do que $5,9 \times 10^9$ bactérias). Com base neste resultado é plausível sugerir que a maioria das mutações adquiridas pelos supressores NAP foi capaz de restaurar, ao menos parcialmente, o rendimento celular.

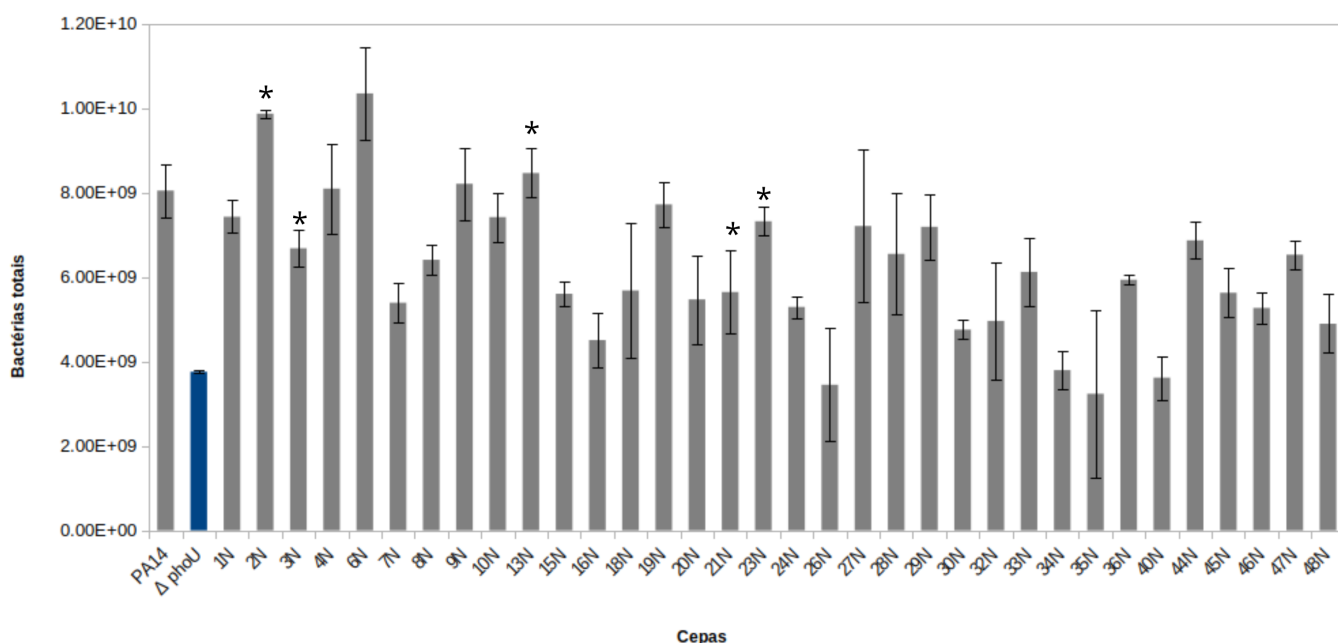


Figura 7 – Rendimento dos mutantes supressores NAP. As bactérias foram cultivadas em HGP6.MgFe e o rendimento foi calculado por meio da contagem das UFCs. O resultado foi obtido a partir da execução de três experimentos para cada mutante supressor. As barras do controle da cepa PA14 e do mutante $\Delta phoU$ representa a média de nove e sete experimentos, respectivamente. As barras de erro representam o erro padrão da média.* representa diferença significativa ($p < 0,04$) em relação ao mutante $\Delta phoU$ no teste t de Student.

A [Figure 8](#) apresenta o rendimento dos mutantes LAP. Apenas dois mutantes supressores - 9L e 11L, revertem o crescimento defeituoso causado pela mutação $\Delta phoU$, alcançando níveis similares ao rendimento apresentado pela cepa selvagem, mas sem significância estatística. Os demais mutantes LAP mostraram um rendimento similar ao da cepa ancestral. Por fim, o mutante 43L exibiu um rendimento 4 vezes menor em relação à cepa ancestral, mostrando uma diferença significativa quando

comparado com o mutante $\Delta phoU$.

A principal finalidade das mutações compensatórias é restaurar a capacidade do crescimento bacteriano no meio, porém, ao analisar os dados obtidos na [Figure 8](#) observamos que apenas dois supressores LAP reverteram o rendimento defectivo apresentado pelo mutante $\Delta phoU$.

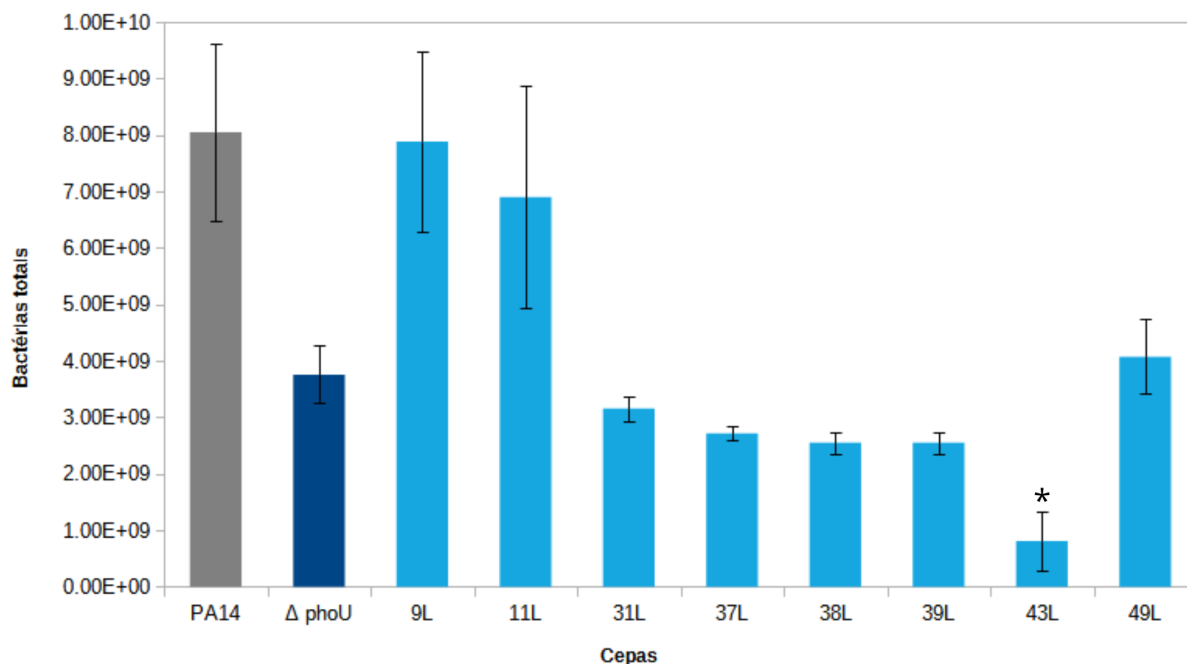


Figura 8 – Rendimento dos mutantes supressores LAP. As bactérias foram cultivadas em HGP6.MgFe e o rendimento foi calculado por meio da contagem das UFCs. O resultado foi obtido a partir da execução de três experimentos para cada mutante supressor. As barras do controle da cepa PA14 e do mutante $\Delta phoU$ representa a média de nove e sete experimentos, respectivamente. As barras de erro representam o erro padrão da média.* representa diferença significativa ($p < 0,006$) em relação ao mutante $\Delta phoU$ no teste t de Student.

Por último, a [Figure 9](#) mostra o rendimento dos mutantes HAP. Os supressores isolados apresentaram crescimento similar ao da cepa $\Delta phoU$, com a exceção do mutante 2H, que apresentou um rendimento significativamente menor em relação a cepa ancestral.

Após analisar a [Figure 7](#), [Figure 8](#) e a [Figure 9](#) é possível concluir, portanto, que, ao menos nas condições de cultivo testadas, nem todos os mutantes supressores reverteram a deficiência do crescimento causada pela deleção de $phoU$.

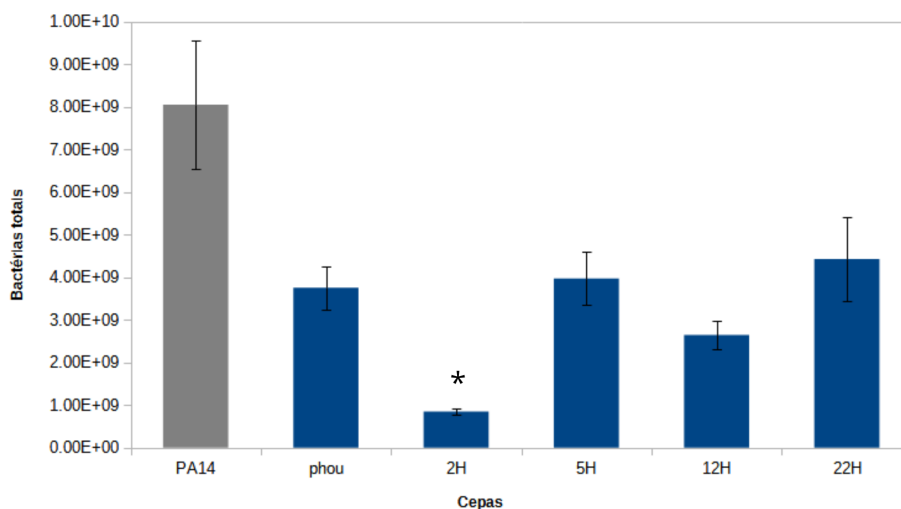


Figura 9 – Rendimento dos mutantes supressores HAP. As bactérias foram cultivadas em HGP6.MgFe e o rendimento foi calculado por meio da contagem das UFCs. O resultado foi obtido a partir da execução de três experimentos para cada mutante supressor. As barras do controle da cepa PA14 e do mutante $\Delta phoU$ representa a média de nove e sete experimentos, respectivamente. As barras de erro representam o erro padrão da média.* representa diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao mutante $\Delta phoU$ no teste t de Student.

3.3 Capacidade de remoção de Pi do meio

Foi demonstrado no nosso laboratório que o mutante $\Delta phoU$ de *P. aeruginosa* consome em média 3-5 vezes mais Pi do meio quando comparado com a cepa selvagem PA14 (40). Conforme mencionado anteriormente, a alta concentração de Pi no citosol é tóxica para a bactéria. Para superar o efeito negativo causado pelo excesso desta molécula, mutações supressoras, capazes de diminuir a expressão do transportador Pst, são selecionadas, reduzindo, assim, o nível de Pi consumido pela célula (41, 38). Mutações supressoras de $\Delta phoU$ foram estudadas apenas em *E. coli*. Para testar o efeito destas mutações sobre a capacidade de transporte de Pi de *P. aeruginosa*, ensaios de remoção de Pi do meio foram conduzidos para cada um dos mutantes isolados.

Na [Figure 10](#), é possível observar a taxa de Pi consumido pelos mutantes supressores NAP. Enquanto a cepa ancestral $\Delta phoU$ chega a captar mais de 80% do Pi do meio, os mutantes NAP, representados no gráfico, captaram, no máximo, 30% do Pi presente. Analisando o gráfico, podemos afirmar que todas as cepas supressoras reduziram significativamente a capacidade de remover Pi do

meio quando comparadas com o mutante $\Delta phoU$.

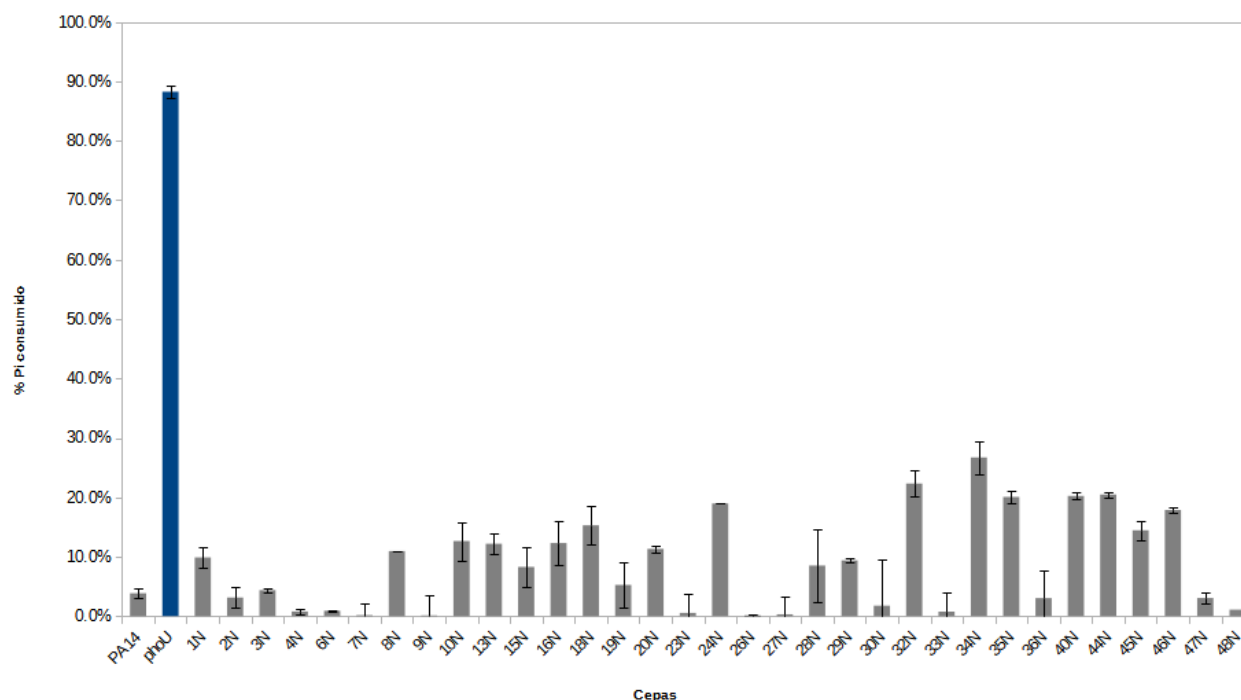


Figura 10 – Porcentagem de Pi removido do meio pelos mutantes NAP. Bactérias foram cultivadas em meio HGP6MgFe (contendo 6 mM de KH_2PO_4) e a taxa de Pi consumido por cada bactéria foi analisada. O resultado foi obtido a partir da execução de três experimentos para cada mutante supressor e nove experimentos para os controles PA14 e $\Delta phoU$. As barras de erro representam o erro padrão da média.

A [Figure 11](#) representa a taxa de Pi consumido pelos mutantes LAP. Os mutantes 9L, 11L e 43L apresentaram consumo de Pi um pouco abaixo do observado em relação à cepa ancestral $\Delta phoU$ (>80% do Pi presente no meio). Destes, apenas o consumo de Pi do mutante 11L foi significativamente menor. O consumo de Pi dos mutantes 31L, 37L, 38L e 39L foi mais modesto (49% do Pi presente no meio, em média). Já o mutante 49L apresentou consumo similar ao da cepa selvagem e 14 vezes menor do que o do mutante $\Delta phoU$. Portanto, com a exceção do mutante 49L, todos os mutantes LAP apresentaram alto consumo de Pi.

A [Figure 12](#) mostra o percentual de Pi consumido pelos mutantes supressores HAP. Esses mutantes apresentaram alta capacidade de remoção de Pi do meio, similar a da cepa $\Delta phoU$. O mutante 12H apresentou diferença significativamente menor em comparação com o mutante $\Delta phoU$, porém a taxa de Pi consumido permanece alta, em torno de 70%.

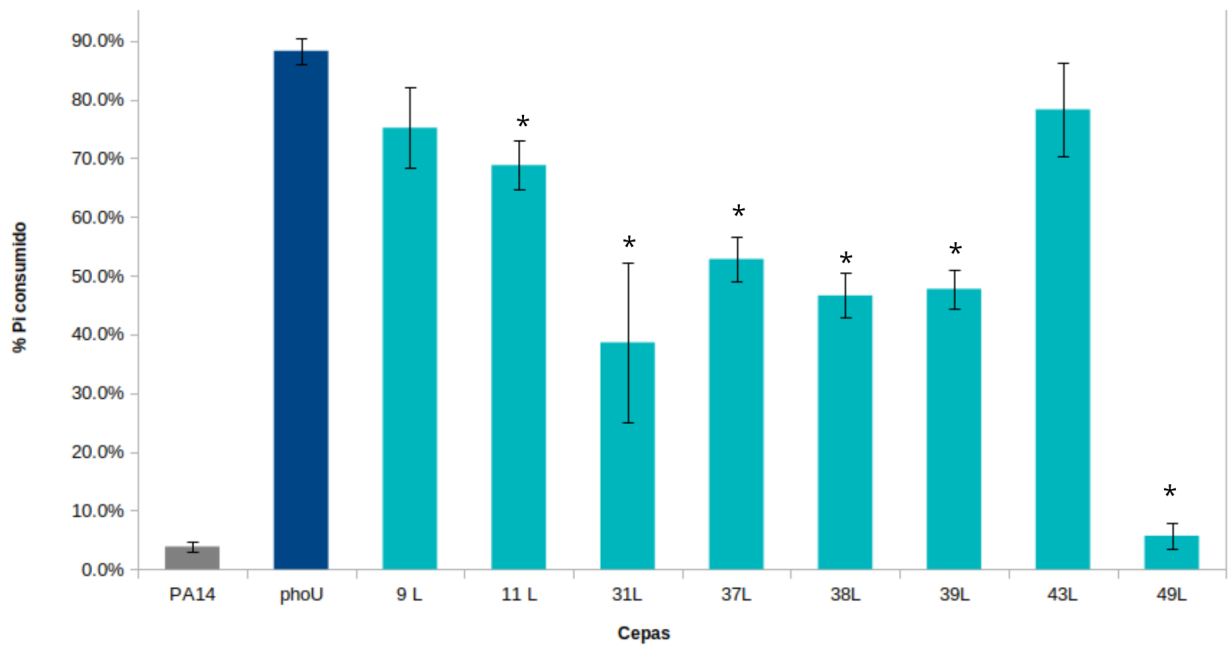


Figura 11 – Taxa de Pi removido do meio pelos mutantes LAP, pela cepa PA14 e $\Delta phoU$ As bactérias foram cultivadas no meio HGP6MgFe e a taxa de Pi consumido por cada bactéria foi analisada. O resultado foi obtido a partir da execução de três experimentos para cada mutante supressor e nove experimentos para os controles PA14 e $\Delta phoU$. As barras de erro representam o erro padrão da média. * representa diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao mutante $\Delta phoU$ no teste *t* de Student.

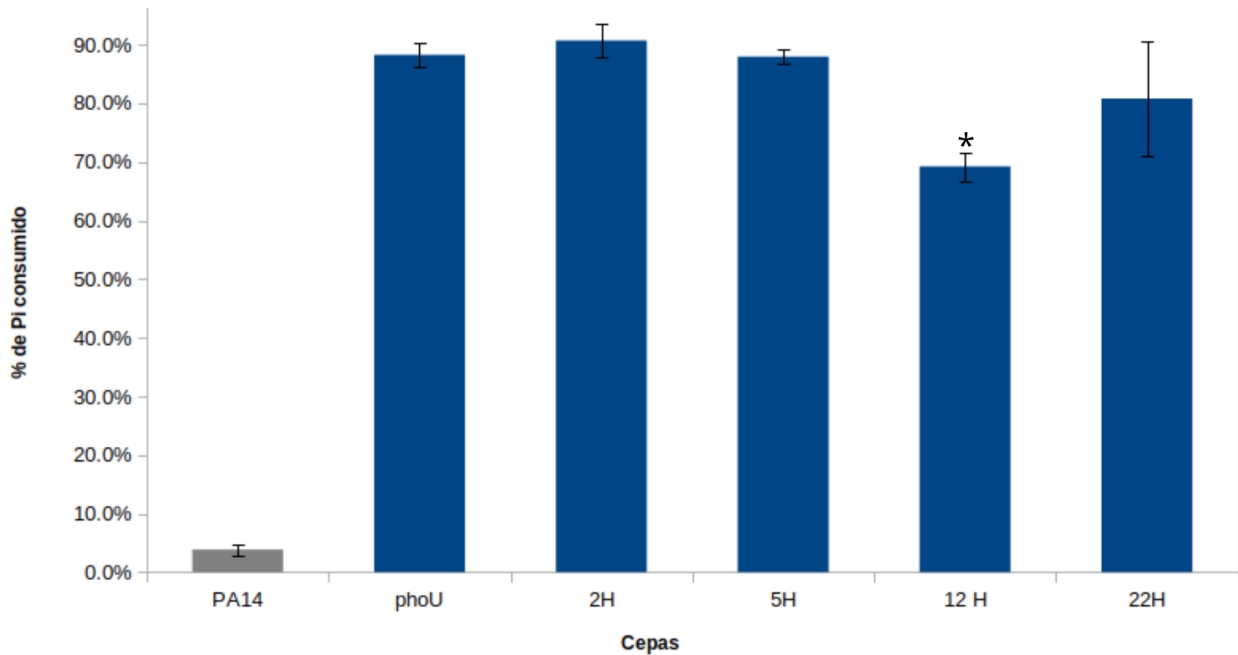


Figura 12 – Taxa de Pi removido do meio pelos mutantes HAP, pela cepa PA14 e $\Delta phoU$ As bactérias foram cultivadas no meio HGP6MgFe e a taxa de Pi consumido por cada bactéria foi analisada. O resultado foi obtido a partir da execução de três experimentos para cada mutante supressor e nove experimentos para os controles PA14 e $\Delta phoU$. As barras de erro representam o erro padrão da média. *representa diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao mutante $\Delta phoU$ no teste *t* de Student.

3.4 Acúmulo de poliP nos mutantes supressores

Conforme mostrado na [subseção 3.3](#), o mutante $\Delta phoU$ consome aproximadamente 6 mM do Pi presente no meio enquanto que a cepa selvagem consome apenas 0,3 mM de Pi. Uma fração do Pi captado é utilizada no metabolismo bacteriano e o excesso é armazenado em grânulos de poliP, atuando principalmente como reservatórios de energia e de Pi ([55](#)).

Sabendo que o acúmulo de poliP depende da abundância de Pi presente na célula, é esperado que cepas capazes de captar elevadas quantidades de Pi do meio apresentem um acúmulo de poliP superior quando comparadas com as cepas que captam pouco Pi. Para testar o acúmulo de poliP, diversos protocolos para a extração e a quantificação de poliP foram testados. Por fim, decidimos utilizar o protocolo descrito por [Aravind, Saranya e Kanmani \(2015\)](#).

Conforme observado na [Figure 13](#), [Figure 14](#) e [Figure 15](#), o mutante $\Delta phoU$ acumula em média 10 vezes mais poliP quando comparado com a cepa selvagem. O acúmulo é condizente com o nível de Pi captado. Na [Figure 13](#) é possível observar que a cepa PA14, assim como a maioria dos mutantes

NAP acumulam menos de 1 mM de poliP. Alguns chegam a acumular até 2 mM de poliP, ainda muito abaixo do que a cepa ancestral. Este resultado condiz com o resultado da [Figure 10](#), já que é esperado que mutantes que consomem pouco Pi, não acumulem muito poliP.

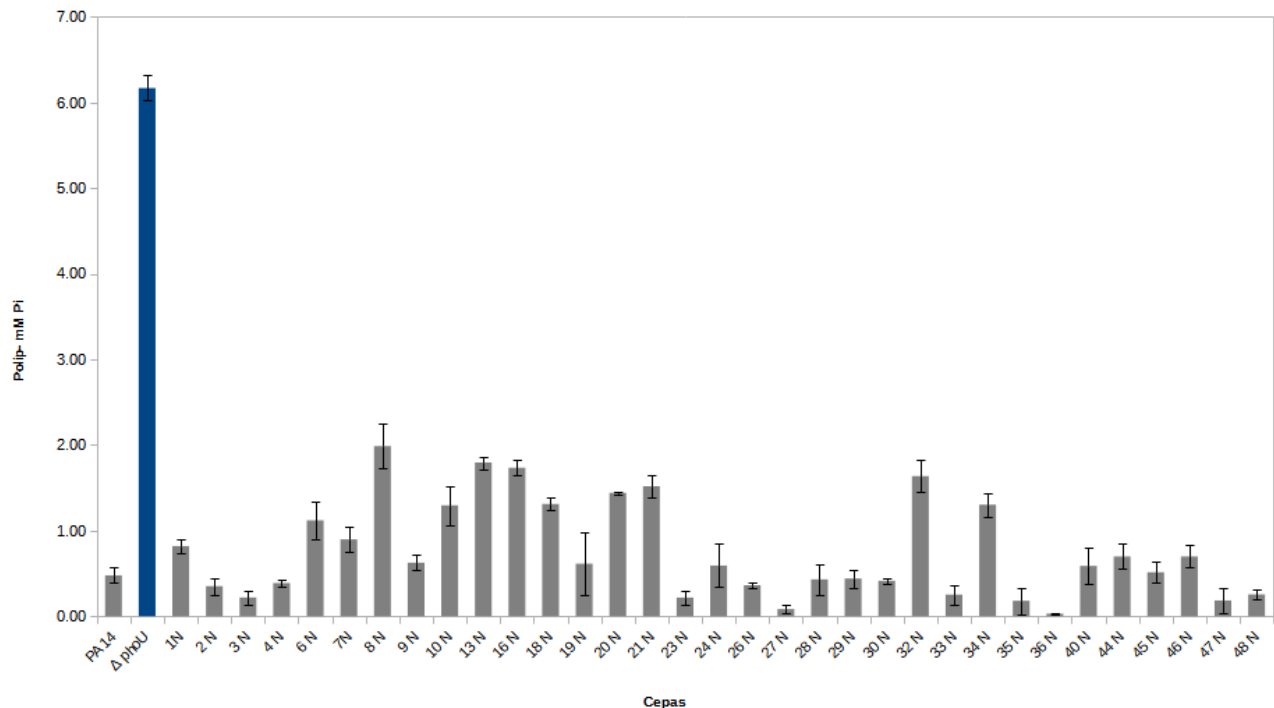


Figura 13 – Acúmulo de poliP pelos mutantes supressores NAP Os resultados correspondem a média de três experimentos para todos os mutantes supressores NAP e nove para as cepas controle PA14 e $\Delta phoU$. As barras de erro representam o erro padrão da média.

A [Figure 14](#) mostra o acúmulo de poliP dos mutantes LAP. Os mutantes LAP são capazes de acumular, em média 3,7 mM de poliP. Os supressores 9L e 43L apresentaram um acúmulo de poliP estatisticamente indistinguível da cepa $\Delta phoU$, enquanto que os demais supressores - 11L, 31L, 37L, 38L, 39L e 49L, apresentaram níveis intermediários de poliP, menores em relação à cepa ancestral $\Delta phoU$, mas, ainda assim, bem acima da cepa selvagem PA14. Conforme esperado, o mutante 49L, que apresentou o menor nível de poliP foi também o mutante LAP que captou menos Pi ([Figure 11](#)).

Por fim, a [Figure 15](#) apresenta o nível de poliP acumulado pelos supressores HAP. Em média, os mutantes HAP acumulam 5,2 mM de poliP. Os supressores 2H e 12H são estatisticamente diferentes da cepa ancestral $\Delta phoU$, porém, mesmo assim, o acúmulo de poliP permanece elevado. Os demais mutantes não apresentaram diferenças significativas em relação à cepa $\Delta phoU$.

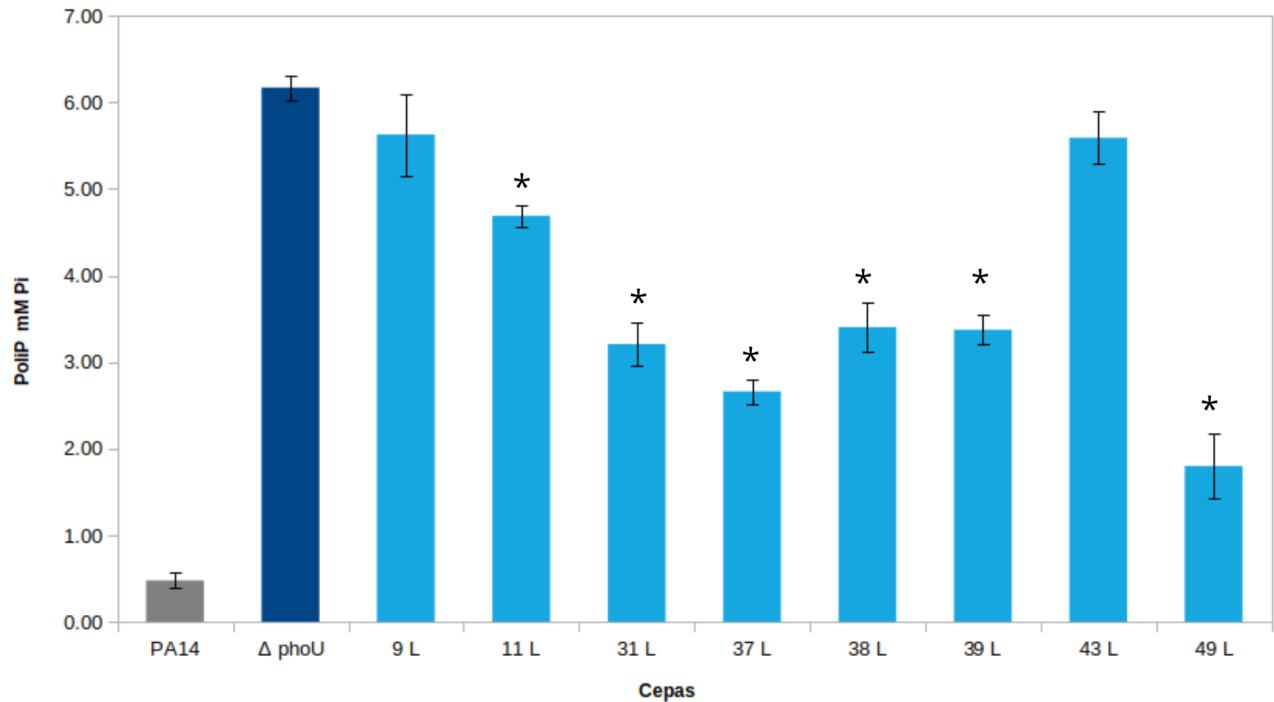


Figura 14 – Acúmulo de poliP pelos mutantes supressores LAP Os resultados correspondem a média de três experimentos para todos os mutantes supressores LAP e nove para as cepas controle PA14 e $\Delta phoU$. As barras de erro representam o erro padrão da média. *representa diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao mutante $\Delta phoU$ no teste *t* de Student.

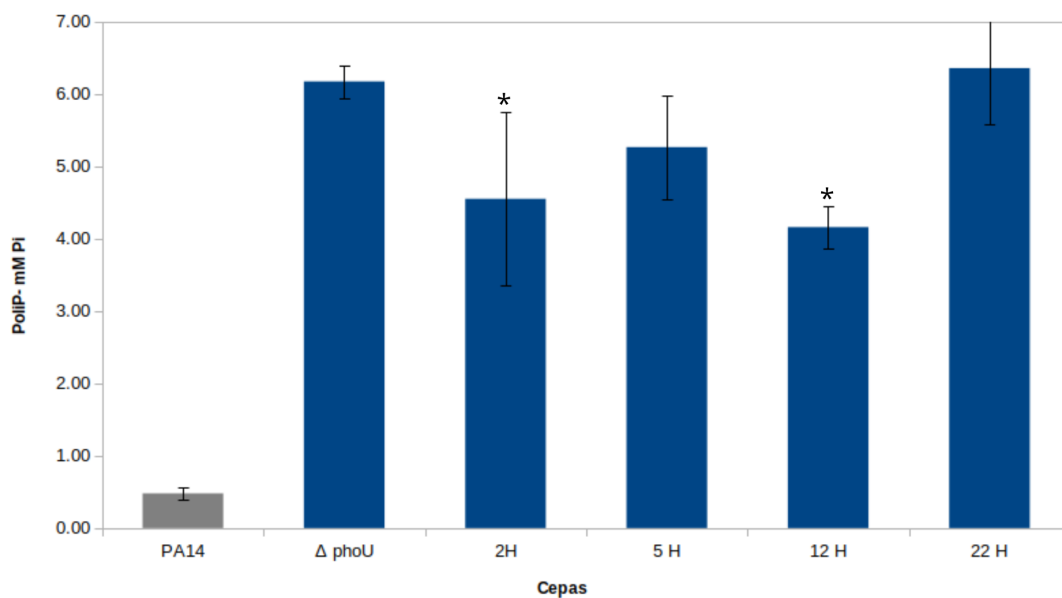


Figura 15 – Acúmulo de poliP pelos mutantes supressores HAP Os resultados correspondem a média de três experimentos para todos os mutantes supressores HAP e nove para as cepas controle PA14 e $\Delta phoU$. As barras de erro representam o erro padrão da média. *representa diferença significativa ($p < 0,01$) em relação ao mutante $\Delta phoU$ no teste *t* de Student

3.5 Nível de FA dos mutantes supressores

Quando em carência de Pi, o regulon PHO é desreprimido, aumentando significativamente a atividade da FA. Este aumento pode ser detectado a partir de um simples ensaio enzimático utilizando o substrato pNPP, conforme descrito na [subseção 2.7](#). Em experimentos realizados anteriormente no nosso laboratório com a bactéria *P. aeruginosa*, mesmo quando cultivada em meio carente em Pi, não era possível detectar a atividade da FA da cepa selvagem.

O estudo realizado por [Neznansky et al. \(2014\)](#) obteve resultados satisfatórios na medição da atividade da enzima FA na cepa PA01 de *P. aeruginosa*, utilizando um meio de cultura um pouco distinto do meio HGP, que é o meio de cultura definido utilizado para o cultivo de *P. aeruginosa* em nosso laboratório ([subseção 2.2](#)). Com base neste estudo foi concluído por [ALMEIDA \(2019\)](#) que a suplementação de 50 μM de FeCl_3 e 6 mM de MgSO_4 ao meio HGP melhora de forma significativa a detecção da atividade de FA. Diferentemente do protocolo de [Neznansky et al. \(2014\)](#), foi constatado que a adição de clorofórmio não é necessária, sendo assim, no protocolo atual não há adição de CHCl_3 . É por esse motivo que, em todos os ensaios realizados neste trabalho, foi utilizado meio HGP suplementado com 50 μM de FeCl_3 e 6 mM de MgSO_4 . Para os ensaios de FA, as bactérias foram cultivadas nos meios HGP0.1MgFe e HGP1MgFe, que contém, respectivamente, 0,1 mM e 1 mM de Pi. As principais diferenças do protocolo de medição de FA utilizado por [\(56\)](#), o protocolo anteriormente utilizado no nosso laboratório e o atual estão descritos na [Table 2](#).

Referência	pNPP	Clorofórmio	Cloreto de Ferro	Sulfato de magnésio	Centrifugação
Técnica anterior	0,9 mg/ml	-	2 μM	-	-
Neznansky et al. (2014)	133,1 mg/ml	+	50 μM	-	2.200 rpm
Técnica atual	0,9 mg/ml	-	50 μM	6 mM	10.000 rpm

Tabela 2 – Comparação entre os métodos para a detecção da atividade de FA. O processo de centrifugação refere-se à separação do pellet bacteriano e do sobrenadante, realizado antes da medição da absorbância em 410 nm.

De modo geral, a atividade da FA dos mutantes NAP é muito baixa, tanto em carência como em excesso de Pi ([Figure 16](#)), conforme esperado. Mesmo assim, alguns mutantes - 20N, 21N, 26N, 41N e 42N, apresentaram níveis de FA mais altos que os demais. Diferentemente das demais cepas, o mutante 26N apresentou atividade de FA mais alta em excesso do que em carência de Pi. De qualquer forma, ficou claro que a maioria dos mutantes NAP não produz FA em resposta à carência de Pi no meio, e tampouco expressam a FA constitutivamente, como a cepa ancestral ΔphoU . Esse tipo de comportamento é típico de mutantes que carregam um defeito no sistema de dois componentes

PhoB-PhoR. O fato do mutante 26N apresentar maior atividade de FA em excesso de Pi sugere que este carrega uma mutação nula em *phoR*, conforme observado para o mutante $\Delta phoR$ de *E. coli* (57). Os demais mutantes supressores possuem, provavelmente, mutações em *phoB*, pois não apresentam indução da atividade de FA em carência de Pi.

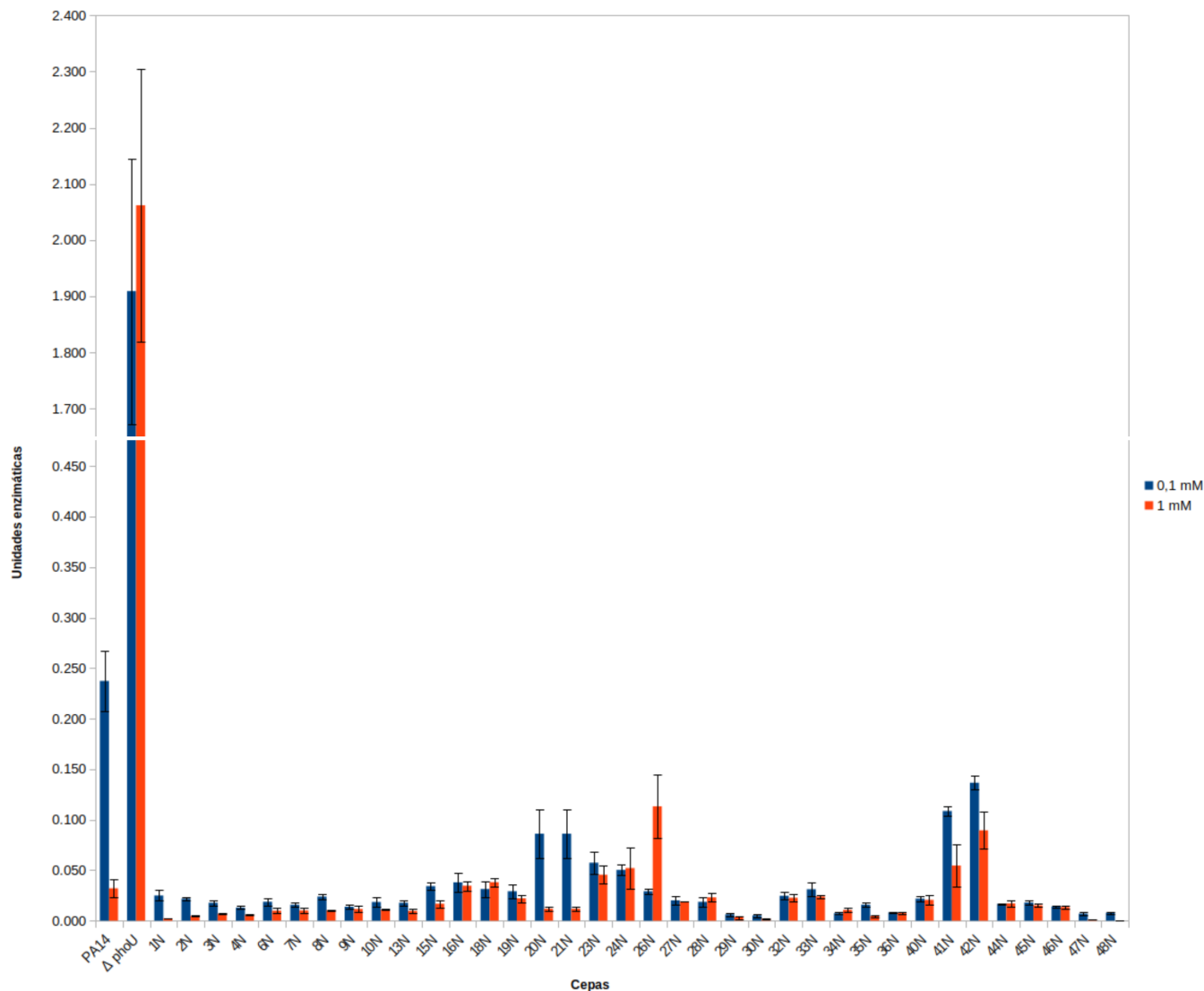


Figura 16 – Atividade da FA dos mutantes supressores NAP. Bactérias foram cultivadas no meio HGP0.1MgFe e em HGP1MgFe, quando em carência e suficiência de Pi, respectivamente, e ensaiadas para a atividade de FA. Cada coluna representa a média de 3 culturas independentes (no caso dos mutantes supressores) ou 20 culturas independentes (no caso das cepas PA14 e $\Delta phoU$). As barras de erro representam o erro padrão da média.

A [Figure 17](#) apresenta o nível da FA dos mutantes supressores caracterizados como LAP em estado de carência e suficiência de Pi. Conforme observado no gráfico, a atividade de FA dos supressores LAP não é constitutiva, pois todos os mutantes apresentam aumento da atividade da FA em carência de Pi e quando em suficiência de Pi a atividade da FA é discreta. Isso vale até mesmo para os mutantes

39L, 43L e 49L, que mostraram uma atividade de FA inferior a da cepa selvagem PA14. Houve, portanto, restauro da repressão do regulon PHO em suficiência de Pi. Por outro lado, é importante lembrar que todos os mutantes LAP apresentaram colônias com coloração azulada em placas de HGP com excesso de Pi, o que sugere uma atividade de FA mais alta do que na cepa selvagem, ao menos nestas condições. Estranhamente, essa atividade não é sempre notada nos ensaios quantitativos de FA com bactérias cultivadas em meio líquido, por este motivo decidimos ensaiar o nível da FA em excesso de Pi a partir de colônias e comparar com o nível da FA a partir de culturas (Ver [subseção 3.5.1](#)). Segundo [Hirota et al. \(2013\)](#), mutantes LAP carregam mutações pontuais na porção C-terminal de PhoB e apresentam atividade de FA 20 a 40 vezes menor em relação aos mutantes HAP, em excesso de Pi. Não foi medida a FA em carência de Pi.

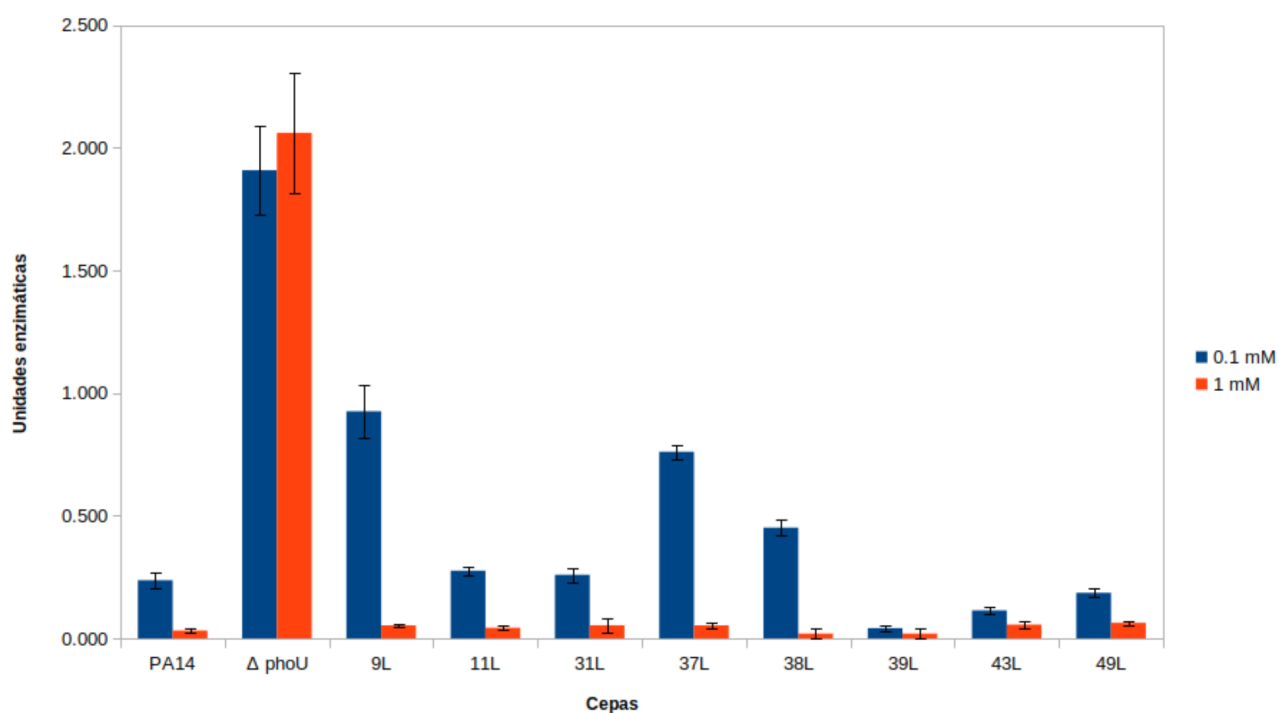


Figura 17 – Atividade da FA dos mutantes supressores LAP. Bactérias foram cultivadas no meio HGP0.1MgFe e em HGP1MgFe, quando em carência e suficiência de Pi, respectivamente, e ensaiadas para a atividade de FA. Cada coluna representa a média de 3 culturas independentes (no caso dos mutantes supressores) ou 20 culturas independentes (no caso das cepas PA14 e $\Delta phoU$). As barras de erro representam o erro padrão da média.

Conforme mostrado na [Figure 18](#), os mutantes HAP apresentam atividade constitutiva da FA, tanto em carência como em excesso de Pi, similar à apresentada pela cepa ancestral $\Delta phoU$. O mutante 22H apresentou uma atividade de FA 2 vezes maior em carência de Pi, mostrando uma diferença significativa ($p=0,015$) no teste *t* de Student. Assim como a cepa ancestral $\Delta phoU$, todos os mutantes

HAPs mostram atividade constitutiva da FA.

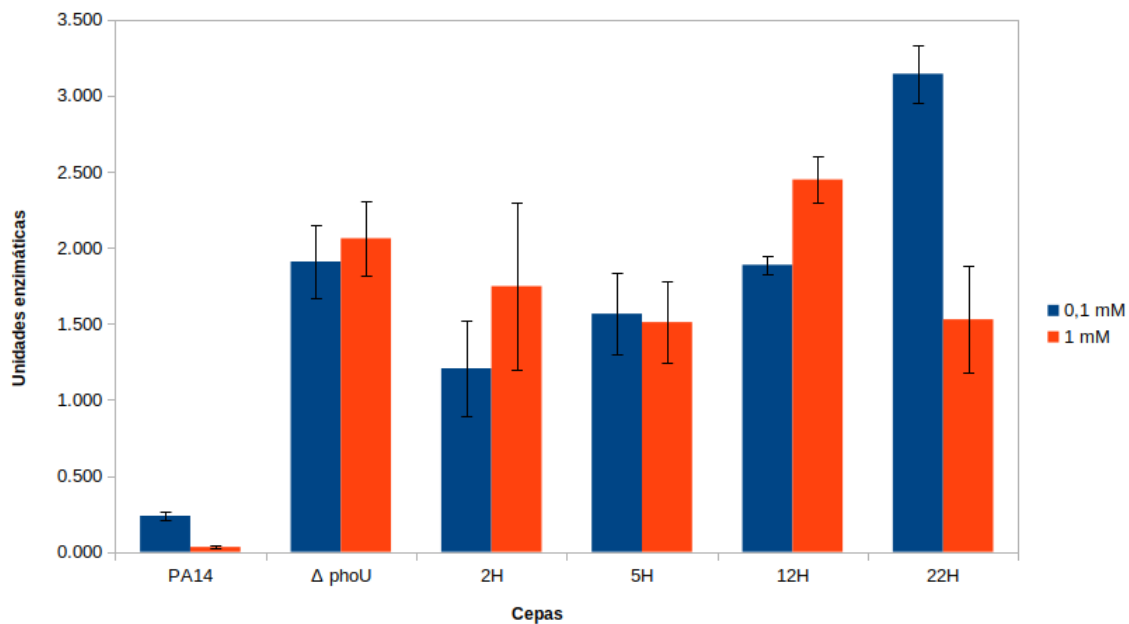


Figura 18 – Atividade da FA dos mutantes supressores HAP. Bactérias foram cultivadas no meio HGP0.1MgFe e em HGP1MgFe, quando em carência e suficiência de Pi, respectivamente, e ensaiadas para a atividade de FA. Cada coluna representa a média de 3 culturas independentes (no caso dos mutantes supressores) ou 20 culturas independentes (no caso das cepas PA14 e $\Delta phoU$). As barras de erro representam o erro padrão da média.

3.5.1 Comparação da atividade da FA a partir de culturas líquidas e de colônias

Os mutantes LAP apresentam colônias azuladas quando plaqueados em HGP6MgFe contendo o substrato XP, indicando elevada atividade da FA (ver [Figure 6](#)). Porém quando realizado o ensaio enzimático quantitativo com o substrato pNPP não foi observado uma alta atividade da enzima, sendo o nível da atividade similar ao da cepa selvagem (ver [Figure 17](#)).

Visando explicar a contradição encontrada, decidimos realizar o ensaio quantitativo a partir de colônias e contrapor com os resultados obtidos a partir de culturas. Ambos os ensaios foram efetuados em meio HGP6MgFe (meio líquido e meio sólido), pois desta maneira é possível confrontar os resultados. As bactérias das colônias foram suspensas em solução salina em uma concentração de aproximadamente 1 DO₆₀₀. As culturas líquidas foram diluídas para esta concentração também.

Conforme mostra a [Figure 19](#), a atividade enzimática do mutante $\Delta phoU$ cultivado em placa é 5,6 vezes maior do que quando cultivado em meio líquido. A diferença da atividade da FA é notória, porém não foi considerada significativa no teste *t* de Student ($p=0,07$), este fato pode ser explicado, provavelmente, pelo pequena amostragem ($n = 3$) e alto valor do erro padrão obtido no ensaio realizado a partir de colônias. Em relação ao mutante supressor LAP (11L), a atividade enzimática da FA é 7,2 vezes maior quando a mensuração é realizada a partir da colônia, revelando que a produção da

enzima é maior nessa condição de cultivo. Esse dado explica porque os mutantes LAP apresentam colônias azuladas, mas falham em apresentar alta atividade de FA quando cultivados em meio líquido. O mecanismo por trás da discrepância entre as diferentes condições de cultivo é desconhecido, mas merece ser investigado.

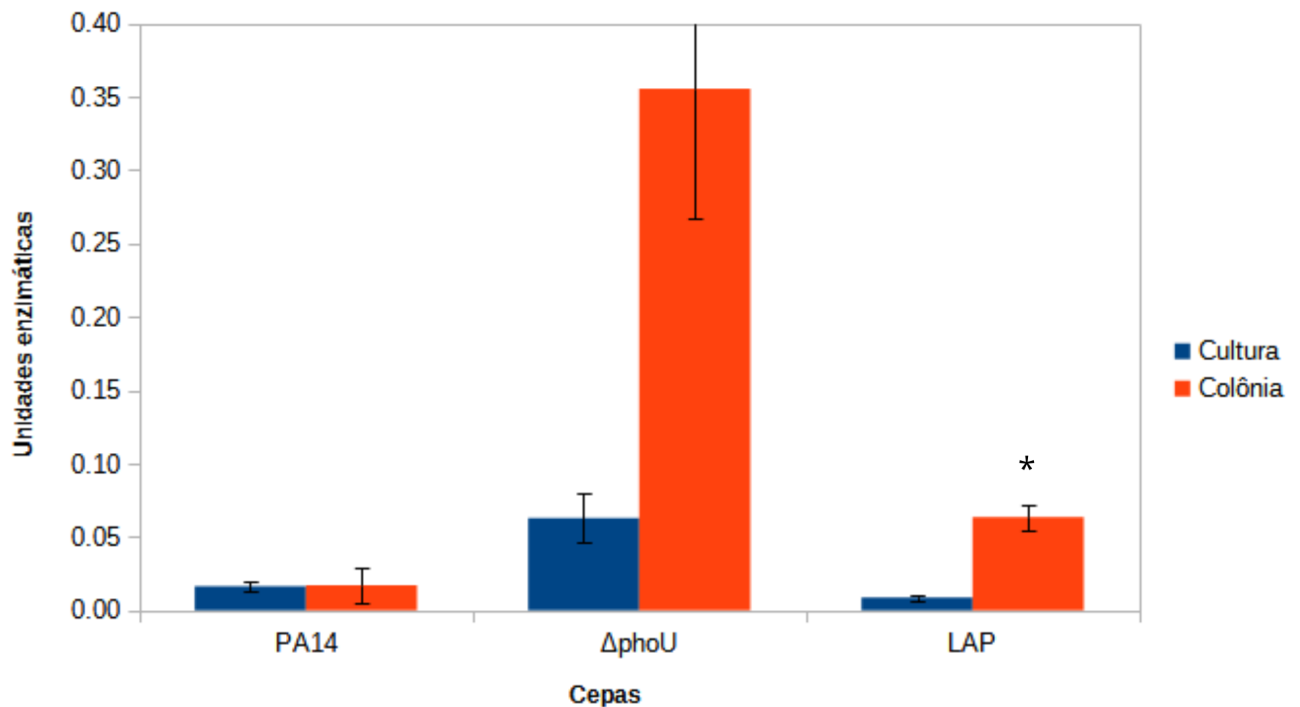


Figura 19 – Mensuração da atividade da FA a partir da cultura e da colônia Bactérias foram cultivadas no meio HGP6MgFe e as colônias foram ressuspendidas em 200 μ l de solução salina 0,9%. As suspensões bacterianas foram diluídas para $DO_{600} = 1$ em solução salina 0,9%, a fim de obter quantidades similares de bactérias para o experimento. Cada coluna representa a média de 3 culturas independentes. As barras de erro representam o erro padrão da média. *representa diferença significativa ($p=0,019$) em relação ao mutante LAP quando ensaiado a partir da cultura no teste t de Student.

3.6 Identificação das mutações supressoras

Mutações compensatórias do mutante $\Delta phoU$ de *E. coli* são encontradas no operon *pst* ou nos genes *phoB* - *phoR* (41, 38). A fim de identificar as mutações presentes nos mutantes supressores foi realizado o sequenciamento dos possíveis genes afetados. Mutações no gene *phoB* (tanto na região promotora, como na ORF do gene) resultam na redução da expressão de todos os genes do regulon PHO. Treze mutantes supressores NAP - 1N, 3N, 6N, 7N, 8N, 9N, 13N, 18N, 27N, 32N, 34N, 40N e 44N- foram sequenciados. A [Table 3](#) mostra as três mutações encontradas, no gene *phoB*. Essas mutações causaram, supostamente, a inatividade ou inexpressão de *phoB*. Os mutantes NAP não descritos na tabela, não apresentaram mutações na ORF de *phoB* ou em sua sequência regulatória.

Conforme descrito por [Hirota et al. \(2013\)](#), os mutantes LAP derivados da cepa $\Delta phoU$ de *E. coli* carregam mutações pontuais do tipo *missense* no domínio de ligação ao DNA em *PhoB*, causando uma atenuação na expressão dos genes pertencentes ao regulon PHO. Portanto, a região promotora e a ORF de *phoB* de sete mutantes supressores - 11L, 31L, 37L, 38L, 39L, 43L e 49L - foram sequenciadas. Surpreendentemente, nenhum dos mutantes citados evidenciou uma alteração na região sequenciada. Outra possibilidade seria a de que os mutantes LAP tivessem mutações em um dos genes do operon *pst* ou em seu promotor de forma que estas aliviassem parcialmente o influxo de Pi, exacerbado pelo nocaute de *phoU*. O gene *pstS* de três mutantes LAP - 11L, 39L e 49L- incluindo a sua região promotora, foi sequenciado. A [Table 4](#) mostra as mutações encontradas no promotor ou na ORF de *pstS* dos mutantes 11L e 49L. O mutante 49L, que carrega a inserção de uma citosina resultando na alteração do quadro de leitura e no surgimento de um códon de parada prematuro, apresentou a mais baixa taxa de remoção de Pi e de acúmulo de poliP, de todos os mutantes LAP. Por outro lado, a substituição encontrada no mutante 11L pode estar causando uma diminuição na taxa de Pi consumido pela célula. Na sequência de *pstS* do mutante 39L não foi encontrada nenhuma mutação.

Tabela 3 – Mutações supressoras em *phoB*. Mutantes NAP tiveram o gene *phoB* sequenciado e alinhado com o gene *phoB* da cepa ancestral $\Delta phoU$.

Cepa supressora	Tipo de mutação	Posição no DNA*	Troca de aminoácido
1N	Inserção	327insAGGGCG	89insGlyGlu
27N	Substituição	G409T	112 Glu → Asp
32N	Substituição	AG(-20/-21)CC	-

*Em relação à sequência de *phoB* disponível na [subseção 5.1](#)

Tabela 4 – Mutações supressoras em *pstS*. Mutantes LAP tiveram o gene *pstS* sequenciado e alinhado com o gene *pstS* da cepa ancestral $\Delta phoU$.

Cepa supressora	Tipo de mutação	Posição no DNA*	Troca de aminoácido
11L	Substituição	G367C	Aspartato125Histidina
49 L	Inserção	246insC	Sem sentido

*Em relação à sequência de *pstS* disponível na [subseção 5.2](#)

Em todos os ensaios fenotípicos, os mutantes HAP apresentaram grande similaridade com o mutante $\Delta phoU$. Por hora, foi sequenciado o gene *pstS* de mutantes HAP, mas nenhuma mutação foi encontrada.

3.7 Efeito das mutações compensatórias sobre a virulência de *P. aeruginosa*

Para estudar o efeito das mutações supressoras de $\Delta phoU$ sobre a virulência de *P. aeruginosa*, foi escolhido um representante de cada classe de mutantes supressores (NAP, LAP e HAP), uma vez que os experimentos de virulência são bastante complexos e seria impraticável experimentar com todos os mutantes isolados.

O regulon PHO influencia a virulência de diversas espécies bacterianas. A introdução de uma mutação nula na ORF do gene *phoU* em *P. aeruginosa* reduziu em aproximadamente 90% a virulência bacteriana, conforme demonstrado por ALMEIDA (2019). Para avaliar o efeito das mutações compensatórias sobre a virulência do mutante $\Delta phoU$ de *P. aeruginosa*, foi utilizado o modelo de larvas de *Galleria mellonella*. Em cada experimento, 50 larvas foram infectadas com 100 UFCs da cepa selvagem, do mutante $\Delta phoU$, e dos supressores 27N (NAP), 11L (LAP) ou 2H (HAP).

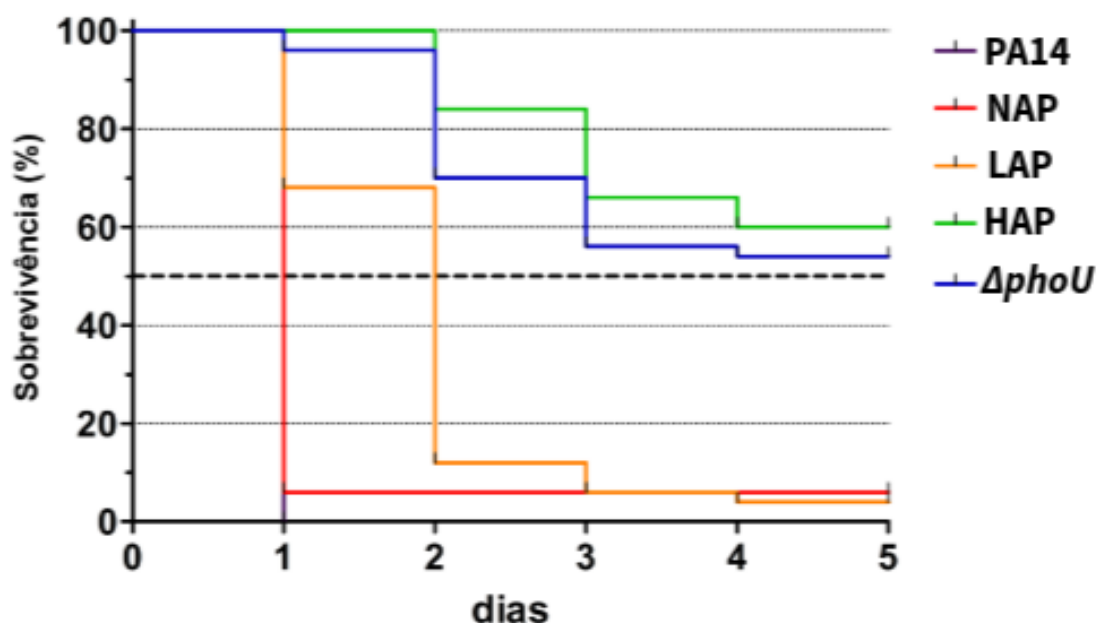


Figura 20 – Sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella* infectadas com bactérias das cepas PA14, $\Delta phoU$, e com mutantes supressores HAP, LAP e NAP. As bactérias foram cultivadas em meio HGP6MgFe por 24 horas a 37°C. Posteriormente, as culturas foram lavadas duas vezes com solução salina 0,9%, diluídas, e 100 UFCs de cada uma das cepas foram injetadas em cada larva.

Conforme mostrado na [Figure 20](#), a cepa PA14 matou 100% das larvas infectadas em 24 h. Já o mutante $\Delta phoU$ matou menos de 10% das larvas neste mesmo período e, ao final de cinco dias,

um pouco menos de 50% das larvas infectadas com esta cepa foram mortas. O mutante NAP matou aproximadamente 94% das larvas de *Galleria mellonella* em 1 dia de infecção, mas 6% das larvas infectadas permaneceram vivas, até o final do experimento. O mutante LAP apresentou um nível de virulência intermediário, sendo capaz de matar em torno de 30% da população infectada após 24 horas, e 88% das larvas após 48 h. Já o mutante HAP apresentou virulência similar a da cepa ancestral $\Delta phoU$, sendo que, no final do 5º dia, 60% das larvas haviam sobrevivido. Podemos concluir, portanto, que entre os efeitos pleiotrópicos causados pela deleção do gene *phoU*, há também redução significativa da virulência, sendo esta restaurada parcialmente pela presença de mutações compensatórias.

3.8 Efeito das mutações supressoras sobre a motilidade *Swarming*

Há uma interessante relação entre a motilidade *swarming* e o regulon PHO. Foi demonstrado por [Blus-Kadosh et al. \(2013\)](#) que quando em carência de Pi, a cepa selvagem PA01 de *P. aeruginosa* apresenta um aumento na motilidade do tipo *swarming*, porém quando cultivada em suficiência de Pi, a motilidade é reduzida de modo significativo. O mutante $\Delta pstS$ de PA01 apresentou o fenótipo de hiper-*swarming*, tanto em carência como em suficiência de Pi e, quando complementado com um plasmídeo que carrega *pstS*⁺, o fenótipo selvagem foi restaurado. Diferentemente do observado em relação ao mutante $\Delta pstS$, a deleção de *phoB* causa a perda total da capacidade de *swarming*. Estima-se que a deleção de *pstS* faz com que a bactéria perca a capacidade de adquirir Pi através do transportador Pst, causando um constante estado de carência de Pi, aumentando a motilidade celular a fim de auxiliar a bactéria em sua busca por este nutriente. No mutante $\Delta phoB$ não há ativação do sistema Pst, mesmo em ambientes com baixa disponibilidade deste nutriente. Sendo assim, as bactérias não entram em estado de carência de Pi, e, conseqüentemente, não recebem o sinal para se deslocarem para outros ambientes. Logo, a motilidade tipo *swarming* não ocorre neste mutante. Por outro lado, foi demonstrado por [ALMEIDA \(2019\)](#) que o nocaute do gene *phoU* afeta negativamente o *swarming* de *P. aeruginosa*. Usando a mesma lógica acima, o mutante $\Delta phoU$ super-expressa o transportador Pst, não havendo necessidade, portanto, de incrementar a motilidade para buscar fontes alternativas de Pi.

Para testar o efeito das mutações compensatórias derivadas de $\Delta phoU$, foram realizados ensaios de *swarming* com os mutantes representativos. Na [Figure 21](#) é possível observar que a cepa $\Delta phoU$

reduz drasticamente a capacidade de locomover-se sobre o meio semissólido quando comparado com a cepa selvagem PA14. O mutante HAP 2H apresentou fenótipo similar ao do mutante $\Delta phoU$, ao passo que o mutante LAP 11L mostrou um aumento considerável na motilidade, mas ainda bastante aquém daquele apresentado pela cepa selvagem. O mutante NAP 27N reverteu completamente o efeito negativo causado pela deleção do gene *phoU* sobre a motilidade *swarming*. Estes resultados contradizem o observado por [Blus-Kadosh et al. \(2013\)](#), que demonstraram que mutações em *phoB* causam uma perda completa da motilidade *swarming*. Ainda, era de se esperar que o mutante NAP não restaurasse a motilidade *swarming*, tendo em vista que a mutação *phoB* é epistática sobre $\Delta phoU$. Entretanto observamos que a mutação compensatória em *phoB* restaura a motilidade perdida pela deleção de *phoU*.

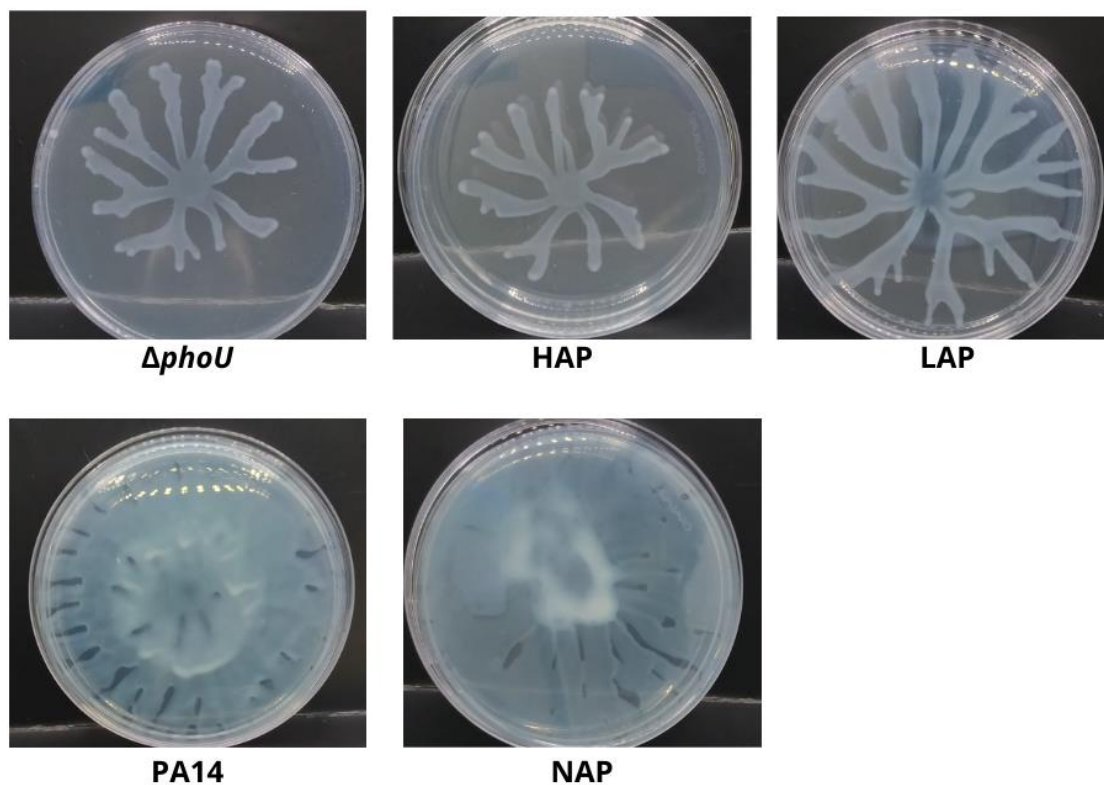


Figura 21 – Efeito das mutações supressoras sobre a motilidade *swarming*. Alíquotas de bactérias cultivadas em meio LB foram aplicadas no centro da placa de meio Swarming ([subseção 2.10](#)). As placas foram mantidas a 37°C por 16 horas e fotografadas. Cada imagem é representativa de 4 placas independentes.

3.9 Efeito das mutações supressoras de $\Delta phoU$ sobre a produção de pigmentos

A síntese dos pigmentos piocianina e pioverdina é regulada, tal como a motilidade do tipo *swarming*, pelo sistema de *quorum sensing* (3). Uma vez que a deleção do gene *phoU* apresenta um efeito negativo sobre a motilidade *swarming*, sendo aliviado pela presença de mutações compensatórias, decidimos avaliar se a deleção de *phoU*, assim como as mutações supressoras, afetam a produção de piocianina. Conforme mostrado na [Figure 22](#), a produção de piocianina pela cepa selvagem PA14 é, em média, 2 vezes maior quando comparada com o mutante $\Delta phoU$. Assim como observado em relação ao *swarming*, a mutação supressora adquirida pelo mutante NAP restaurou a produção de piocianina. As mutações compensatórias adquiridas pelo mutante LAP e HAP não apresentaram efeito sobre a produção do pigmento, sendo similar ao apresentado pela cepa $\Delta phoU$.

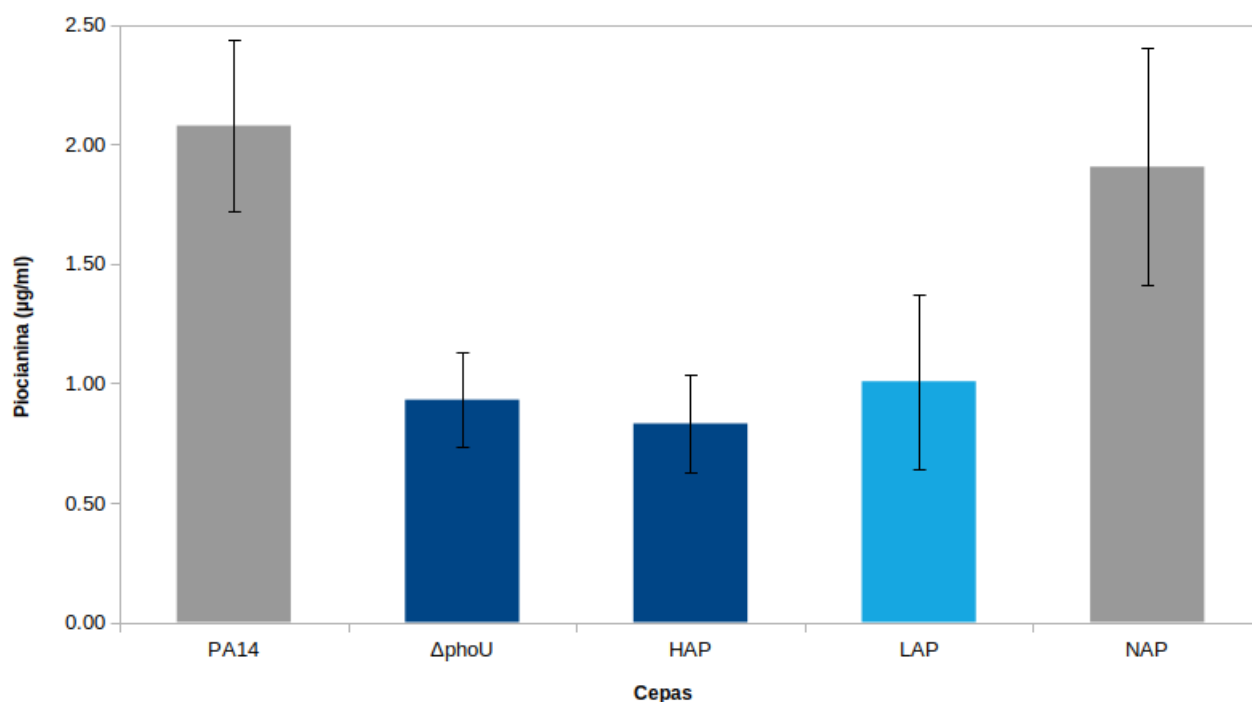


Figura 22 – Produção de piocianina nos mutantes de *P. aeruginosa*. As bactérias foram cultivadas em meio HGP6MgFe por 24 horas, quando a piocianina foi extraída conforme descrito na seção 2.11. O resultado apresentado é a média de três ensaios e as barras de erro representam o erro padrão da média.

Para avaliar se a mutação $\Delta phoU$ afeta a síntese da pioverdina, a produção deste metabólito foi mensurada e contraposta com os níveis de pioverdina produzidos pela cepa PA14 e pelos mutantes supressores selecionados. A [Figure 23](#) mostra que a deleção do gene *phoU* reduz em aproximadamente 1/4 a síntese de pioverdina em comparação com a cepa selvagem PA14. Os mutantes LAP e HAP

não mostraram diferença estatisticamente significativa quando comparados com a cepa $\Delta phoU$. Já o mutante NAP apresentou uma melhora no nível de produção da pioverdina de, aproximadamente, 1,3 vezes em relação ao mutante $\Delta phoU$, igualando-se à cepa selvagem PA14.

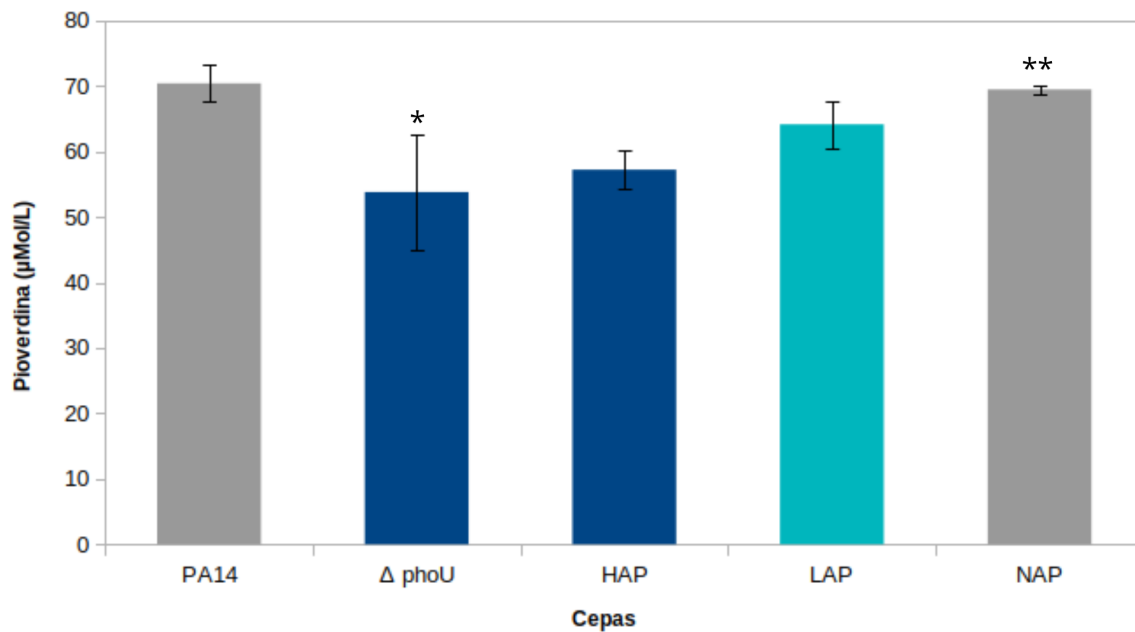


Figura 23 – Produção de pioverdina nos mutantes de *P. aeruginosa* As bactérias foram cultivadas em HGP6MgFe por 24 horas e a quantidade de pioverdina produzida foi mensurada. O resultado apresentado é a média de três ensaios e as barras de erro representam o erro padrão da média. *representa diferença significativa ($p= 0,022$) em relação a cepa PA14 **representa diferença significativa ($p= 0,027$) em relação ao mutante $\Delta phoU$ no teste *t* de Student.

4 Discussão

Até o presente momento, mutações compensatórias da deleção $\Delta phoU$ foram estudadas apenas em *E. coli*. Foi descrito por Steed e Wanner (1993) que o mutante $\Delta phoU$ de *E. coli* acumula rapidamente mutações supressoras durante o seu crescimento. Essas mutações foram encontradas no operon *pstSCAB-phoU* ou no operon *phoBR*. Eles também demonstraram que a deleção de um dos genes *pst* alivia o crescimento defeituoso de $\Delta phoU$. Logo, o crescimento defectivo ocorre pela síntese de um transportador Pst funcional na ausência de PhoU, que resulta em um alto influxo de Pi e na perturbação da homeostase desta molécula. O estudo realizado por Hirota et al. (2013) mostrou que mutações compensatórias em *pstS* e em *phoB* (tanto na região promotora como na ORF) são capazes de aliviar, de forma expressiva, o crescimento defeituoso de $\Delta phoU$ em *E. coli*, reforçando o resultado apresentado por (52). *P. aeruginosa* remove Pi e acumula poliP em quantidades muito maiores que *E. coli* (59), razão pela qual seria muito interessante analisar a origem de mutações compensatórias de $\Delta phoU$ nesta bactéria. É o que o presente trabalho se dispôs a fazer.

O mutante $\Delta phoU$ de *P. aeruginosa* apresenta um rendimento celular significativamente menor do que a cepa selvagem PA14 (40). Neste trabalho, observamos que mutantes NAP e LAP foram capazes de restaurar, total ou parcialmente, o rendimento celular do mutante $\Delta phoU$. Porém, este fenótipo não foi observado para todos os mutantes supressores. Um dos motivos para isso seria o erro estatístico observado em várias culturas do mesmo mutante. É bem possível que, na maioria dos casos, a repetição dos ensaios de quantificação de UFC tenderia a diminuir o erro e, conseqüentemente, demonstrar que todos os mutantes NAP e LAP apresentam rendimento maior quando comparados com a cepa ancestral. É notório que ensaios de medição de UFC são propensos a erros, dada as várias diluições que devem ser realizadas para cada amostra individualmente. Uma alternativa seria medir a densidade óptica das culturas. Isso foi feito, mas durante este estudo, notamos que a correlação entre DO_{600} e UFC/ml varia de acordo com a cepa. Ou seja, o mutante *phoU* e seus derivados apresentam correlações $\frac{UFC/ml}{DO_{600}}$ distintas da cepa selvagem PA14 e entre eles também. Acreditamos que isso seja devido ao acúmulo de poliP, que refrataria a luz monocromática incidente sobre a cultura, distorcendo, assim, a relação entre a DO_{600} e a concentração de bactérias em uma suspensão.

Cepas com mutações nulas em *phoU* de *E. coli* e de *P. aeruginosa* captam muito mais Pi do meio do que as respectivas cepas selvagens (40, 38), enquanto que mutações nos demais genes *pst* (*pstS*, *pstC*, *pstB*, *pstA*) inibem quase que por completo a captação de Pi pelo transportador Pst (60, 61).

Ao entrar na célula, Pi é assimilado na forma de ATP, que por sua vez, age como agente quelante de Mg^{2+} , perturbando a homeostase deste importante cátion (62). Uma forma que bactérias encontraram para lidar com o excesso de Pi, foi o de precipitá-lo em grânulos de poliP no interior de vesículas, as chamadas "volutinas". Porém, na ausência de PhoU, a captação exagerada de Pi via Pst, resulta em um patamar de toxicidade ainda maior. Este fenômeno prejudica o crescimento bacteriano favorecendo a seleção de mutações nos genes regulatórios de PHO. Mutações compensatórias no gene *phoB* reduzem fortemente a expressão do regulon PHO e, conseqüentemente, do transportador Pst. Em *E. coli*, todos os mutantes NAP caracterizados apresentam mutações supressoras em *phoB*, que resultam na incapacidade de expressar os genes do regulon PHO, mesmo em carência de Pi. Já em *P. aeruginosa*, foram sequenciados 13 mutantes NAP, mas somente em 3 deles foram encontradas mutações em *phoB* (ver Table 3). É possível que os demais mutantes carreguem mutações no gene *phoR*, uma vez que mutações nulas neste gene apresentam baixo nível de FA, que não é induzível pela carência de Pi (63). Seria interessante sequenciar o gene *phoR* destas cepas.

Em relação aos mutantes LAP, o gene *phoB* foi sequenciado porém nenhuma mutação supressora foi encontrada, por isso decidimos sequenciar o gene *pstS* mesmo sabendo que, com a exceção de um mutante, estes mutantes captam quantidades altas de Pi. Inesperadamente, encontramos dois supressores com mutações compensatórias em *pstS*. O mutante 49L apresentou uma inserção ainda no começo da ORF de *pstS*, que resulta no surgimento de uma mutação *nonsense* e a conseqüente a interrupção da síntese desta proteína. Não é surpreendente, portanto, que este mutante é o que capta menos Pi e acumula menos poliP dentre todos os LAPs, porém, mesmo captando menos Pi, o rendimento deste mutante, em cultura líquida, não foi melhorado em relação a cepa $\Delta phoU$. Já o mutante 11L carrega uma substituição Asp \rightarrow His na ORF de *pstS*. Aspartato possui carga negativa, ao passo que histidina é carregada positivamente. Essa troca, teve, aparentemente, um pequeno, porém, significativo efeito sobre o transporte de Pi via Pst, resultando em um menor acúmulo de poliP. Neste trabalho, o consumo de Pi e o nível de poliP foram medidos somente após o crescimento *overnight*. É possível que este mutante e o mutante 9L, que capta Pi tanto quanto a cepa ancestral $\Delta phoU$, e apresentam um rendimento similar a cepa selvagem, manifestem uma taxa de remoção de Pi mais lenta, permitindo um crescimento melhorado. Esta hipótese poderá ser testada em uma curva de crescimento na qual as bactérias seriam ensaiadas não somente para o crescimento, mas também para a remoção de Pi ao longo do experimento. Os demais mutantes LAP, apesar de consumirem

menos Pi do meio, não apresentaram melhora do crescimento e tampouco a mutação compensatória foi localizada.

Os mutantes HAP de *P. aeruginosa* apresentaram fenótipos similares aos da cepa ancestral $\Delta phoU$ – alto nível de remoção de Pi, grande acúmulo de poliP e alta atividade de FA. Esses mutantes, bem como todos os demais supressores, foram isolados após três cultivos consecutivos em meio rico, seguido de plaqueamento em meio HGP +XP. Foi presumido que após esse período de adaptação, seriam selecionadas cepas com mutações compensatórias, de forma que essas tivessem varrido a população original de mutantes $\Delta phoU$. Porém, os resultados sugerem que os isolados classificados como HAP não apresentam mutações compensatórias. De fato, segundo [Hirota et al. \(2013\)](#), mutantes HAP não acumulam poliP, diferentemente do que foi observado neste trabalho. Os HAPs isolados em *E. coli* carregam mutações no promotor de *pstS*, já os HAPs aqui sequenciados, não apresentaram mutações neste locus. Portanto, acreditamos que os nossos HAPs não carregam qualquer tipo de mutação compensatória, sendo idênticos à cepa ancestral.

Os mutantes NAP apresentaram o fenótipo esperado – baixo acúmulo de poliP e baixa atividade de FA. Em três mutantes NAP foram encontradas mutações na ORF de *phoB* ou na região regulatória deste gene. Em outros 13 NAPs sequenciados, não foi encontrada nenhuma mutação em *phoB*. É possível que estes supressores carreguem mutações em *phoR* capaz de inativar ou reduzir de forma expressiva a atividade de todo o regulon PHO. O gene *phoR* destes mutantes ainda não foi sequenciado.

Dois mutantes LAP - 9L e 11L - mostraram-se ser os mais interessantes de todos, pois crescem tão bem quanto a cepa selvagem, mas acumulam grandes quantidades de poliP, quase igual ao ancestral $\Delta phoU$. Esta seria a cepa ideal a ser utilizada em processos de remoção de excesso de Pi em áreas eutrofizadas ou em processos de tratamento de efluentes. Assim como ocorre com a cepa $\Delta phoU$, o alto acúmulo de poliP presente nos mutantes LAP é decorrente do excesso de Pi captado pelas células, sendo acumulado na forma de grânulos de poliP. Dos sete mutantes LAP sequenciados, dois apresentaram mutações compensatórias na ORF de *pstS*. Estes resultados diferem daqueles encontrados em *E. coli*, em que as mutações compensatórias ocorreram em *phoB*. É interessante notar que, até mesmo a mutação *nonsense* no *pstS* do isolado 49L, reduziu, mas não inativou completamente o transporte via Pst. É possível que Pi continue sendo transportado pelo canal PstC-PstA, ainda que de forma reduzida, mesmo na ausência da proteína ligadora de Pi, PstS.

O mutante 9L, apesar de ser fenotipicamente similar ao 11L, não teve, ainda, o gene *phoB* e *pstS* sequenciado.

Diversos fatores de virulência apresentados por *P. aeruginosa* são ativados via *Quorum Sensing* (QS). O QS consiste principalmente de dois componentes, sendo o primeiro uma molécula auto-indutora que é produzida constitutivamente em baixas concentrações e secretada para o meio, e uma proteína reguladora que ao se ligar à molécula sinalizadora, interage com os promotores dos genes alvos, iniciando a transcrição dos mesmos. A molécula sinalizadora mais utilizada em bactérias Gram - negativas é do tipo homoserina lactona acilada (AHL), sendo a sua síntese mediada por duas famílias de proteínas - LuxI e LuxR. A proteína LuxI é responsável pela síntese da AHL. Ao atingir uma concentração crítica, há a formação de um complexo LuxR-AHL. Este complexo liga-se à regiões promotoras de genes regulados pelo QS, afetando a transcrição destes (64). *P. aeruginosa* apresenta dois sistemas principais de QS, *las* e *rhl*. O sistema *las* é composto pelos genes *lasI* e *lasR*, a proteína LasI sintetiza a molécula indutora N- (3-oxododeca-*o*il)-L-homoserina lactona qual interage com a LasR ativando a transcrição dos genes alvos. Estes genes estão envolvidos no processo de virulência. No sistema *rhl*, o produto do gene *rhlI* sintetiza a molécula indutora N-butil-1-homoserina lactona, que interage com a proteína RhlI e ativa os genes responsáveis por codificar a enzima ramnosil transferase (65). Foi demonstrado por Jensen et al. (2006) que sob escassez de Pi a produção de piocianina aumenta de forma significativa, enquanto que o mutante $\Delta phoB$ não apresenta um aumento na síntese de piocianina sob a mesma condição, indicando que, a produção do pigmento está correlacionada com a presença de PhoB. Além disso, estes autores também chamaram a atenção para a presença de PHO-boxes putativas nos promotores dos genes *rhlR* e *lasR*, indicando que o sistema QS pode ser influenciado pela concentração de Pi no meio. Assim como a produção da piocianina, a síntese de pioverdina também é modulada pelo sistema *las*, tendo em vista que mutações nulas nos genes *lasR* e *lasI* de PA01 reduzem em até duas vezes a produção de pioverdina (66), sugerindo que a síntese de pioverdina também pode ser modulada pela concentração de Pi.

Além da síntese de pigmentos, a motilidade do tipo *swarming* também é influenciada pelo regulon PHO. Quando em carência de Pi, a cepa selvagem PA01 apresenta um aumento na motilidade, já quando o mutante $\Delta phoB$ é cultivado nessas condições, a motilidade não é observada, ao passo que o mutante $\Delta pstS$ apresenta hiper-motilidade tanto em carência como em suficiência de Pi (58). Três fenótipos mediados pelo sistema QS foram avaliados – produção de piocianina e de pioverdina

e a motilidade *swarming*. Ao ensaiar as amostras para os fenótipos mediados por QS, era esperado observar que o mutante NAP 27N (mutação compensatória em *phoB*) não apresentasse uma recuperação dos fenótipos, visto que o gene *phoB* apresenta um efeito epistático sobre o gene *phoU*. Porém o mutante NAP reverteu todos os três fenótipos ao nível da cepa selvagem. Já o mutante LAP (mutação compensatória em *pstS*) não apresentou hipermotilidade, porém há uma melhora quando comparado com cepa $\Delta phoU$, em relação a produção de pigmentos - piocianina e pioverdina- o supressor LAP 11L apresentou fenótipos similares a cepa ancestral, indicando que a mutação adquirida por este mutante não exerceu efeito sobre a produção de pigmentos. Por último, o mutante classificado como HAP apresentou os três fenótipos idênticos ao mutante $\Delta phoU$. Este resultado era esperado tendo em vista que, como descrito anteriormente, nenhuma mutação compensatória foi localizada.

Podemos concluir que a deleção do gene *phoU* afeta os fenótipos mediados por QS, tendo em vista que a deleção deste gene causa um efeito negativo sobre os três fenômenos testados, porém os mutantes supressores apresentaram fenótipos distintos do esperado.

Referências

- 1 SULTAN, M.; ARYA, R.; KIM, K. K. Roles of two-component systems in pseudomonas aeruginosa virulence. *International journal of molecular sciences*, MDPI, v. 22, n. 22, p. 12152, 2021.
- 2 KLOCKGETHER, J. et al. Pseudomonas aeruginosa genomic structure and diversity. *Frontiers in microbiology*, Frontiers Research Foundation, v. 2, p. 150, 2011.
- 3 LAU, G. W. et al. The role of pyocyanin in pseudomonas aeruginosa infection. *Trends in molecular medicine*, Elsevier, v. 10, n. 12, p. 599–606, 2004.
- 4 D'ARGENIO, D. A.; MILLER, S. I. Cyclic di-gmp as a bacterial second messenger. *Microbiology*, Microbiology Society, v. 150, n. 8, p. 2497–2502, 2004.
- 5 KHAN, F. et al. Regulation and controlling the motility properties of pseudomonas aeruginosa. *Applied microbiology and biotechnology*, Springer, v. 104, p. 33–49, 2020.
- 6 SORENSEN, R. U.; KLINGER, J. D. Biological effects of pseudomonas aeruginosa phenazine pigments. *Basic Research and Clinical Aspects of Pseudomonas Aeruginosa*, Karger Publishers, v. 39, p. 113–124, 1987.
- 7 EL-FOULY, M. et al. Biosynthesis of pyocyanin pigment by pseudomonas aeruginosa. *Journal of Radiation Research and Applied Sciences*, Elsevier, v. 8, n. 1, p. 36–48, 2015.
- 8 RECINOS, D. A. et al. Redundant phenazine operons in pseudomonas aeruginosa exhibit environment-dependent expression and differential roles in pathogenicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 109, n. 47, p. 19420–19425, 2012.
- 9 PESCI, E. C. et al. Regulation of las and rhl quorum sensing in pseudomonas aeruginosa. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 179, n. 10, p. 3127–3132, 1997.
- 10 LAMONT, I. L.; MARTIN, L. W. Identification and characterization of novel pyoverdine synthesis genes in pseudomonas aeruginosa. *Microbiology*, Microbiology Society, v. 149, n. 4, p. 833–842, 2003.
- 11 KING, J. V.; CAMPBELL, J. J.; EAGLES, B. A. The mineral requirements for fluorescin production. *Canadian Journal of Research*, NRC Research Press Ottawa, Canada, v. 26, n. 6, p. 514–519, 1948.
- 12 GAO, R.; STOCK, A. M. Biological insights from structures of two-component proteins. *Annual review of microbiology*, Annual Reviews, v. 63, p. 133–154, 2009.
- 13 CHIANG, S. M.; SCHELLHORN, H. E. Evolution of the rpos regulon: origin of rpos and the conservation of rpos-dependent regulation in bacteria. *Journal of Molecular Evolution*, Springer, v. 70, n. 6, p. 557–571, 2010.
- 14 GARDNER, S. G.; MCCLEARY, W. R. Control of the phobr regulon in escherichia coli. *EcoSal Plus*, Am Soc Microbiol, v. 8, n. 2, 2019.
- 15 JIA, R.; ZHAO, Y.; HATTORI, M. Crystal structure of the catalytic atp-binding domain of the phor sensor histidine kinase. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, Wiley Online Library, 2023.

- 16 SPIRA, B. et al. Alternative promoters in the pst operon of escherichia coli. *Molecular Genetics and Genomics*, Springer, v. 284, n. 6, p. 489–498, 2010.
- 17 NIKATA, T. et al. Molecular analysis of the phosphate-specific transport (pst) operon of pseudomonas aeruginosa. *Molecular and General Genetics MGG*, Springer, v. 250, n. 6, p. 692–698, 1996.
- 18 GARDNER, S. G. et al. The phou protein from escherichia coli interacts with phor, pstb, and metals to form a phosphate-signaling complex at the membrane. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 196, n. 9, p. 1741–1752, 2014.
- 19 WANNER, B. L. et al. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, ASM press Washington, DC, v. 1, p. 1357–1381, 1996.
- 20 CHEKABAB, S. M.; HAREL, J.; DOZOIS, C. M. Interplay between genetic regulation of phosphate homeostasis and bacterial virulence. *Virulence*, Taylor & Francis, v. 5, n. 8, p. 786–793, 2014.
- 21 KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Inorganic polyphosphates*, Springer, p. 1–18, 1999.
- 22 ALBI, T.; SERRANO, A. Inorganic polyphosphate in the microbial world. emerging roles for a multifaceted biopolymer. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Springer, v. 32, p. 1–12, 2016.
- 23 MUNÉVAR, N. F. V.; ALMEIDA, L. G. de; SPIRA, B. Differential regulation of polyphosphate genes in pseudomonas aeruginosa. *Molecular Genetics and Genomics*, Springer, v. 292, n. 1, p. 105–116, 2017.
- 24 RAO, N. N.; GÓMEZ-GARCÍA, M. R.; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate: essential for growth and survival. *Annual review of biochemistry*, Annual Reviews, v. 78, p. 605–647, 2009.
- 25 SHARMA, U.; PAL, D.; PRASAD, R. Alkaline phosphatase: an overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, Springer, v. 29, n. 3, p. 269–278, 2014.
- 26 SEBASTIAN, M.; AMMERMAN, J. W. The alkaline phosphatase phox is more widely distributed in marine bacteria than the classical phoa. *The ISME journal*, Nature Publishing Group, v. 3, n. 5, p. 563–572, 2009.
- 27 RAGOT, S. A.; KERTESZ, M. A.; BÜNEMANN, E. K. phod alkaline phosphatase gene diversity in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 81, n. 20, p. 7281–7289, 2015.
- 28 JENSEN, V. et al. Rhlr expression in pseudomonas aeruginosa is modulated by the pseudomonas quinolone signal via phob-dependent and-independent pathways. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 188, n. 24, p. 8601–8606, 2006.
- 29 ECOCYC. <<https://ecocyc.org/>>. Acessado em 31/01/2024.
- 30 MONDS, R. D. et al. Conservation of the pho regulon in pseudomonas fluorescens pf0-1. *Applied and environmental microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 72, n. 3, p. 1910–1924, 2006.
- 31 LEE, S. J. et al. Crystal structure of phou from pseudomonas aeruginosa, a negative regulator of the pho regulon. *Journal of structural biology*, Elsevier, v. 188, n. 1, p. 22–29, 2014.

- 32 LIAO, C. et al. Virulence factors of *Pseudomonas aeruginosa* and antivirulence strategies to combat its drug resistance. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, Frontiers, v. 12, p. 926758, 2022.
- 33 BUCKLES, E. L. et al. Phou enhances the ability of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain cft073 to colonize the murine urinary tract. *Microbiology*, Microbiology Society, v. 152, n. 1, p. 153–160, 2006.
- 34 FERREIRA, G. M.; SPIRA, B. The *pst* operon of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances bacterial adherence to epithelial cells. *Microbiology*, Microbiology Society, v. 154, n. 7, p. 2025–2036, 2008.
- 35 BURALL, L. S. et al. *Proteus mirabilis* genes that contribute to pathogenesis of urinary tract infection: identification of 25 signature-tagged mutants attenuated at least 100-fold. *Infection and immunity*, Am Soc Microbiol, v. 72, n. 5, p. 2922–2938, 2004.
- 36 LAMARCHE, M. G. et al. The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. *FEMS microbiology reviews*, Federation of European Microbiological Societies, v. 32, n. 3, p. 461–473, 2008.
- 37 ZABORINA, O. et al. Structure–function aspects of *psts* in multi-drug–resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS pathogens*, Public Library of Science San Francisco, USA, v. 4, n. 2, p. e43, 2008.
- 38 RICE, C. D. et al. Employment of a promoter-swapping technique shows that *phou* modulates the activity of the *pstscab2 abc* transporter in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 75, n. 3, p. 573–582, 2009.
- 39 MOROHOSHI, T. et al. Accumulation of inorganic polyphosphate in *phou* mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. strain pcc6803. *Applied and environmental microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 68, n. 8, p. 4107–4110, 2002.
- 40 ALMEIDA, L. G. de et al. *phou* inactivation in *Pseudomonas aeruginosa* enhances accumulation of ppgpp and polyphosphate. *Applied and environmental microbiology*, Am Soc Microbiol, v. 81, n. 9, p. 3006–3015, 2015.
- 41 HIROTA, R. et al. Stable polyphosphate accumulation by a pseudo-revertant of an *Escherichia coli phou* mutant. *Biotechnology letters*, Springer, v. 35, n. 5, p. 695–701, 2013.
- 42 RAHME, L. G. et al. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 268, n. 5219, p. 1899–1902, 1995.
- 43 ALMEIDA, L. G. D. *Caracterização do mutante phoU de Pseudomonas aeruginosa*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2019.
- 44 CHEN, P.; TORIBARA, T. t.; WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. *Analytical chemistry*, ACS Publications, v. 28, n. 11, p. 1756–1758, 1956.
- 45 CANADELL, D. et al. Extraction and quantification of polyphosphate in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Bio-protocol*, v. 6, n. 14, p. e1874–e1874, 2016.
- 46 ARAVIND, J.; SARANYA, T.; KANMANI, P. Optimizing the production of polyphosphate from *Acinetobacter towneri*. *Global Journal of Environmental Science and Management*, GJESM Publisher, v. 1, n. 1, p. 63–70, 2015.

- 47 CLARKE, L.; MILLAR, B. C.; MOORE, J. E. Extraction of genomic dna from pseudomonas aeruginosa: a comparison of three methods. *Br J Biomed Sci*, v. 60, n. 1, p. 34–5, 2003.
- 48 CARLSSON, M. et al. Pseudomonas aeruginosa in cystic fibrosis: pyocyanin negative strains are associated with bpi-anca and progressive lung disease. *Journal of Cystic Fibrosis*, Elsevier, v. 10, n. 4, p. 265–271, 2011.
- 49 SHOUMAN, H. et al. Molecular and biological characterization of pyocyanin from clinical and environmental pseudomonas aeruginosa. *Microbial Cell Factories*, Springer, v. 22, n. 1, p. 166, 2023.
- 50 YEOM, J.; PARK, W. Pleiotropic effects of the mioc mutation on the physiology of pseudomonas aeruginosa pao1. *FEMS microbiology letters*, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, v. 335, n. 1, p. 47–57, 2012.
- 51 PEREZ, A. et al. Direct and indirect impact of the bacterial strain pseudomonas aeruginosa on the dissolution of synthetic fe (iii)-and fe (ii)-bearing basaltic glasses. *Chemical Geology*, Elsevier, v. 523, p. 9–18, 2019.
- 52 STEED, P.; WANNER, B. Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the pstscab-phou operon: evidence of a new role for the phou protein in the phosphate regulon. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 175, n. 21, p. 6797–6809, 1993.
- 53 GARDNER, S. G. et al. Genetic analysis, structural modeling, and direct coupling analysis suggest a mechanism for phosphate signaling in escherichia coli. *BMC genetics*, BioMed Central, v. 16, n. 2, p. 1–11, 2015.
- 54 HALDIMANN, A.; DANIELS, L. L.; WANNER, B. L. Use of new methods for construction of tightly regulated arabinose and rhamnose promoter fusions in studies of the escherichia coli phosphate regulon. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 180, n. 5, p. 1277–1286, 1998.
- 55 KULAEV, I. S.; VAGABOV, V.; KULAKOVSKAYA, T. *The biochemistry of inorganic polyphosphates*. [S.l.]: John Wiley & Sons, 2004.
- 56 NEZNANSKY, A. et al. The pseudomonas aeruginosa phosphate transport protein psts plays a phosphate-independent role in biofilm formation. *The FASEB Journal*, Wiley Online Library, v. 28, n. 12, p. 5223–5233, 2014.
- 57 NEVES, H. I. et al. Ugp and pita participate in the selection of pho-constitutive mutants. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 197, n. 8, p. 1378–1385, 2015.
- 58 BLUS-KADOSH, I. et al. The effect of psts and phob on quorum sensing and swarming motility in pseudomonas aeruginosa. *PloS one*, Public Library of Science San Francisco, USA, v. 8, n. 9, p. e74444, 2013.
- 59 KIM, H.-Y. et al. Alginate, inorganic polyphosphate, gtp and ppgpp synthesis co-regulated in pseudomonas aeruginosa: implications for stationary phase survival and synthesis of rna/dna precursors. *Molecular microbiology*, Wiley Online Library, v. 27, n. 4, p. 717–725, 1998.
- 60 VASCONCELOS, F. N. da C.; PADILLA, G.; SPIRA, B. Chromobacterium violaceum adaptation to low-phosphate conditions. *Archives of microbiology*, Springer, v. 198, p. 269–277, 2016.
- 61 RAO, N.; TORRIANI, A. Molecular aspects of phosphate transport in escherichia coli. *Molecular microbiology*, Wiley Online Library, v. 4, n. 7, p. 1083–1090, 1990.

- 62 BRUNA, R. E. et al. Limitation of phosphate assimilation maintains cytoplasmic magnesium homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, National Acad Sciences, v. 118, n. 11, p. e2021370118, 2021.
- 63 WANNER, B. L.; LATTERELL, P. Mutants affected in alkaline phosphatase expression: evidence for multiple positive regulators of the phosphate regulon in escherichia coli. *Genetics*, Oxford University Press, v. 96, n. 2, p. 353–366, 1980.
- 64 VENTURI, V. Regulation of quorum sensing in pseudomonas. *FEMS microbiology reviews*, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, v. 30, n. 2, p. 274–291, 2006.
- 65 PEARSON, J. P.; PESCI, E. C.; IGLEWSKI, B. H. Roles of pseudomonas aeruginosa las and rhl quorum-sensing systems in control of elastase and rhamnolipid biosynthesis genes. *Journal of bacteriology*, Am Soc Microbiol, v. 179, n. 18, p. 5756–5767, 1997.
- 66 STINTZI, A. et al. Quorum-sensing and siderophore biosynthesis in pseudomonas aeruginosa: lasrllasi mutants exhibit reduced pyoverdine biosynthesis. *FEMS microbiology letters*, Blackwell Publishing Ltd Oxford, UK, v. 166, n. 2, p. 341–345, 1998.

5 Anexo

5.1 Anexo A- Região promotora e ORF do gene *phoB* da cepa PA14

1 **GTCACATAACC** **TGACACA**ATT TCGTTATCTA ATGCGGCGCA AGACAGATCG
51 ACCC**GAGGCA** AGA**ATGGTTG** **GCAAGACAAT** **CCTCATCGTT** **GATGACGAAG**
101 **CACCGATTCC** **CGAGATGATC** **GCCGTGGCCC** **TGGAGATGGC** **CGGCTACGAG**
151 **TGCCTGGAGG** **CGGAAAATAC** **CCAGCAGGCG** **CACGCGGTGA** **TCGTTCGACCG**
201 **CAAGCCGGAC** **CTGATCCTGC** **TCGACTGGAT** **GCTCCCCGGC** **ACTTCCGGCA**
251 **TCGAACTGGC** **GCGACGCCTG** **AAGCGTGACG** **AACTGACCGT** **CGACATCCCG**
301 **ATCATCATGC** **TCACCGCCAA** **GGGCGAGGAG** **GACAACAAGA** **TCCAGGGCCT**
351 **GGAGGTCGGT** **GCCGACGACT** **ACATCACCAA** **GCCGTTCTCG** **CCCCGCGAGC**
401 **TGGTCGCCCC** **CCTGAAGGCC** **GTGCTGCGCC** **GCACCGGGCC** **TGGCGACAGC**
451 **GAGGCGCCGA** **TCGAGGTCGG** **CGGCCTGCTG** **CTGGACCCGA** **TCAGCCACCG**
501 **CGTGACCATC** **GACGGCAAGC** **CGGCCGAGAT** **GGGCCCCACC** **GAGTACCGCC**
551 **TGCTGCAGTT** **CTTCATGACT** **CACCAGGAAC** **GCGCCTATAC** **CCGCGGCCAA**
601 **CTGCTCGACC** **AGGTCTGGGG** **CGGCAACGTC** **TATGTCGAGG** **AGCGCACCGT**
651 **CGACGTGCAT** **ATCCGCCGCC** **TGCGCAAGGC** **GCTCGGCGAG** **GTCTACGAAA**
701 **ATCTGGTTCA** **GACTGTCCGC** **GGGACCGGCT** **ATCGTTTCTC** **CACCAAGAGC**

751 TGA'

* A sequência destacada pela cor laranja representa a PHO-box, a sequência destacada pela cor magenta corresponde a região -10 e a sequência destacada pela cor azul representa a ORF do gene.

5.2 Anexo B- Região promotora e ORF do gene *pstS* da cepa PA14

1 CTGTCACATT CCTTTCATAG AGTCTTCATG CGGCCTGACG ATACTGGCCC
 51 CCGTTCCATC CAACCCCATC CTGTCCAAGG AGCAAAGGCAT GAAACTCAAG
 101 CGTTTGATGG CGGCCCTGAC GTTCGTCGCC GCAGGCCTAG GCGCCGCTTC
 151 CGCGGTAGCC GCGATCGACC CGGCGCTGCC GGAATATCAG AAAGCCAGCG
 201 GTGTGTCGGG CAACCTGTCC AGCGTCGGCT CCGACACTCT GGCCAACCTG
 251 ATGACCATGT GGGCCGAGGA GTACAAGCGC CTCTATCCGA ACGTGAACAT
 301 CCAGATCCAG GCTGCCGGCT CTTCTACCGC GCCGCCGGCC CTGACCGAAG
 351 GCACCGCCAA CCTGGGCCCG ATGAGCCGCA AGATGAAGGA CGTCGAGCTG
 401 CAGGCTTTTCG AGCAGAAGTA CGGCTATAAG CCGACCGCCG TCCCGGTCCG
 451 TGTCGACGCC CTGGCGATCT TCGTGCACAA GGACAACCCG ATCAAAGGCC
 501 TGACCATGCA GCAGGTCGAT GCGATCTTCT CCGCTACCCG CCTGTGCGGC
 551 AGCAAGCAGG ACGTGAAGAC CTGGGGCGAC CTGGGCCTGA CCGGTGACTG
 601 GGCGAAGAAG CCGGTGCAAC TGTTCCGGCCG CAACTCGGTT TCCGGCACCT
 651 ACGGCTACTT CAAGGAAGAA GCCCTGTGCA AAGGCGACTT CCGTCCGAAC
 701 GTCAACGAGC AGCCGGGTTC GGCTTCCGTG GTGCAGTCGG TCAGCCAGTC
 751 GCTGAACGGC ATCGGCTACT CCGGTATCGG CTACAAGACC GCCAGCGTGA
 801 AGACCGTGGC CCTGGCCAAG AAGGAAGGCG CTGCCTTCGT CGAGGACAAC
 851 GAGCAGAACG CCCTGAACGG CACCTACCCG CTGTCGCGCT TCCTCTACGT
 901 CTACGTGAAC AAGGCACCGA ACAAGCCGCT GGATCCGCTG GAGGCTCAGT
 951 TCCTCAAGCT GGTCTGTCC AAGACCGGCC AGCAGGTCGT GGTCAAGGAC
 1001 GGCTACATCC CGCTGCCGGC CAAGGTGGCC GAGAAGGCGA TCAAGGAAC
 1051 GGGCCTGTAA '

*A sequência destacada pela cor laranja representa a PHO-box, a sequência destacada pela cor magenta corresponde a região -10 e a sequência destacada pela cor azul representa a ORF do gene.