LUIZ GUSTAVO DE ALMEIDA

**“Acúmulo de polifosfato e o papel do gene *phoU* em
Pseudomonas aeruginosa”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

São Paulo
2013

LUIZ GUSTAVO DE ALMEIDA

**“Acúmulo de polifosfato e o papel do gene *phoU* em
Pseudomonas aeruginosa”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Beny Spira

Versão original

São Paulo
2013

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

© reprodução total

Almeida, Luiz Gustavo de.

Acúmulo de polifosfato e o papel do gene *phoU* em *Pseudomonas aeruginosa* / Luiz Gustavo de Almeida. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Beny Spira.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração: Microbiologia. Linha de pesquisa: Fisiologia de microrganismos.

Versão do título para o inglês: Polyphosphate accumulation and the role of *phoU* in *Pseudomonas aeruginosa*.

1. Polifosfato 2. Fosfato 3. *Pseudomonas aeruginosa* 4. *phoU*
5. ppGpp 6. Regulon PHO I. Spira, Prof. Dr. Beny II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0187/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Luiz Gustavo de Almeida.

Título da Dissertação: Acúmulo de polifosfato e o papel do gene *phoU* em *Pseudomonas aeruginosa*.

Orientador(a): Prof. Dr. Beny Spira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 467/11 referente ao projeto intitulado: "*Obtenção de fosfato para uso agrícola a partir de águas de residuárias*" sob a responsabilidade de **Luiz Gustavo de Almeida**, foi analisado na presente data pela CEUA - COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS e pela CEPSh- COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não utilizará animais que estejam sob a égide da lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, nem envolverá procedimentos regulados pela Resolução CONEP nº196 de 1996.

São Paulo, 15 de julho de 2011.

PROF. DR. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador da CEUA - ICB/USP

PROF. DR. PAOLO M.A. ZANOTTO
Coordenador da CEPsh - ICB/USP

Aos meus pais, por me apoiarem em todas as decisões
importantes da minha vida e apoio em
toda a minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jadir Aparecido Almeida e Maria Lúcia Almeida, por serem a minha inspiração de como ser uma pessoa melhor, pelo apoio nas minhas escolhas e por tornarem possível a realização dos meus sonhos. Vocês sempre terão meu maior respeito e suporte.

À minha namorada, Sheila Zago, por me entender, apoiar e tornar meus fins-de-semana maravilhosos, mesmo que eles passem rápido, eles são os melhores ao seu lado.

Aos meus amigos e familiares que durante estes anos me apoiaram e ajudaram a superar mais este desafio com muita paciência, estímulo e carinho.

Ao Prof. Beny Spira, pela amizade, compreensão, ensinamentos, discussões intermináveis sobre futebol, filosofia, ciência e política na hora mais feliz dos dias da semana, a hora do café.

Ao Prof.Dr. René Peter Schneider, pelo suporte na pesquisa, apoio e utilização de recursos de seu laboratório.

À Prof. Dr. Regina Lúcia Baldini, por conceder as bactérias necessárias para que este trabalho tivesse início.

À Prof. Marílis do Valle Marques, por sua colaboração intelectual, apoio e utilização de recursos de seu laboratório.

À Heloisa Filus Galbiati (Tubbbiiiiieeee), por se tornar mais que uma amiga durante meus primeiros anos de laboratório, me ensinar tudo com muita paciência, bom humor e carinho. Me orgulho muito de ter sido seu padrinho de casamento. Obrigado pelas conversas, danças, músicas e momentos memoráveis que irão ficar para sempre comigo.

À Fernanda Nogales, por se tornar uma grande amiga com quem eu podia discutir sobre WoW, livros, RPGs e outras nerdices sempre acompanhados de uma boa cerveja. Muito obrigado por me ensinar a trabalhar na bancada desde a minha chegada ao laboratório, pelos conselhos acadêmicos e pela companhia durante estes anos.

Ao Henrique Iglesias Neves (Rulho), por se tornar um grande amigo, pela paciência em me aguentar no dia que não terminava, dia comprido que sempre acabava com reflexões filosóficas que renderiam um livro sobre café, bancada e ciência.

Às queridas e inestimáveis amigas ICs do 114, Luiza (Lulu) , Livia (Liv) e Talita, (Tááálita) pela amizade e pelos momentos de descontração, essenciais para eu manter

a sanidade mental em diversas ocasiões. Obrigado Lulu por me ajudar em diversos experimentos que foram fundamentais para a elaboração desta dissertação.

Aos meus amigos de pós-graduação, Nicolás e Gardênia, por ajudarem a manter o padrão pós no 114. A experiência de vocês foram de grande importância para a elaboração e conclusão deste trabalho.

Aos amigos de outros laboratórios, Tiago, Leandro, Júlia, Luciana, Lucas, Pamela, pelo companheirismo, conversas, almoços. Agradecimento especial ao Georges e à Bianca por se tornarem amigos de churrascos e apreciadores de uma boa cerveja.

Ao financiamento concedido pela CAPES e pelo CNPq, indispensáveis para que eu pudesse realizar este trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

RESUMO

ALMEIDA, L. G. **Acúmulo de polifosfato e o papel do gene *phoU* em *Pseudomonas aeruginosa***. 2000. 66 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Polifosfato inorgânico (PPi) é um polímero linear formado por diversas moléculas de ortofosfato (Pi) unidas por ligações fosfoanidridas de alta energia. Bactérias da espécie *Pseudomonas aeruginosa* acumulam grandes quantidades de PPi. Moléculas de Pi são captadas do meio através de dois sistemas de transporte. O principal deles é o sistema Pst, que possui alta afinidade por seu substrato. Pst é codificado por um operon de mesmo nome, formado por cinco genes. Os quatro primeiro genes codificam para as proteínas envolvidas no transporte de Pi, sendo que o último gene do operon, *phoU*, codifica para uma proteína cuja exata função é desconhecida. Com o objetivo de elucidar o papel deste gene e avaliar a sua relação com o acúmulo de PPi, foi construída uma mutação *phoU* na cepa PA14 de *P. aeruginosa*. O mutante não só apresentou uma maior capacidade de acumular PPi mas também se mostrou mais sensível a estresses ambientais e a antibióticos. Os resultados obtidos indicam que o gene *phoU* possui uma função regulatória sobre o acúmulo de PPi. O mutante *phoU* também apresentou níveis mais altos da molécula de alarme guanosina tetrafosfato (ppGpp). Foi proposto um modelo que explica a relação entre o gene *phoU*, o acúmulo de polifosfato e ppGpp. O mutante *phoU* foi também cultivado em cultura contínua em um quimiostato limitado em Pi por 13 dias. Diversos ensaios fenotípicos foram realizados com bactérias isoladas do quimiostato. Estes apresentaram algumas características fisiológicas distintas da cepa ancestral.

Palavras-chave: Polifosfato. Fosfato. *Pseudomonas aeruginosa*. *phoU*. Operon *pst*. Regulon PHO. ppGpp.

ABSTRACT

ALMEIDA, L. G. **Polyphosphate accumulation and the role of *phoU* in *Pseudomonas aeruginosa***. 2000. 66 p. Masters thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Inorganic polyphosphate (PPi) is a linear polymer composed of several molecules of orthophosphate (Pi) linked by energy-rich phosphoanhydride bonds. Bacteria of the species *Pseudomonas aeruginosa* accumulate large amounts of PPi. Pi molecules are captured via two transport systems. The main one is the Pst system, which has high affinity for its substrate. Pst is encoded by an operon of the same name, consisting of five genes. The first four genes encode proteins involved in the transport of Pi and the last gene of the operon, *phoU*, encodes a protein whose exact function is unknown. To elucidate the role of *phoU* and its relation to PPi accumulation, a *phoU* mutant was constructed in strain PA14 of *P. aeruginosa*. The mutant accumulated high levels of PPi but was more sensitive to environmental stresses and antibiotics. The results indicate that *phoU* plays a regulatory role in the accumulation of PPi. The *phoU* mutant also displays high levels of the alarmone guanosine tetraphosphate (ppGpp). A model that explains the relation between *phoU*, ppGpp and polyphosphate accumulation is proposed. The *phoU* mutant was grown under steady-state conditions in a chemostat limited in Pi for 13 days. Phenotypic assays performed with the bacteria isolated from the chemostat showed they acquired some distinct physiological characteristics.

Keywords: Polyphosphate. Phosphate. *Pseudomonas aeruginosa*. Operon *pst*. PHO regulon. ppGpp.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Regulon PHO	16
Figura 2 – Operon <i>pst</i>	17
Figura 3 – Síntese de ppGpp	20
Figura 4 – Sistema de recombinação de pKNOCK	25
Figura 5 – Quimiostato	30
Figura 6 – Construção do mutante <i>phoU</i>	32
Figura 7 – Curva de Crescimento em meio TGP1.	33
Figura 8 – Rendimento das bactérias em meio TGP4.	34
Figura 9 – Constitutividade do mutante <i>phoU</i>	35
Figura 10 – Determinação de Pi remanescente no meio TGP4	36
Figura 11 – Polifosfato acumulado nas bactérias corado com DAPI.	37
Figura 12 – Gel de polifosfato	38
Figura 13 – Ensaio de sensibilidade a SDS	39
Figura 14 – Ensaio de sensibilidade a H ₂ O ₂	40
Figura 15 – Ensaio de sensibilidade KCl.	41
Figura 16 – Antibiograma	42
Figura 17 – Relação entre <i>phoU</i> e ppGpp	43
Figura 18 – Relação entre ppGpp e o acúmulo de polifosfato	44
Figura 19 – Esquema representativo do operon <i>pst</i> de <i>P. aeruginosa</i>	45
Figura 20 – RT-PCR	46
Figura 21 – Captação de Pi pelos isolados do quimiostato em meio TGP1.	47
Figura 22 – Rendimento, captação de fosfato e acúmulo de polifosfato realizado com os isolados.	48
Figura 23 – Efeito dos estresses ambientais nos isolados	49
Figura 24 – Efeito do SDS nos isolados	50
Figura 25 – Efeito dos antibióticos nos isolados	51
Figura 26 – Efeito de ppGpp sobre PPX	55
Figura 27 – Modulação de SpoT por PhoU	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Lista de bactérias e plasmídios	23
Tabela 2 – Tabela de Iniciadores	24

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Fósforo	14
1.2	Regulon PHO	14
1.3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	16
1.4	Polifosfato inorgânico	17
1.5	Guanosina tetrafosfato (ppGpp)	18
1.6	Resistência a antibióticos	20
1.7	O gene <i>phoU</i>	21
2	OBJETIVOS	22
2.1	Objetivos específicos	22
3	MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1	Bactérias e plasmídios utilizados	23
3.2	Reações de PCR	24
3.3	Meios de Cultura e condições de crescimento	24
3.4	Construção do mutante <i>phoU</i>	25
3.5	Construção de plasmídio contendo o gene <i>phoU</i> selvagem	26
3.6	Curva de crescimento e rendimento bacteriano	26
3.7	Microdeterminação de Fosfato	26
3.8	Medição de polifosfato pelo método de coloração com DAPI	27
3.9	Ensaio de medição de polifosfato em gel de agarose	27
3.10	Ensaio de resistência a antibióticos	27
3.11	Ensaio de resistência a estresses	28
3.11.1	Resistência a Sódio Dodecil Sulfato (SDS)	28
3.11.2	Resistência a estresse osmótico	28
3.11.3	Resistência a estresse oxidativo	28
3.12	Extração de RNA	29
3.13	RT-PCR do operon <i>pst</i>	29
3.14	Ensaio de evolução de bactérias em cultura contínua	30
3.15	Ensaio de medição de ppGpp	30
3.16	Análise estatística	31
4	RESULTADOS	32
4.1	O mutante <i>phoU</i> de <i>P. aeruginosa</i>	32
4.1.1	Efeito da mutação <i>phoU</i> sobre a taxa de crescimento e rendimento bacteriano	33
4.1.2	Efeito da mutação <i>phoU</i> sobre a expressão do regulon PHO	34
4.1.3	Efeito da mutação <i>phoU</i> sobre a captação de fosfato e acúmulo de polifosfato	35
4.1.3.1	Medição do fosfato remanescente no meio	35
4.1.3.2	Acúmulo de polifosfato no mutante <i>phoU</i>	36
4.2	Relação entre o gene <i>phoU</i> e a resistência a estresses ambientais	38
4.2.1	O efeito de <i>phoU</i> sobre a sensibilidade a SDS	38
4.2.2	O efeito de <i>phoU</i> sobre a sensibilidade ao estresse oxidativo	39
4.2.3	O efeito de <i>phoU</i> sobre a sensibilidade ao estresse osmótico	40
4.3	Efeito de <i>phoU</i> sobre a sensibilidade a antibióticos	41
4.4	Relação entre o gene <i>phoU</i>, ppGpp e o acúmulo de polifosfato	42
4.5	Análise do transcrito do operon <i>pst</i>	45

4.6	Evolução do mutante <i>phoU</i> em cultura contínua limitada em fosfato . . .	46
4.6.1	Rendimento, captação de fosfato e acúmulo de polifosfato nos isolados do quimiostato	47
4.6.2	Resistência aos estresses osmótico e oxidativo dos isolados	48
4.6.3	Efeito do SDS nos isolados do quimiostato	49
4.6.4	Sensibilidade a antibióticos nos isolados do quimiostato	50
5	DISCUSSÃO	52
5.1	PhoU como repressor do regulon PHO	52
5.2	O gene <i>phoU</i> e o crescimento bacteriano	52
5.3	O gene <i>phoU</i> e a captação de fosfato	53
5.4	O gene <i>phoU</i> e o acúmulo de polifosfato	54
5.5	O gene <i>phoU</i> e sua relação com ppGpp e o acúmulo de polifosfato	54
5.6	Análise do transcrito do operon <i>pst</i>	57
5.7	Relação entre <i>phoU</i> e resistência a estresses ambientais e antibióticos . .	58
5.8	Isolados do quimiostato	59
6	CONCLUSÕES	61
	Referências	62

1 INTRODUÇÃO

1.1 Fósforo

Fósforo é um importante macronutriente para todos os seres vivos, chegando a perfazer 3% do peso seco de células bacterianas. Este é, portanto, um fator limitante no crescimento de organismos e para enfrentar a constante limitação deste nutriente, bactérias desenvolveram complexos sistemas proteicos para assimilar fósforo de forma eficiente (1).

Moléculas fundamentais, como lipídios, ácidos nucleicos, proteínas e açúcares, possuem fósforo em sua composição e o metabolismo de fósforo está intimamente relacionado com a produção de energia e o metabolismo de carbono.

Ortofosfato (PO_4^{-3} ou Pi) é a forma preferencial de captação e assimilação de fósforo por bactérias, mas não é a única. Na ausência de Pi, há mecanismos alternativos para o transporte e assimilação de organofosfatos e fosfonatos, que uma vez dentro da célula, precisam ser clivados para liberar as moléculas de Pi (2, 3). A maioria dos genes associados à captação e assimilação de Pi e de moléculas fosfatadas é ativamente expressa somente quando a disponibilidade de Pi no meio encontra-se abaixo de 4 μM (2). Estes genes formam coletivamente o regulon PHO (1, 4, 5).

Sendo um fator limitante para o crescimento, o Pi pode ser a chave para evitar a eutrofização causada por microrganismos em corpos d'água, como lagos e baías. A remoção deste composto de águas residuárias muitas vezes é conduzida através da precipitação química, um processo financeiramente custoso. O processo biológico de remoção de Pi de águas residuárias tem sido objeto de pesquisas para uma melhor compreensão dos mecanismos utilizados por microrganismos para captar Pi e possibilitar a substituição do processo de remoção química do fosfato (6, 7).

1.2 Regulon PHO

O regulon PHO de *Escherichia coli* é composto por pelo menos 31 genes e operons (2, 8). Porém um número muito maior de proteínas tem a sua expressão afetada positiva (208) ou negativamente (205) pela carência de Pi (9). Entre os principais componentes do regulon PHO encontra-se o operon *pst*, composto por cinco genes, sendo que os quatro primeiros, *pstS*, *pstC*, *pstA* e *pstB* codificam para um sistema de transporte de Pi de alta afinidade. O fosfato presente no periplasma é sequestrado por PstS e então transferido para as proteínas PstA e PstC, que for-

mam um canal integrado na membrana citoplasmática. PstB é uma ATPase que fornece energia ao transporte (4, 10). O último gene do operon, *phoU*, codifica para uma proteína, cuja exata função ainda não foi descoberta.

Além de transportar Pi, o sistema Pst atua como repressor dos genes de PHO em condições de abundância de Pi. O mecanismo pelo qual ocorre a repressão via Pst é desconhecido, mas não há dúvida quanto a seu papel regulatório, uma vez que mutações nulas em qualquer um dos genes do operon *pst* (*phoU* inclusive) resultam na expressão constitutiva de todo o regulon mesmo na presença de altas concentrações de Pi (2). Uma conclusão decorrente deste fato é a de que para manter o regulon PHO reprimido, níveis basais de Pst devem estar sendo expressos quando a concentração de Pi no meio encontra-se em excesso. A transcrição dos genes do regulon PHO é controlada pelo sistema de dois componentes PhoB-PhoR. Quando a concentração de fosfato presente no meio cai abaixo de 4 μ M, a histidina-quinase PhoR, que se encontra na membrana interna da bactéria, se auto-fosforila e transfere o grupo fosfato para o resíduo Asp53 na proteína PhoB, que por sua vez, liga-se aos PHO-boxes, que são sequências de consenso que substituem a sequência -35 em todos os genes do regulon PHO, iniciando a transcrição dos mesmos (11). PhoR é uma proteína bi-funcional, pois possui atividade de quinase e fosfatase (12). Quando a concentração de Pi no meio aumenta, PhoR desfosforila PhoB-P, desativando a transcrição dos genes do regulon PHO.

O papel de PhoR e PhoB na cascata de transdução de sinal está razoavelmente claro. Porém, ainda não se sabe como PhoR recebe a informação do meio sobre a disponibilidade de Pi e como a troca entre as atividades de quinase e fosfatase é modulada. Uma das hipóteses é a de que PstSCAB sinaliza para PhoU sobre a disponibilidade de Pi no periplasma. PhoU, por sua vez, interage com PhoR e este, dependendo do caso, assume a atividade de quinase ou de fosfatase (13). Além de regular genes envolvidos na captação e no metabolismo de fosfato, o regulon PHO afeta, direta ou indiretamente, a sobrevivência (resistência a estresses ambientais) e a virulência de diversas espécies de bactérias patogênicas (14). A Figura 1 mostra um possível esquema de funcionamento do regulon PHO.

Figura 1 – **Esquema representativo do controle do regulon *pho* em *E. coli*.** Em baixas concentrações de fosfato, PhoR sinaliza para PhoB que, uma vez fosforilado, se liga aos PHO-BOXes iniciando a transcrição dos genes regulados por esses promotores. A inativação do operon *pst* resulta na ativação do regulon PHO mesmo quando o fosfato no meio externo se encontra em excesso. **Abreviações:** Pi, fosfato inorgânico; PstS, proteína periplasmática que possui alta afinidade por fosfato; PstA e PstC, proteínas de membrana; PstB, ATPase; PhoU, possível proteína regulatória; PhoB, proteína reguladora da resposta; PhoR, proteína sensora; (A, autofosforilada; P, fosforilada). Adaptado de (14).

1.3 *Pseudomonas aeruginosa*

Bactérias possuem a habilidade de sobreviver nos mais diversos habitats. Para tanto, foi necessário que durante milhões de anos de evolução, sistemas de coordenação de expressão gênica regulada pelo ambiente, fossem desenvolvidos. A complexidade desses sistemas de regulação aumenta conforme a diversidade de ambientes em que a bactéria pode ser encontrada. Espécies de bactérias que são capazes de sobreviver em condições diversas e adversas, possuem grande parte do seu genoma voltado à percepção de sinais provenientes do meio e à regulação da expressão gênica apropriada (15).

Pseudomonas aeruginosa é uma proteobactéria γ encontrada em reservatórios naturais de água, no solo, em plantas e em animais. Em humanos, causa infecções associadas a queimaduras severas e é um patógeno oportunista de pacientes imunodeprimidos e portadores de fibrose cística (16). O gênero *Pseudomonas* é conhecido também pela produção de piocianina, que é um pigmento verde-azulado solúvel em água que tem ação contra bactérias, fungos e protozoários (17).

Aproximadamente 10% do genoma de *P. aeruginosa* é dedicado à regulação gênica. Uma característica marcante dessa bactéria é a presença de 129 genes que codificam à sistemas de dois componentes, que são responsáveis pela resposta imediata a mudanças nas condições ambientais (18).

Em *P. aeruginosa*, o regulon PHO não foi ainda tão bem caracterizado como em *E. coli*, mas um estudo *in silico* previu a presença de 73 PHO-boxes no cromossomo da cepa PA01 (19). O operon *pst* de *Pseudomonas aeruginosa* é similar ao de *E. coli*, diferenciando-se principalmente em relação a presença de promotores independentes para *pstS* e aparentemente, outro para *pstCAB-phoU* (20, 21), conforme ilustrado na Figura 2.

A cepa UCBPP-PA14 (ou simplesmente PA14), escolhida como cepa padrão deste estudo, é um isolado clínico que pode infectar diferentes tipos de hospedeiros de categorias filogenéticas distintas (22). Apesar de não ser a cepa padrão de *P. aeruginosa* mais utilizada, o genoma de PA14 foi totalmente sequenciado e além disso, estudos recentes mostraram que a cepa PA01, mais comumente usada em laboratórios, sofreu microevolução com o passar dos anos, comprometendo a reprodutibilidade dos resultados em diferentes laboratórios (23).

Figura 2 – Esquema representativo do operon *pst* de *P. aeruginosa* e de *E. coli*

1.4 Polifosfato inorgânico

Polifosfato inorgânico (PPi) é um polímero linear em que diversas moléculas de ortofosfato estão unidas por ligações fosfoanidridas de alta energia (24). Este polímero tem várias funções,

desempenhando um papel fundamental na virulência, resposta a estresses ambientais e resistência a compostos antibacterianos, em diversas espécies de bactérias (25). PPI ainda serve como reserva de fosfato e energia, carreador de cátions divalentes, regulador de atividades enzimáticas, de tradução e de transcrição. (26). Polifosfato foi encontrado em todos os tipos de seres vivos já estudados: bactérias, fungos, protozoários, plantas e mamíferos (27). Ele é sintetizado em procariotos pela ação da enzima polifosfato quinase (PPK) que transfere o fosfato terminal do ATP para o polímero em construção. A hidrólise de polifosfato é realizada pela enzima PPX, uma polifosfatase (28). PPK pode ainda catalizar a reação inversa, produzindo ATP a partir de polifosfato quando a concentração de ADP na célula for 10 vezes maior que a concentração de ATP (29). Há indícios na literatura de que *phoU* está envolvido no acúmulo de polifosfato. Mutantes *phoU* de *Escherichia coli* e de *Synechocystis sp.* demonstraram acumular 100 e 4 vezes mais polifosfato, respectivamente, quando comparado com as respectivas cepas selvagens (30, 31).

1.5 Guanosina tetrafosfato (ppGpp)

Bactérias enfrentam períodos de alteração na disponibilidade de nutrientes no meio em que se encontram, passando por períodos de transformações fisiológicas significativas. Ao enfrentarem situações de carência de nutrientes, estas alteram rapidamente o seu metabolismo, freando a síntese de DNA, RNAs estáveis (rRNA e tRNAs), proteínas ribossomais e componentes de membrana para priorizar a produção de fatores de resistência a estresse e a síntese de aminoácidos essenciais para a sua sobrevivência (32).

Guanosina tetrafosfato (ou ppGpp) é um nucleotídeo envolvido na resposta severa em bactérias e é produzido quando estes microrganismos enfrentam situações de estresse, como a baixa concentração de nutrientes no meio. ppGpp influencia o padrão de expressão de diversos genes, regulando positivamente genes associados à sobrevivência em situações de estresse e inibindo a transcrição de genes relacionados ao crescimento bacteriano e à síntese de RNA (33). Em *E.coli* e em todas as proteobactérias das classes β e γ , a proteína RelA, uma enzima monofuncional, é responsável pela síntese de ppGpp quando a bactéria enfrenta a carência de um ou mais aminoácidos. Esta enzima agrega uma molécula de pirofosfato proveniente de ATP à uma molécula de GTP para produzir pppGpp que é então convertido em ppGpp pela ação da hidrolase GPP. Como pppGpp e ppGpp acumulam-se na bactéria ao mesmo tempo, é comum denominar esses dois nucleotídeos coletivamente como (p)ppGpp (33). Em condições normais

de crescimento ppGpp é hidrolisado por SpoT, uma enzima bifuncional que, além de degradar ppGpp, também pode agir como sintetase desse mesmo nucleotídeo quando a bactéria enfrenta outros tipos de estresse, tais como carência de carbono ou fosfato (34, 35). A função hidrolítica de SpoT é essencial para bactérias, uma vez que a alta concentração de ppGpp no interior da célula inibe o crescimento, inviabilizando a sua sobrevivência. Outras bactérias possuem um único gene Rel/Spo (RSH), responsável pela síntese e degradação de (p)ppGpp (32, 33).

O efeito de ppGpp é potencializado pela proteína DksA. Em conjunto, este complexo pode agir diretamente ou indiretamente na RNA polimerase. No primeiro caso ppGpp associado a DksA favorece a ligação da RNA polimerase a promotores específicos. No segundo caso o complexo se liga ao cerne da RNA polimerase e regula a transcrição por um processo conhecido como competição de fatores σ . Durante a fase de crescimento logarítmico o fator σ^{70} direciona a RNA polimerase para a transcrição de operons envolvidos no anabolismo e captação de nutrientes. O acúmulo de ppGpp e sua interação com a proteína DksA junto ao cerne da RNA polimerase, favorecem a ligação de fatores sigmas alternativos a esta última (32).

A Figura 3 mostra um esquema da síntese de ppGpp e sua interação com a RNA polimerase juntamente com a proteína DksA.

Foi demonstrado que em *E.coli* o acúmulo de ppGpp é importante para a expressão dos genes do regulon PHO quando a bactéria enfrenta situações de carência de fosfato e que a proteína PhoB afeta positivamente o acúmulo de (p)ppGpp (36)

Kuroda e colaboradores demonstraram que o aumento de (p)ppGpp ocasionado pela carência de aminoácidos leva ao acúmulo de polifosfato. Esse fenômeno ocorre pois (p)ppGpp inibe diretamente a ação da polifosfatase PPX (37).

Figura 3 – **Síntese de ppGpp e sua interação com a RNA polimerase:** ppGpp pode ser sintetizado via RelA ou via SpoT a partir de GTP (ou GDP) e ATP. Esta última enzima é bifuncional, agindo também como hidrolase deste nucleotídeo. DksA potencializa a ação de ppGpp. Este complexo formado pela proteína mais o nucleotídeo pode atuar direta ou indiretamente sobre a ação da RNA polimerase. Adaptado de Dalebroux and Swanson 2012

1.6 Resistência a antibióticos

A primeira evidência de que bactérias poderiam sobreviver mesmo após serem expostas a um longo período de tempo a fatores de estresse, foi constatada por Joseph Bigger em 1994, ao relatar que a penicilina não esterilizava completamente culturas de estafilococos (38). Li e Zhang (39) mostraram que o gene *phoU* de *E. coli* está relacionado a este fenômeno, que ficou conhecido como persistência.

Bactérias da espécie *P. aeruginosa* apresentam alta resistência intrínseca a antibióticos, possivelmente devido a uma sinergia entre a baixa permeabilidade da membrana externa e a super-expressão de genes de efluxo de antibióticos (40). Outro fator que também contribui significativamente para que *Pseudomonas aeruginosa* apresente uma alta resistência a antibióticos é o fato dessa bactéria formar biofilmes, que ocorre quando uma comunidade de microrganismos adere a uma superfície e passa a produzir uma matriz extracelular composta principalmente por exopolissacarídeos. O biofilme apresenta características fenotípicas e bioquímicas distintas

quando comparado com a forma planctônica da mesma bactéria. Uma dessas características é o aumento de até 1000 vezes na resistência a antibióticos (41).

1.7 O gene *phoU*

O gene *phoU* codifica para uma proteína de mesmo nome de aproximadamente 27 kDa. A função de reprimir o regulon PHO foi demonstrada em diferentes estudos mas apenas foram sugeridas hipóteses do mecanismo de ação e dos alvos desta proteína (42, 43, 44). Nakata et.al comparou os níveis de expressão de *phoU* em *E. coli* cultivada em meio limitado e não limitado em fosfato. Os resultados apresentados indicam que nesta última situação a expressão de *phoU* chega a ser 5 vezes maior. Três hipóteses foram sugeridas envolvendo *phoU* na repressão do regulon PHO. A primeira seria a de que *phoU* codifica para um repressor direto de PHO. A segunda hipótese propõe que este gene codifica para uma sub-unidade de um repressor de *phoB* e a terceira hipótese seria que o gene *phoU* codifica para uma enzima que converteria fosfato para um efetor hipotético que ativaria um repressor de *phoB* (45). Em *P. aeruginosa*, uma análise molecular do operon *pst* demonstrou que *phoU* é essencial para reprimir a captação de Pi em condições de excesso fosfato, assim como observado em *E. coli* (20).

Há relatos de que mutantes *phoU* de *E.coli* são mais sensíveis a diversos tipo de estresse, tais como a exposição à formas reativas de oxigênio, carência de carbono, calor e pH ácido. O gene *phoU* também está envolvido no fenômeno de persistência. Neste mesmo estudo, foi demonstrado que mutantes *phoU* de *Escherichia coli* são mais suscetíveis a diversos antibióticos, tais como ampicilina e gentamicina (39).

Outro efeito relacionado a PhoU é o acúmulo de polifosfato. Foi demonstrado que os mutantes *phoU* de *E. coli* e de *Synechocystis sp.* cepa PCC6803, captam e acumulam grandes quantidades de fosfato e polifosfato respectivamente. Os níveis de PPi no mutante *phoU* de *E. coli* eram pelo menos 100 vezes maiores quando comparado com a cepa selvagem (30).

Uma busca com a ferramenta BLAST mostrou que *phoU* é amplamente conservado no domínio *Eubacteria*, sugerindo que esta proteína tem um papel fundamental.

2 OBJETIVOS

O principal objetivo deste trabalho foi o de caracterizar o mutante *phoU* de PA14 e relacionar a papel deste gene com o metabolismo de polifosfato. Este trabalho também teve como objetivo específico aumentar a capacidade de captação de fosfato pela *P. aeruginosa* a fim de desenvolver bactérias super-acumuladoras de polifosfato para o tratamento de águas residuárias.

2.1 Objetivos específicos

- Construção de um mutante *phoU* nulo na cepa PA14 de *P. aeruginosa*.
- Análise do efeito da mutação *phoU* sobre a resistência a antibióticos e estresses ambientais.
- Análise do efeito da mutação sobre a captação de fosfato e o acúmulo de polifosfato.
- Experimento de evolução em cultura contínua com o mutante *phoU*.
- Análise do padrão de transcrição do operon *pst*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Bactérias e plasmídios utilizados

As bactérias e os plasmídios utilizados neste estudo estão listados na Tabela 1.

Cepas bacterianas	Genótipo relevante	Referência ou fonte
C3	Isolado do quimiostato	Este estudo
DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> 80 <i>dlacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 endA1 recA1 deoR (ara; leu)</i> 7697 <i>araD39 galU galK nupG rpsL</i>)	Coleção do laboratório
E4	Isolado do quimiostato	Este estudo
E9	Isolado do quimiostato	Este estudo
<i>Escherichia coli</i> S-17	λ - <i>pir</i>	(46)
PA14	<i>P. aeruginosa</i> selvagem	
PA14 <i>phoU</i>	PA14 <i>phoU</i> ::pKNOCK-Gm	Este estudo
Plasmídios		
pKNOCK-Gm	Vetor suicida para mutagenização de bactérias gram negativas	(46)
pKNOCK-Km	Vetor suicida para mutagenização de bactérias gram negativas	(46)
pLG04	Fragmento interno de <i>phoU</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> clonado em pTZ57R/T	Este estudo
pLG05	Gene <i>phoU</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> clonado em pTZ57R/T	Este estudo
pLG13	Gene <i>phoU</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> clonado em pUCP18	Este estudo
pLG14	Fragmento interno de <i>phoU</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> clonado em pKNOCK-Km	Este estudo
pLG17	Fragmento interno de <i>phoU</i> de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> clonado em pKNOCK-Gm	Este estudo
pTZ57R/T	Vetor de clonagem Amp ^r	Fermentas
pUCP18	Vetor de clonagem Cb ^r	(47)

Tabela 1 – Lista de bactérias e plasmídios

3.2 Reações de PCR

As reações de PCR foram feitas utilizando o Kit GoTaq (Promega) conforme recomendações do fabricante. Os oligos utilizados estão descritos na Tabela 2.

Iniciador	Sequencia 5' - 3'
PA-phoU-5171F	CTCCGTAGCTCGTTGATGTC
PA-CABphoU-6086R	CGACTGAAACGAGTAGCTG
PA-phoU-5398F	CGACGACCAGATCAACCAG
PA-phoU5778R	GGGTCTTCCATCATGTAGGT
pstS-384F	GAGTACAAGCGCCTCTATCC
pstC-653R5	GAACCGCAACTTCTTCTCC

Tabela 2 – Tabela de Iniciadores

3.3 Meios de Cultura e condições de crescimento

P. aeruginosa e *E. coli* foram rotineiramente cultivadas a 37 °C em meio Lysogenic Broth (LB) (48). Para a extração de RNA foi utilizado o Meio A (0.12 M Tris; 80 mM NaCl; 20 mM KCl; 20 mM NH₄Cl; 3 mM Na₂SO₄; 1 mM MgCl₂; 0.2 mM CaCl₂; 2 µM ZnCl₂; 0.5% Bacto-peptona; pH = 7,5). Ao adicionar 1 mM de KH₂PO₄, este meio foi chamado de Meio A +Pi. Quando o meio não era enriquecido com fosfato, o mesmo era chamado de Meio A -Pi. Os ensaios de captação de fosfato e acúmulo de polifosfato foram realizados em Meio TGP (0.4% de glicose; NaCl (4.68 g/l); KCl (1.5 g/l); NH₄Cl (1.08 g/l); Tris-base (14.52 g/l); MgCl₂.6H₂O (0.2 g/l); Na₂SO₄ (0.35 g/l); CaCl₂ (0.1 M); FeCl₃ (1 mM); ZnCl₂ (1 mM); 0.2 % de ácido casamino; pH = 7.5). Quando suplementado com 0.1 mM, 1 mM ou 4 mM de KH₂PO₄ foi denominado TGP0.1, TGP1 e TGP4 respectivamente. Por vezes, foi adicionado 0,2% de ácido casamino ao meio mínimo TGP.

Quando necessário, antibióticos foram adicionados nas seguintes concentrações para o cultivo de *P. aeruginosa*: gentamicina (100 µg/ml), canamicina (200 µg/ml) e carbenicilina (100 µg/ml).

Para o cultivo de *E. coli*: ampicilina (100 µg/ml) , canamicina (50 µg/ml) e gentamicina (20 µg/ml).

3.4 Construção do mutante *phoU*

Para introduzir uma mutação nula no gene *phoU* da cepa PA14, o vetor suicida pKNOCK (46) foi utilizado (Figura 4). Uma porção interna do gene *phoU* foi amplificada por PCR utilizando os iniciadores PA-phoU-5398F e PA-phoU5778R. Este fragmento foi então clonado no vetor pTZ57R/T e o novo plasmídio foi chamado de pLG04. Este plasmídio foi então digerido com XbaI e HincII e o fragmento foi sub-clonado em pKNOCK-Gm e pKNOCK-Km originando os plasmídios pLG17 (resistente à gentamicina) e pLG14 (resistente à canamicina), respectivamente. A cepa PA14 apresentou alta resistência intrínseca ao antibiótico canamicina (200 µg/ml) e por isso o plasmídio pLG14 não foi mais utilizado. O plasmídio pLG17 foi inserido por eletroporação na cepa S-17 de *Escherichia coli*, que é capaz de replicar plasmídios com a origem de replicação R6K. O passo seguinte foi transformar pLG17 em PA14, que não replica este plasmídio e que, portanto, sofre recombinação homóloga com o gene *phoU* no cromossomo de PA14, gerando assim duas cópias truncadas do gene alvo.

Figura 4 – **Construção do mutante *phoU* com o vetor suicida pKNOCK:** A) O fragmento interno de *phoU* foi amplificado por PCR com os iniciadores PA-phoU-5398F (F*) e PA-phoU5778R (R**). Este fragmento foi então ligado ao vetor de clonagem pTZ57R/T originando o plasmídio pLG04. B) pLG04 foi digerido com as enzimas XbaI e HincII e ligado a pKNOCK-Gm, originando o plasmídio pLG17. C) pLG17 não se replica em *P. aeruginosa*, ele recombina-se com o genoma de PA14, originando duas cópias truncadas não funcionais do gene alvo.

3.5 Construção de plasmídio contendo o gene *phoU* selvagem

O gene *phoU* de PA14 foi amplificado por PCR utilizando-se os iniciadores PA-phoU-5171F e PA-pstCABphoU-6086R e clonado no vetor pTZ57R/T originando o plasmídio pLG05. Este foi digerido com as enzimas de restrição XbaI e HindIII e o fragmento correspondente ao gene *phoU* foi sub-clonado em pUCP18 (47) dando origem ao plasmídio pLG13. Este plasmídio foi utilizado para complementar a mutação *phoU*.

3.6 Curva de crescimento e rendimento bacteriano

Bactérias cultivadas durante 16 horas foram diluídas para uma $D_{0600} = 0,1$ e cultivadas a 37 °C com agitação. Amostras foram retiradas a cada hora para a medição da D_{0600} . A taxa de crescimento foi calculada utilizando a fórmula $\mu = \ln \frac{N}{N_0} / T$, onde N e N_0 são, respectivamente, a concentração inicial e final de bactérias e T é o intervalo de tempo utilizado para o cálculo. O rendimento das bactérias foi medido após 16 horas de cultivo em meio TGP1.

3.7 Microdeterminação de Fosfato

Este método consiste em medir o fosfato inorgânico remanescente no sobrenadante do meio de cultura (49). Para isso foram preparadas as seguintes soluções: 167 mM de ácido sulfúrico; 2,5% de molibdato de amônia; 10% de ácido ascórbico. O reagente de trabalho consiste na mistura de 1 volume de 167 mM de ácido sulfúrico, 1 volume de 2,5% de molibdato de amônia, 1 volume de 10% de ácido ascórbico e 2 volumes de água deionizada. Uma curva de calibração foi feita utilizando as seguintes concentrações de NaH_2PO_4 : 0,16 mM; 0,08 mM; 0,04 mM; 0,02 mM; 0,01 mM.

As bactérias foram cultivadas em meio TGP4 durante 16 horas a 37 °C com agitação. No dia seguinte foram centrifugadas por 10 minutos a 6.000 rpm. O sobrenadante foi coletado e diluído 10 vezes para então ser misturado a 1 volume do reagente de trabalho e incubado a 37 °C por duas horas. A leitura foi realizada utilizando espectrofotômetro na absorvância de 820 nm.

Para transformar os valores absolutos da D_{0820} em unidades de Pi, foi utilizada a equação da reta calculada a partir dos valores obtidos na curva de calibração.

3.8 Medição de polifosfato pelo método de coloração com DAPI

Para corar e quantificar o polifosfato acumulado pelas bactérias foi utilizado o corante DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (50). As bactérias foram cultivadas durante 16 horas em meio LB e em seguida foram diluídas para uma DO_{600} de 0,2. Logo em seguida elas foram centrifugadas por 20 minutos a 10.000 rpm e lavadas duas vezes com 0,9% NaCl para então serem ressuspensas em água deionizada. O corante DAPI foi adicionado em uma concentração final de 10 μ M e as bactérias foram mantidas no escuro durante 20 minutos. A medição do polifosfato foi feita no fluorímetro Paradigma, Molecular Devices, com excitação de 410 nm e emissão de 550 nm.

3.9 Ensaio de medição de polifosfato em gel de agarose

As bactérias foram cultivadas a 37 °C com agitação em meio TGP0.1 suplementado com 0,2% de Ácido Casamino até atingirem a DO_{600} de 0,2-0,4. Em seguida foram adicionados 5 μ Ci/ml de 32 Pi ao meio e as culturas foram cultivadas por mais duas horas. Amostras de 1 ml de bactérias foram então centrifugadas por 5 minutos a 6000 rpm e tratadas com o Kit Wizard de purificação de DNA genômico (Promega) conforme instruções do fabricante.

Em seguida, as amostras foram tratadas com 1 μ l de DNase conforme instruções do fabricante (Fermentas), precipitadas com etanol, ressuspensas em 10 μ l de 50 mM NaOH + 1 mM EDTA e misturadas a 2 μ l de 6X *loading dye* alcalino (300 mM NaOH; 6 mM EDTA; 0,25% verde de bromocresol; 0,25% xileno cianol; 18% ficol). O polifosfato foi separado por eletroforese em gel de agarose alcalino (1,1% de agarose suplementada com 50 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH 8.0). Após a eletroforese, o gel foi seco sob vácuo sobre uma membrana de celulose para em seguida ser exposto ao *screen* sensível a radiação. A leitura do *screen* foi realizada em um phosphorimager (Cyclone-Perkin Elmer) e a quantidade de polifosfato acumulada foi medida pela intensidade dos *spots* correspondentes (31).

3.10 Ensaios de resistência a antibióticos

A resistência das bactérias a antibióticos foi testada em antibiogramas com discos comerciais (Sensifar) contendo concentrações conhecidas de antibióticos. As bactérias foram cultivadas

durante 16 horas em meio LB e em seguida foram diluídas em 0,9% NaCl para uma $DO_{600} = 0,1$. 100 μ l de cada cultura foram plaqueados em meio Miller-Hinton e os discos com os antibióticos foram aplicados sobre a camada de bactérias. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 horas e os halos formados em volta dos discos foram medidos para verificar a sensibilidade das bactérias aos seguintes antibióticos: 30 μ g tetraciclina (TET), 30 μ g ceftazidima (CEF), 300 μ g sulfonamida (SUL), 15 μ g eritromicina (ERI), 5 μ g ciprofloxacina (CIP), 30 μ g aztreonam (AZT), 30 μ g vancomicina (VAN) e 10 μ g imipenem (IMI).

3.11 Ensaios de resistência a estresses

Em todos os ensaios de estresses as bactérias foram previamente cultivadas a 37 °C com agitação durante 16 horas em meio LB.

3.11.1 Resistência a Sódio Dodecil Sulfato (SDS)

Na manhã seguinte ao cultivo em LB, diluições seriadas das culturas foram plaqueadas em meio LB ágar contendo 3% de SDS. Foram plaqueadas aproximadamente 10^5 , 10^4 e 10^3 bactérias em cada *patch*. Em seguida as placas foram incubadas a 37 °C por 16 horas.

3.11.2 Resistência a estresse osmótico

As bactérias cultivadas previamente foram lavadas duas vezes com 0,9% NaCl e então diluídas para uma $DO_{600} = 1,0$. Em seguida 3×10^3 bactérias foram inoculadas em 1 ml de KCl nas concentrações 0, 1, 2, 3 e 4 M e incubadas a temperatura ambiente. Após 4 horas, alíquotas de 100 μ l foram coletadas e plaqueadas em meio LB ágar. As placas foram mantidas a 37 °C durante 16 horas e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) foi contado.

3.11.3 Resistência a estresse oxidativo

Após o cultivo durante 16 horas as bactérias foram lavadas duas vezes com 0,9% NaCl e diluídas para uma $DO_{600} = 1,0$. 100 μ l de cada amostra foram plaqueados em meio LB ágar e discos estéreis embebidos em 29% de H_2O_2 foram colocados sobre o tapete de bactérias no centro de cada placa. Estas placas foram então mantidas a 37 °C durante 24 horas e os halos formados em volta dos discos foram medidos para verificar a sensibilidade das bactérias ao peróxido de hidrogênio.

3.12 Extração de RNA

Para extrair o RNA total de *P. aeruginosa*, 10 ml de bactérias foram cultivadas durante 16 horas em meio A suplementado com 1 mM de Pi ou sem suplementação. As culturas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 minutos a 4 °C. O *pellet* foi homogenizado em 2 ml de RNAzol (1.86 M de Isocianato de guanidina; 12 mM de citrato de sódio; 87 mM de acetato de sódio pH 4.0; 0.37% de sarcosil; 42 mM de beta-mercaptoetanol; 1 volume de fenol pH 4.0 saturado em água) e incubado por 5 minutos a 65 °C. Foi adicionado 0.8 ml de clorofórmio e a mistura, agitada vigorosamente por 15 segundos, ficou mantida em temperatura ambiente por 3 minutos para depois ser centrifugada a 13.000 rpm por 5 minutos. A fase aquosa superior foi transferida para um tubo livre de RNase e misturada com 1 volume de isopropanol. A amostra foi mantida por 10 minutos em temperatura ambiente e logo após centrifugada a 13.000 rpm por 10 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado com 0.5 ml de etanol 75%. O pellet foi seco em temperatura ambiente e então ressuspensionado em 50 µl de água deionizada. A concentração de RNA foi medida em espectrofotômetro a 260 nm.

3.13 RT-PCR do operon *pst*

O RNA extraído foi primeiro tratado com 1 µl de DNase livre de RNase (Ambion) por 30 minutos a 4 °C de acordo com as recomendações do fabricante. A DNase foi inativada com o tampão de inativação que acompanha o kit. Em seguida, 2 µg de RNA tratado com DNase foram utilizados para a síntese da primeira fita de cDNA com o iniciador pstC-653R, 5 µl do tampão de reação M-MLV 5X, 1.25 µl de dNTPs, 25 unidades do inibidor de RNase RNAsin (Promega) e 200 unidades da enzima M-MLV RT para um volume final de 25 µl. A reação foi incubada por 60 minutos a 42 °C e a transcriptase reversa foi inativada a 65 °C por 10 minutos. Os controles negativos foram feitos omitindo-se a transcriptase reversa da reação de RT. $\frac{1}{5}$ do produto final da reação de RT foi adicionado a um tubo contendo 25 µl do Kit GoTaq (Promega) e 30 pmol dos iniciadores pstS-384F e pstC-653R5 em um volume final de 50 µl. A reação de PCR foi feita em 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 segundos, o tempo de anelamento foi de 30 segundos a 52 °C e a extensão foi realizada a 72 °C por 40 segundos.

3.14 Ensaios de evolução de bactérias em cultura contínua

O cultivo em quimiostato foi realizado mantendo a cultura em fase de crescimento exponencial durante 13 dias em um frasco de contendo 80 ml de meio de cultura TGP suplementado com 0.2% de glicose e 30 μM de KH_2PO_4 (concentração limitante de Pi). Meio fresco e estéril foi adicionado à cultura observando a taxa de diluição de 0.1 h^{-1} . A cultura foi constantemente bombeada com ar estéril umedecido e agitada com um pequeno imã. A temperatura foi mantida a 37 °C submergindo o frasco de cultura em banho-maria. Amostras foram retiradas diariamente, diluídas e semeadas em duplicatas em placas de LB. O número de UFC foi contado no dia seguinte e bactérias isoladas foram ensaiadas para a captação de fosfato pelo método descrito acima (Seção 3.7). A Figura 5 mostra um esquema do sistema de cultivo em cultura contínua utilizado.

Figura 5 – **Esquema representativo do quimiostato utilizado no experimento de evolução dirigida:** O meio de cultura utilizado continha uma concentração limitante de Pi (30 μM). O cultivo foi realizado durante 13 dias a uma taxa de diluição de $0,1 \text{ h}^{-1}$.

3.15 Ensaio de medição de ppGpp

Bactérias foram cultivadas em meio TGP1 com agitação a 37 °C por 16 horas e em seguida diluídas para uma $\text{DO}_{600} = 0,05$ em meio TGP1 fresco. Ao atingirem a fase de crescimento exponencial ($\text{DO}_{600} \sim 0,5$), as bactérias foram diluídas novamente, agora para uma $\text{DO}_{600} = 0,1$ em 400 μl de meio TGP1 fresco contendo 100 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{32}Pi . As bactérias foram cultivadas por 1-2 h para equilibrar o *pool* de moléculas marcadas e não-marcadas com ^{32}Pi . Para a medição

do nível basal de ppGpp, amostras de 20 µl das culturas foram retiradas e ressuspensas em 10 µl de ácido fórmico 11 M gelado. Para induzir a carência de aminoácidos, 1 mg/ml de hidroxamato de serina (HS), que é um inibidor competitivo de serina, foi adicionado à cultura remanescente e a partir desse momento as amostras foram coletadas a cada hora e processadas conforme descrito acima. O sobrenadante era mantido a -20 °C até que as amostras fossem submetidas à cromatografia de placa delgada. 5 µl de cada amostra foram aplicados à placas POLYGRAM® CEL 300 PEI (Macherey-Nagel). Como solvente de fase móvel 1,5 M KH₂PO₄ (pH 3,4) foi utilizado para separar os nucleotídeos na câmara de cromatografia. Assim que o solvente atingiu a extremidade superior da placa, a mesma foi retirada, seca à temperatura ambiente e analisada em um Phosphor-imager (Cyclone-Perkin Elmer). A quantidade de ppGpp foi estimada medindo a intensidade dos *spots* correspondentes a ppGpp e GTP, seguindo a fórmula: $Nivel\ de\ ppGpp = \frac{ppGpp}{GTP+ppGpp}$.

Para eliminar o excesso de polifosfato marcado radiativamente retido na origem da placa de TLC, em alguns casos as amostras ressuspensas em 11 M de ácido fórmico foram previamente fervidas durante 5 minutos e então centrifugadas a 13.000 RPM por 5 minutos a 4 °C.

3.16 Análise estatística

Todos os ensaios foram repetidos pelo menos 3 vezes, exceto pelo ensaio de medição de polifosfato em gel de agarose que foi realizado somente duas vezes. O desvio padrão foi calculado pela seguinte fórmula: $DESVPAD = \sqrt{\frac{\sum(X_i - X)^2}{n-1}}$, onde X é a média da amostra. E o desvio padrão da média foi calculado utilizando a seguinte fórmula: $DEVPADM = \frac{DESVPAD}{\sqrt{n}}$, conforme descrito em (51).

4 RESULTADOS

4.1 O mutante *phoU* de *P. aeruginosa*

Para caracterizar o gene *phoU* de *P. aeruginosa* foi construído um mutante nulo deste gene por meio da inserção do plasmídeo suicida pKNOCK-Gm. Os detalhes da construção do mutante *phoU* na cepa PA14 estão descritos no Item 3.4 da seção Materiais e métodos. A inserção de pKNOCK-Gm no gene *phoU* foi confirmada por PCR (Figura 6). Características fisiológicas observadas em mutantes deste mesmo gene em outras bactérias, como a constitutividade do *regulon* PHO (2), diminuição da taxa de crescimento (44) e maior captação de fosfato (31) foram observadas e serão descritas nesse capítulo.

Para confirmar a inserção, foi realizada a amplificação da região de *phoU* com os iniciadores PA-*phoU*-5171F e PA-pstCAB*phoU*-6086R, que são externos ao gene *phoU* (Figura 6).

Figura 6 – Confirmação da inserção de pKNOCK-Gm-*phoU* (pLG17) no gene *phoU* de PA14. Amplificação do gene *phoU* da cepa selvagem PA14 e do mutante *phoU*::pKNOCK-Gm utilizando os iniciadores PA-*phoU*-5171F e PA-pstCAB*phoU*-6086R. A reação de PCR do gene *phoU* selvagem é apresentada na primeira coluna denominada 'phoU WT'. De acordo com a anotação do genoma de PA14 o gene intacto possui 970 pares de base. Na terceira coluna denominada 'phoU mutante' é apresentado o gene *phoU* truncado após a inserção do plasmídeo pLG17, resultando em um fragmento de aproximadamente 2600 pares de base. O padrão de peso molecular 100-3000 está indicado na coluna do meio.

4.1.1 Efeito da mutação *phoU* sobre a taxa de crescimento e rendimento bacteriano

Foi observado que em *E. coli* a mutação no gene *phoU* causa uma defeito no crescimento, caracterizado por uma diminuição na taxa de crescimento e/ou no rendimento das culturas bacterianas em meio mínimo (44). Para verificar o efeito da mutação *phoU* sobre o crescimento de *P. aeruginosa*, curvas de crescimento com a bactéria PA14 selvagem, com seu mutante *phoU* e com o mutante *phoU* complementado com o plasmídio pLG13 (*pphoU*⁺) foram realizadas em meio definido TGP1. A Figura 7 mostra que o crescimento do mutante foi mais lento quando comparado com a cepa selvagem. As taxas de crescimento da bactéria selvagem, do mutante *phoU* e do mutante *phoU* transformado com pLG13 foram de 0,70 h⁻¹, 0,34 h⁻¹ e 0,60 h⁻¹, respectivamente.

Figura 7 – **Curva de crescimento em meio TGP1.** As bactérias foram cultivadas a 37 °C com agitação durante 16 horas em meio TGP1. Na manhã seguinte elas foram diluídas para uma DO₆₀₀ = 0.1 em meio TGP1 fresco e cultivadas durante 5 horas a 37 °C com agitação. Amostras foram coletadas a cada hora e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 600 nm. As taxas de crescimento de PA14, do mutante *phoU* e de pLG13 foram de 0.70 h⁻¹, 0.34 h⁻¹ e 0.60 h⁻¹ respectivamente. Cada curva representa a média de três ensaios independentes. As barras de erro mostram o desvio padrão da média.

Há relatos na literatura de que o mutante *phoU* de *E. coli* afeta apenas o rendimento da cultura. A Figura 8 mostra o rendimento das bactérias cultivadas durante 16 horas em meio TGP4 (meio mínimo suplementado com 4 mM de Pi) a 37 °C. É possível observar que o rendimento

do mutante *phoU* é inferior ao das demais bactérias. Portanto, tanto o rendimento quanto a taxa de crescimento foram afetados pela mutação *phoU*.

Figura 8 – **Rendimento das bactérias em meio TGP4.** As bactérias foram cultivadas durante 16 horas a 37 °C em meio TGP4 e em seguida a DO₆₀₀ foi medida. O resultado apresentado é a média de 3 ensaios independentes. A barra de erro mostra o desvio padrão da média.

4.1.2 Efeito da mutação *phoU* sobre a expressão do regulon PHO

Em *Escherichia coli*, mutações nulas em qualquer um dos genes do operon *pst* resultam na expressão constitutiva de todo o regulon PHO, mesmo na presença de altas concentrações de Pi (2). Para testar se a mutação *phoU* de *P. aeruginosa* também resulta na constitutividade do regulon PHO, o mutante *phoU* de PA14 foi estriado em uma placa de meio TGP (com excesso de Pi) suplementada com o substrato cromogênico da fosfatase alcalina (FA) 5-Bromo-4-cloro-3-indolyl fosfato (X-P).

O mutante *phoU* apresentou uma coloração azulada intensa quando comparado com a cepa selvagem, indicando a expressão constitutiva da FA em presença de excesso de Pi (Figura 9).

Figura 9 – **Constitutividade da FA no mutante *phoU***. Uma colônia de PA14 selvagem (C) e duas colônias distintas do mutante *phoU* (A e B) foram estriadas em placas de TGP1 contendo o substrato cromogênico X-P e mantidas a 37 °C durante 24 horas.

4.1.3 Efeito da mutação *phoU* sobre a captação de fosfato e acúmulo de polifosfato

Morohoshi *et al.* demonstraram que a mutação no gene *phoU* de *E. coli* e de *Synechocystis sp* resultou em um maior acúmulo de polifosfato por estas bactérias (30). Os experimentos a seguir foram realizados para verificar se o mutante *phoU* de *P. aeruginosa* também tem a capacidade aumentada de captação de Pi e de acúmulo de PPI. Estes experimentos também serviram de ponto de partida para a obtenção de uma bactéria super-acumuladora de polifosfato para o tratamento de águas residuárias.

4.1.3.1 Medição do fosfato remanescente no meio

Utilizando o método de microdeterminação de fosfato desenvolvido por Chen e colaboradores (49) é possível determinar a concentração de Pi remanescente no meio em que as bactérias foram cultivadas. A Figura 10 mostra a concentração de Pi remanescente no meio TGP4 após 16 horas de crescimento das culturas de bactérias. A primeira coluna do gráfico representa a quantidade de Pi presente no meio de cultura fresco utilizado no ensaio. O mutante *phoU*, consumiu quase que totalmente o fosfato do meio enquanto que o mutante *phoU* transformado com o plasmídio pLG13 (*pphoU*⁺) apresentou um nível de captação de Pi semelhante ao da bactéria selvagem.

É importante observar também que apesar do rendimento da cultura do mutante *phoU* ser menor que o da bactéria selvagem, o primeiro ainda assim captou muito mais fosfato quando comparado com a última.

Figura 10 – **Determinação de Pi remanescente no meio TGP4.** As bactérias foram cultivadas durante 16 horas e o fosfato remanescente foi medido pelo método de microdeterminação de Pi (49). O resultado apresentado é a média de três ensaios independentes. Os números acima de cada barra representam a média do rendimento das culturas de cada cepa medido através da DO_{600} . As barras de erro mostram o desvio padrão da média.

4.1.3.2 Acúmulo de polifosfato no mutante *phoU*

Para observar o destino do Pi captado pelo mutante *phoU*, foi testada a presença de PPI no interior das bactérias. O corante DAPI é amplamente utilizado como marcador de DNA (52). Porém, DAPI também interage com polifosfatos e ajustando os comprimentos de onda de emissão e excitação, é possível quantificar especificamente a concentração de polifosfato intracelular (50). Na Figura 11 é possível observar que o mutante *phoU* acumulou 3 vezes mais polifosfato quando comparado com a bactéria selvagem. Esse resultado sugere fortemente que o Pi captado pelo mutante *phoU* é armazenado na forma de polifosfato.

Uma outra metodologia de quantificação de polifosfato baseia-se na extração do polímero de bactérias cultivadas na presença de Pi radioativo (31). Neste ensaio as bactérias são cultivadas em meio TGP0.1 suplementado com 5 μCi de ^{32}P por duas horas. O polifosfato então é isolado e separado em gel de agarose alcalino. A Figura 12A mostra uma das imagens obtidas após

Figura 11 – **Quantificação do polifosfato acumulado nas bactérias coradas com DAPI.** As bactérias foram cultivadas durante 16 horas em meio TGP4 e então incubadas durante 20 minutos com DAPI em uma concentração final de 10 μ M. O polifosfato corado foi medido no fluorímetro com emissão de 415 nm e excitação de 550 nm. O resultado representa a média de três ensaios independentes e a barra de erro representa o desvio padrão da média.

a exposição do gel radioativo e a Figura 12B apresenta o resultado da quantificação dos *spots* radioativos referentes ao polifosfato. É possível observar que o mutante *phoU* acumulou três vezes mais polifosfato quando comparado com a bactéria selvagem ou com o mutante *phoU* transformado com o plasmídio pLG13, de forma similar ao observado no ensaio de coloração de polifosfato com DAPI (Figura 11).

Figura 12 – **Acúmulo de polifosfato em bactérias cultivadas com ^{32}P .** **A)** O mutante *phoU*, a cepa selvagem PA14 e o mutante *phoU* transformado com *pphoU*⁺ foram cultivados em meio TGP0.1 suplementado com 5 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{32}P durante duas horas. O polifosfato foi extraído com o Kit Wizard de purificação de DNA genômico (Promega) e separado em gel alcalino. O gel foi seco, exposto e lido no phosphor-imager. **B)** O polifosfato foi medido quantificando a intensidade luminosa (DLU) dos *spots* radioativos correspondentes. O resultado apresentado é uma média de dois ensaios independentes.

4.2 Relação entre o gene *phoU* e a resistência a estresses ambientais

4.2.1 O efeito de *phoU* sobre a sensibilidade a SDS

Bactérias como *E. coli* e *P. aeruginosa* habitam os mais diversos ambientes, entre eles os ambientes aquáticos e águas residuárias de estações de tratamento de esgotos, onde elas podem se deparar com a presença de detergentes, (53). Dodecil sulfato de sódio (SDS), assim como outros detergentes, age sobre a membrana citoplasmática das células, que é predominantemente composta por fosfolipídeos (54). Este experimento teve a finalidade de verificar se o mutante *phoU* de PA14 apresenta uma maior sensibilidade a SDS.

Nestes ensaios as bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar contendo 3% de SDS. Diluições seriadas foram feitas para que 10^5 , 10^4 e 10^3 bactérias fossem plaqueadas em cada *patch*.

A Figura 13 mostra que a bactéria selvagem PA14 apresentou maior resistência ao agente

estressante quando comparada ao mutante *phoU*. A introdução do plasmídio pLG13 no mutante *phoU* restaurou o fenótipo selvagem. Estes resultados sugerem que o gene *phoU* está envolvido no mecanismo de resistência a SDS.

Figura 13 – **Ensaio de sensibilidade a SDS.** As bactérias foram cultivadas em meio LB durante 16 horas a 37 °C. A DO_{600} foi medida e diluições seriadas foram feitas para se obter as concentrações de 10^7 , 10^6 e 10^5 bactérias por 1 ml. A partir deste ponto, 10 μ l de cada diluição foram plaqueados em placas de LB ágar contendo 3% de SDS. Os números 10^5 10^4 10^3 indicam o número de bactérias plaqueadas em cada ponto. Este experimento foi realizado 3 vezes e a figura representa um dos resultados obtidos.

4.2.2 O efeito de *phoU* sobre a sensibilidade ao estresse oxidativo

A prevenção da formação de espécies reativas de oxigênio a partir do peróxido de hidrogênio é função da enzima catalase. O ensaio a seguir foi realizado para verificar a resposta do mutante *phoU* de PA14 frente a presença de estresse oxidativo. Neste ensaio as bactérias foram semeadas em placas de LB ágar. Discos de papel de filtro previamente esterilizados foram embebidos em H_2O_2 . Estes discos foram colocados no centro de cada placa sobre o tapete de bactérias. Os halos formados em volta dos discos foram medidos após 24 horas de crescimento das bactérias a 37 °C. A Figura 14 apresenta o resultado do ensaio. A bactéria selvagem PA14 demonstrou maior resistência ao agente estressante quando comparada ao mutante *phoU*, sugerindo que este gene tem um papel importante para a sobrevivência da bactérias na presença de peróxido de hidrogênio. Possivelmente, *phoU* estaria atuando positivamente sobre a expressão

da catalase. A inserção do plasmídio pLG13 no mutante *phoU* restaurou o fenótipo selvagem.

Figura 14 – **Ensaio de sensibilidade a H_2O_2** . As bactérias foram cultivadas em meio LB durante 16 horas a 37 °C. Em seguida a DO_{600} foi medida e as bactérias foram então diluídas para a $DO_{600} = 1.0$. Após a diluição, as bactérias foram plaqueadas meio LB ágar e filtros de 20 mm de diâmetro contendo 8,9 M de H_2O_2 foram colocados sobre o tapete de bactérias. As placas foram mantidas a 37 °C durante 24 horas e os halos formados em volta dos filtros foram medidos com uma régua. O resultado apresentado representa a média de 3 ensaios independentes e a barra de erro representa o desvio padrão da média.

4.2.3 O efeito de *phoU* sobre a sensibilidade ao estresse osmótico

Com o intuito de verificar se o mutante *phoU* de PA14 também está envolvido na resistência ao estresse osmótico, as bactérias foram expostas a diferentes concentrações de KCl durante 4 horas (Figura 15).

PA14 selvagem demonstrou maior resistência às diferentes concentrações de KCl quando comparada ao mutante *phoU*. A introdução do plasmídio pLG13 no mutante *phoU* restaurou o fenótipo selvagem. Este resultado sugere que o gene *phoU* também está envolvido na resistência ao estresse osmótico

Figura 15 – **Ensaio de sensibilidade a altas concentrações de KCl.** As bactérias foram cultivadas em LB durante 16 horas a 37 °C. Em seguida a DO_{600} foi medida e então aproximadamente 300 bactérias foram inoculadas e mantidas em diferentes soluções contendo 1, 2, 3 ou 4 M de KCl durante 4 horas. Como controle, as bactérias foram inoculadas em 0.9% NaCl. Após as 4 horas de exposição ao agente estressante as bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar e em seguida incubadas a 37 °C durante 24 horas. O resultado apresentado é a média de 3 ensaios independentes e a barra de erro representa o desvio padrão da média.

4.3 Efeito de *phoU* sobre a sensibilidade a antibióticos

Foi demonstrado que o mutante *phoU* de *E. coli* é sensível a diversos antibióticos e que este gene poderia estar envolvido no fenômeno de persistência (39). É sabido também que *P. aeruginosa* possui uma elevada resistência intrínseca a antibióticos (55).

Para testar o efeito do mutante *phoU* de PA14 sobre a resistência intrínseca a antibióticos foi realizado um antibiograma com os antibióticos cefalotina, ciprofloxacina, eritromicina, aztreonama, vancomicina, ceftazidima, tetraciclina, sulfonamida, cloranfenicol, imipenema, rifampicina e amicacina. Neste ensaio foi possível observar que o mutante *phoU* se mostrou mais sensível aos antibióticos aztreonama, ceftazidima, tetraciclina, sulfonamida e rifampicina, evidenciado pelos maiores halos formados em volta dos discos de quase todos os antibióticos, com a exceção de eritromicina e ciprofloxacina, como mostra a Figura 16. Desta forma, é possível concluir que o gene *phoU* de *P. aeruginosa* tem importância na resistência a antibióticos, assim como demonstrado para *E. coli* (39).

Figura 16 – **Antibiograma realizado com as bactérias PA14 selvagem, PA14*phoU* e pLG13.** As bactérias foram cultivadas em meio LB durante 16 horas e em seguida semeadas em placas de meio Miller-Hinton. Discos contendo concentrações padrão de antibióticos foram colocados sobre as placas. Os antibióticos utilizados foram: tetraciclina (TET), ceftazidima (CEF), sulfonamida, eritromicina (ERI), ciprofloxacino (CIP), aztreonam (AZT), vancomicina (VAN) e imipenem (IMI). As placas foram mantidas a 37 °C durante 24 horas e os halos formados em torno dos discos foram medidos com uma régua. O resultado apresentado é uma média de 3 ensaios independentes e as barras de erro representam o desvio padrão da média.

4.4 Relação entre o gene *phoU*, ppGpp e o acúmulo de polifosfato

É sabido que (p)ppGpp promove o acúmulo de polifosfato em *E.coli*, pois este nucleotídeo inibe diretamente a atividade de PPX (37). Os resultados apresentados até aqui demonstram claramente que o mutante *phoU* de PA14 acumula mais polifosfato quando comparado com a bactéria selvagem.

Foi levantada a hipótese de que o maior acúmulo de polifosfato apresentado pelo mutante *phoU* poderia ser devido a presença de altas concentrações de (p)ppGpp nesta bactéria, que estaria consequentemente inibindo a atividade PPX. A fim de estabelecer a relação entre o gene *phoU*, ppGpp e o acúmulo de polifosfato em PA14, a concentração basal de ppGpp e o nível de polifosfato em bactérias cultivadas em meio TGP foram determinados. As bactérias foram cultivadas em TGP1 suplementado com 100 µCi/ml de ³²Pi por 5 horas. A cada hora, amostras de 10 µl foram coletadas e testadas para a presença de (p)ppGpp em cromatografia de placa delgada. Paralelamente, foram realizadas curvas de crescimento e ensaios de quantificação de

polifosfato com DAPI. A Figura 17 mostra o resultado destes ensaios. Podemos observar que o mutante *phoU* apresenta um nível de ppGpp basal significativamente maior, uma taxa de crescimento menor e um maior acúmulo de polifosfato quando comparado com a bactéria selvagem e com o mutante complementado com o plasmídio pLG13.

Figura 17 – **Relação entre *phoU*, polifosfato e ppGpp.** Foram feitos 3 ensaios paralelos com as bactérias PA14 selvagem, PA14 *phoU* e pLG13 transformado em PA14 *phoU*. **A) Medição de ppGpp:** as bactérias foram cultivadas durante 5 horas em meio TGP1 suplementado com 100 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{32}P . A cada hora alíquotas de 10 μl foram ressuspensas em 20 μl de 11 M ácido fórmico para então serem resolvidas em placas de TLC. O solvente de fase móvel utilizado foi 1,5 M KH_2PO_4 (pH 3,4). **B) Curva de crescimento:** as bactérias foram cultivadas em meio TGP1 durante 5 horas. A cada hora alíquotas de 1 ml foram retiradas para medir a absorbância a 600nm no espectrofotômetro. **C) Acúmulo de polifosfato:** as bactérias foram cultivadas em meio TGP1 durante 5 horas. Alíquotas de 1 ml foram retiradas a cada hora para serem coradas com DAPI. A leitura das amostras coradas foi feita no fluorímetro utilizando 415 nm de excitação e 550 nm de emissão. Todos os ensaios foram realizados 3 vezes e o resultado apresentado é a média destes ensaios. As barras de erro indicam o desvio padrão da média.

Para verificar se em *P. aeruginosa* o aumento de ppGpp também ocasiona o acúmulo de polifosfato, a síntese de ppGpp foi induzida pela presença de hidroxamato de serina (HS), que é um inibidor competitivo de serina. Podemos observar na Figura 18 que assim como foi relatado para *E. coli* (37), o repentino aumento no nível de ppGpp foi acompanhado por um aumento da concentração de polifosfato.

Tendo em vista estes resultados é possível concluir que os níveis de (p)ppGpp e o acúmulo

Figura 18 – **Relação entre ppGpp e o acúmulo de polifosfato.** As bactérias PA14 selvagem e PA14 + HS (bactéria selvagem cultivada em meio suplementado com 1 mg/ml de hidroxamato de serina após a primeira hora de crescimento) foram utilizadas para realizar os seguintes ensaios: **A) Medição de ppGpp:** as bactérias foram cultivadas durante 5 horas em meio TGP1 suplementado com 100 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{32}P . A cada hora alíquotas de 10 μl foram ressuspensas em 20 μl de 11 M ácido fórmico para então serem resolvidas em placas de TLC. O solvente de fase móvel utilizado foi 1,5 M KH_2PO_4 (pH 3,4). **B) Curva de crescimento:** as bactérias foram cultivadas em meio TGP1 durante 5 horas. A cada hora alíquotas de 1 ml foram retiradas para medir a absorbância a 600 nm no espectrofotômetro. **C) Acúmulo de polifosfato:** as bactérias foram cultivadas em meio TGP1 durante 5 horas. Alíquotas de 1 ml foram retiradas a cada hora para serem coradas com DAPI durante 20 minutos. A leitura das amostras coradas foi feita no fluorímetro utilizando 415 nm de excitação e 550 nm de emissão. No tempo 1 h, 1 mg/ml de HS foi adicionado ao meio de cultura. Todos os ensaios foram realizados 3 vezes e o resultado apresentado é a média destes ensaios. As barras de erro indicam o desvio padrão da média.

de polifosfato são fenômenos que estão intimamente correlacionados. É possível afirmar que o mutante *phoU* acumula grandes quantidades de polifosfato, pelo menos em parte, devido a maior presença de (p)ppGpp nesta bactéria.

4.5 Análise do transcrito do operon *pst*

O operon *pst* codifica para um transportador de Pi de alta afinidade. Em *Pseudomonas aeruginosa* o primeiro gene do operon, *pstS* se encontra na mesma orientação que os demais genes do operon, porém separado por 423 pares de base dos genes distais *pstC-pstA-pstB-phoU*. Uma análise da sequência do operon identificou promotores (PHO-boxes) a montante de *pstS* e também a montante de *pstCAB-phoU* (20) (Figura 19).

Figura 19 – Esquema representativo do operon *pst* de *P. aeruginosa*

Este experimento foi realizado para verificar se o gene *pstS* forma um operon com os demais genes distais de *pst*, ou se são unidades transcricionais independentes. PA14 foi cultivada em condições de excesso ou limitação de Pi, o RNA total foi extraído e submetido a um ensaio de RT-PCR com um par de iniciadores correspondentes a porção 3' de *pstS* e ao 5' de *pstC*. A Figura 20 mostra um produto de 636 bp correspondente a um molécula de mRNA que vai desde a extremidade 3' de *pstS* até a extremidade 5' de *pstC*. Nos controles negativos, aos quais não foi adicionada transcriptase reversa, não foi detectado produto de PCR. Isto sugere que *pstS* e *pstC* são transcritos em uma única molécula de mRNA, e que consequentemente, assim como ocorre em *E. coli* (56), deve haver um transcrito que engloba todos os cinco genes - *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB* e *phoU*. Apesar do ensaio não ser quantitativo, é possível observar que o produto de PCR obtido com bactérias cultivadas em limitação de Pi apresentou maior intensidade quando comparado com o de bactérias cultivadas em excesso de Pi. Isto é esperado, uma vez que o operon *pst* é induzido em limitação de Pi.

Figura 20 – **Padrão de transcrição do operon *pst* de *P. aeruginosa*.** RT-PCR com RNA extraído de bactérias cultivadas em meio limitado (-Pi) e não limitado em Pi (+Pi) e com *primers* correspondentes a extremidade 3' de *pstS* e 5' de *pstC*. O controle (C) representa amostras em que a enzima transcriptase reversa não foi adicionada à reação.

4.6 Evolução do mutante *phoU* em cultura contínua limitada em fosfato

Conforme mostrado acima, o mutante *phoU* de *P. aeruginosa* tem uma grande capacidade de captar Pi do meio e de acumular PPI. Porém, isso não impede que o nível de acúmulo de PPI não possa ser ainda mais incrementado. Além disso, o mutante *phoU* de PA14 é bastante sensível a estresses ambientais, o que seria uma desvantagem se o mesmo fosse utilizado para a remoção de Pi em estações de tratamento de esgotos. Com o objetivo de melhorar ainda mais a capacidade de armazenamento de PPI e reduzir a sensibilidade do mutante *phoU* em relação a estresses, este foi submetido a treze dias de crescimento contínuo em um quimiostato limitado em fosfato (30 μM KH_2PO_4) a uma taxa de diluição de 0,1 h^{-1} . Amostras foram coletadas diariamente e testadas em relação a turbidez da cultura (DO_{600}) e a concentração de bactérias viáveis (UFC/ml), que se manteve estável durante todo esse período. Oitenta e quatro colônias isoladas do quimiostato do dia 13 foram testadas em relação a capacidade de captação de Pi pelo método descrito na Seção 3.7. Destes, os isolados E4, E9, C3 e D8 foram os únicos que apresentaram captação de Pi similar ou superior a do mutante *phoU*, como mostra a Figura 21. O isolado D8 não repetiu o mesmo desempenho em ensaios individuais de captação de Pi realizados posteriormente e por isso foi descartado e não foi testado nos experimentos seguintes.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0,18	0,32	1,24	0,52	0,34	0,25	0,23	0,97	0,37	0,34	0,40	0,14
B	0,34	0,50	0,49	0,45	0,17	0,52	0,54	0,47	0,46	0,51	0,55	0,28
C	0,37	0,60	1,83	0,52	0,67	0,81	0,68	0,59	0,46	0,71	0,72	1,22
D	0,84	1,33	1,34	0,87	0,93	1,09	0,88	1,78	1,55	1,74	1,44	0,90
E	0,88	1,09	1,58	1,96	0,90	0,75	0,85	0,70	2,10	0,79	1,00	0,63
F	1,30	0,78	0,79	0,63	0,73	1,12	1,21	0,70	0,64	1,06	0,93	0,68
G	1,37	1,34	0,70	0,60	0,61	0,67	0,63	0,65	0,74	0,66	0,63	0,54
H	0,42	0,61	0,58	1,61	1,54	1,78	0,90	0,63	0,56			
		0,54			1,65			0,70				
		PA14 W.T			PA14 <i>phoU</i>			MG1655				

Figura 21 – **Captação de Pi pelos isolados do quimiostato em meio TGP1.** As bactérias foram cultivadas durante 16 horas a 37 °C em meio TGP1 e em seguida testadas em relação a concentração de células e o Pi remanescente em cada cultura. Os valores da tabela representam: $Pi\ captado = \frac{(Pi\ inicial - Pi\ final)}{DO_{600}}$.

4.6.1 Rendimento, captação de fosfato e acúmulo de polifosfato nos isolados do quimiostato

Os ensaios a seguir foram feitos para comparar os isolados do quimiostato com a cepa ancestral (PA14 *phoU*::pKNOCK-Gm) quanto ao rendimento, à captação de fosfato e ao acúmulo de polifosfato, a fim de verificar se os isolados mantiveram ou até mesmo aprimoraram essas características.

Estes ensaios foram feitos utilizando a mesma metodologia empregada para caracterizar o mutante *phoU* de PA14 descrita no Capítulo 3.

Os resultados apresentados na Figura 22 mostram que o rendimento dos três isolados foi maior, mesmo que sutilmente, quando comparados a cepa ancestral (PA14 *phoU*). Foi também possível observar que os isolados continuaram a captar elevadas quantidades de Pi. Já em relação ao acúmulo de polifosfato, o isolado E4 demonstrou uma baixa eficiência, enquanto E9 e C3 continuaram a apresentar um alto padrão de armazenamento de PPi.

Figura 22 – **Ensaios de rendimento, captação de fosfato e acúmulo de polifosfato realizado com os isolados do quimiostato.** **A) Rendimento:** Os isolados e a cepa ancestral (*phoU*) foram cultivados durante 16 horas a 37 °C em meio TGP4 e em seguida a DO₆₀₀ foi medida. O resultado apresentado é a média de 3 ensaios independentes e foi comparado ao rendimento do mutante *phoU*. A barra de erro mostra o desvio padrão da média. **B) Captação de Pi:** Os isolados e a cepa ancestral foram cultivados durante 16 horas e o fosfato remanescente foi medido pelo método de microdeterminação de Pi. O resultado apresentado é a média de três ensaios independentes. As barras de erro mostram o desvio padrão da média. **C) Quantificação de polifosfato - método de DAPI:** Os isolados e a cepa ancestral foram cultivados durante 16 horas em meio TGP4 e então incubados durante 20 minutos com DAPI em uma concentração final de 10 µM. O polifosfato corado foi medido no fluorímetro com emissão de 415 nm e excitação de 550 nm. O resultado representa a média de três ensaios independentes e a barra de erro representa o desvio padrão da média. **D) Quantificação de polifosfato - método radioativo:** Os isolados e a cepa ancestral foram cultivados em meio TGP0.1 suplementado com 0.2% de ácido casamino e 5 µCi/ml de ³²P durante duas horas. O polifosfato foi extraído, separado em gel alcalino e quantificado. O resultado representa uma média de dois ensaios independentes.

4.6.2 Resistência aos estresses osmótico e oxidativo dos isolados

Para verificar se os isolados do quimiostato apresentavam características fisiológicas semelhantes a do mutante *phoU* frente aos estresses ambientais, realizamos com os isolados E4, E9 e C3 ensaios com os mesmos agentes estressantes e nas mesmas condições já descritas na Seção 4.2. Como podemos ver na Figura 23, os isolados do quimiostato apresentaram uma resistência semelhante à da bactéria selvagem nos ensaios de estresse osmótico e oxidativo. Ou seja, surpreendentemente, a resistência a estresses foi recuperada nos isolados quando comparados

à cepa ancestral PA14 *phoU*. O isolado C3 se mostrou mais resistente ao estresse osmótico e o isolado E9 apresentou uma maior resistência perante o estresse oxidativo.

Figura 23 – **Efeito dos estresses ambientais nos isolados do quimiostato** **A) Estresse osmótico** - As bactérias foram cultivadas em LB durante 16 horas a 37 °C. Em seguida a DO_{600} foi medida e aproximadamente 3000 bactérias foram incubadas em diferentes soluções contendo 1, 2, 3 ou 4 M de KCl durante 4 horas. Como controle as bactérias foram inoculadas em 0.9% NaCl. Após as 4 horas de exposição ao agente estressante as bactérias foram plaqueadas em meio LB ágar e em seguida incubadas a 37 °C durante 24 horas. O resultado apresentado é a média de 3 ensaios independentes e a barra de erro representa o desvio padrão da média. **B) Estresse oxidativo** - Os isolados foram cultivados em meio LB durante 16 horas a 37 °C. Em seguida a DO_{600} foi medida e as bactérias foram todas diluídas para a $DO_{600} = 1.0$. Após a diluição as bactérias foram plaqueadas meio LB ágar e filtros de 20 mm de diâmetro contendo 8.9 M de H_2O_2 foram colocados sobre o tapete de bactérias. As placas foram mantidas a 37 °C durante 24 horas e os halos formados em volta dos filtros foram medidos com uma régua. O resultado apresentado é uma média de 3 ensaios independentes e a barra de erro representa o desvio padrão da média.

4.6.3 Efeito do SDS nos isolados do quimiostato

Neste ensaio as bactérias foram plaqueadas em *patches* em meio LB ágar, assim como foi feito com a bactéria PA14 selvagem e o mutante *phoU* na Seção 4.2.

A Figura 24 mostra que os isolados E4 e C3 apresentaram sensibilidade semelhante a do mutante *phoU*, porém o isolado E9 mais uma vez mostrou uma resistência aumentada, adquirindo um fenótipo mais próximo ao da bactéria selvagem.

Figura 24 – **Efeito de SDS sobre a sobrevivência dos isolados:** Os isolados foram cultivados em LB durante 16 horas a 37 °C. Em seguida a densidade óptica foi medida e então diluições seriadas foram feitas para se obter concentrações de 10^7 , 10^6 e 10^5 . A partir deste ponto, 10µl de cada diluição foram plaqueados em *patches* sobre LB ágar contendo 3% de SDS. Os números 10^5 10^4 10^3 indicam a quantidade de bactérias plaqueadas em cada ponto.

4.6.4 Sensibilidade a antibióticos nos isolados do quimiostato

O mutante *phoU* demonstrou ser mais sensível em relação a maioria dos antibióticos testados, conforme mostrado na Figura 16. O mesmo ensaio foi realizado com os isolados C3, E4 e E9 a fim de verificar a resistência dos mesmos aos antibióticos. Neste ensaio é possível observar que os isolados apresentaram um fenótipo diferente do mutante *phoU*, pois se mostraram ser menos sensíveis à ação da maioria dos antibióticos testados (Figura 25), com um nível de resistência similar ao da cepa selvagem PA14.

Figura 25 – **Sensibilidade a antibióticos nos isolados do quimiostato:** As bactérias foram cultivadas em meio LB durante 16 horas e em seguida semeadas em placas de meio Miller-Hinton. Discos contendo concentrações padrão de antibióticos foram colocados sobre as placas. Os antibióticos utilizados foram: tetraciclina (TET), ceftazidima (CEF), sulfonamida, eritromicina (ERI), ciprofloxacina (CIP), aztreonam (AZT), vancomicina (VAN) e imipenem (IMI). As placas foram mantidas a 37 °C durante 24 horas e os halos formados em torno dos discos foram medidos com uma régua. O resultado apresentado é uma média de 3 ensaios independentes e as barras de erro representam o desvio padrão da média.

5 DISCUSSÃO

5.1 PhoU como repressor do regulon PHO

Até o presente momento diversas funções já foram atribuídas ao gene *phoU*. A única função que parece estar bem estabelecida é que PhoU atuaria como repressora do regulon PHO. Embora o mecanismo detalhado ainda não tenha sido estabelecido, algumas hipóteses foram propostas:

- 1) PhoU modularia as funções de fosfatase e quinase da proteína PhoR (57, 43, 44, 42);
- 2) O gene *phoU* codificaria para uma sub-unidade de um repressor de *phoB* (45);
- 3) PhoU interagiria diretamente com PstB ou poderia ser uma enzima que sintetiza uma pequena molécula sinalizadora que inibiria a expressão de PHO (30, 43).

Em *P. aeruginosa* foi demonstrado que o gene *phoU* está envolvido na regulação negativa da captação de Pi e também é responsável pela regulação da expressão de FA (58). A função repressora de *phoU* de *P. aeruginosa* foi corroborada no presente estudo.

5.2 O gene *phoU* e o crescimento bacteriano

Steed e Wanner (1993) sugeriram que o gene *phoU* de *E. coli* estaria associado ao crescimento normal da bactéria e demonstraram que a deleção desse gene ocasionou uma deficiência na taxa de crescimento (44). O mesmo foi observado por Morohoshi et.al, que ao isolarem mutantes *phoU* de *E. coli*, observaram que esses apresentavam uma taxa de crescimento relativamente menor em relação a cepa selvagem (30).

Por outro lado, outros trabalhos mostram que apenas o rendimento da cultura é afetado e não a taxa de crescimento. Rice et.al (2009) mostrou que mutantes *phoU* de *E. coli* não têm a sua taxa de crescimento afetada mas entram em fase de crescimento estacionário com uma menor densidade celular quando comparados com a cepa selvagem. Este resultado também foi observado em outro trabalho (59).

Nos resultados apresentados na Seção 4.1.1 foi possível observar e concluir que a mutação no gene *phoU* de *P. aeruginosa* afeta tanto a taxa de crescimento quanto o rendimento. Esta diferença em relação ao que foi observado em *E. coli* pode ser explicada por se tratar de gêneros bacterianos distintos. Devemos também levar em consideração que mesmo em *E. coli*, os resultados variaram entre laboratórios.

É sabido ainda que mutações no gene *phoU* de *E. coli* podem resultar na seleção de mutações secundárias compensatórias. Estas mutações podem ocorrer em *phoB*, que levaria a inativação

de todo o regulon PHO, ou ainda nos genes *pstSCAB* que inativariam o transporte de Pi via Pst (44, 43). No estudo aqui apresentado é pouco provável que estas mutações secundárias tenham ocorrido, pois todas as características do mutante *phoU* de PA14 foram complementadas com o plasmídeo pLG13 (*p_{phoU}⁺*). Além disso nosso mutante foi mantido em -80 °C e sempre semeado em meio de cultura suplementado com X-P e gentamicina para verificar que o regulon PHO esteja sendo expresso de forma constitutiva e mantendo a inserção de pKNOCK-Gm no cromossomo da bactéria.

5.3 O gene *phoU* e a captação de fosfato

Em *E. coli* e em *P. aeruginosa* Pi é captado principalmente por duas vias distintas. Uma via de baixa afinidade por Pi (Pit) e outra que possui alta afinidade por fosfato (Pst) (1, 60, 2). Foi demonstrado em *E. coli* que o aumento da expressão de *pstSCAB* pode remover até 3 vezes mais Pi do meio quando comparado com a cepa selvagem (7). Já em *P. aeruginosa*, a super-expressão de *pstCAB* não resultou em maior captação de Pi do meio (20).

A eliminação do gene *phoU* de *E. coli* e de *Synechocystis sp.* mostrou que, mesmo apresentando uma taxa de crescimento relativamente baixa, os mutantes removeram, respectivamente, duas e quatro vezes mais fosfato do meio quando comparados com a cepa selvagem (30).

Estudos com o mutante *phoU* de *E. coli* denominado *phoU35* (no qual houve a substituição de uma alanina por um glutamato na posição 147 da proteína) mostraram que este apresenta um fenótipo PHO-constitutivo, mas que não afeta o crescimento nem o transporte de Pi via Pst (44).

Os resultados apresentados no presente estudo mostram que o mutante *phoU* nulo de PA14, apesar de apresentar uma baixa taxa de crescimento e um menor rendimento, removeu aproximadamente 3 vezes mais fosfato do meio quando comparado com a cepa selvagem. Estes resultados são semelhantes aos resultados apresentado por Morohoshi et.al (2002) em relação a *E. coli*, embora o impacto causado pela mutação do gene *phoU* no crescimento de PA14 seja mais evidente (30).

Conforme já mencionado, PhoU reprime a expressão dos genes do regulon PHO, inclusive do operon *pst*. A inativação do gene *phoU* levaria à expressão constitutiva de *pstSCAB*, consequentemente aumentando a captação de fosfato. Porém, a super-expressão do sistema Pst nem sempre resulta em maior captação de Pi (20).

5.4 O gene *phoU* e o acúmulo de polifosfato

A proteína PPK, que está associada a membrana celular em *E. coli* e em *P. aeruginosa*, catalisa reversivelmente a síntese de PPi a partir do fosfato terminal da molécula de ATP (27, 61).

Kato et.al (1993) demonstrou que a expressão aumentada de PPK no interior de *E. coli* levou a um maior acúmulo de PPi. O autor sugere que *ppk* estaria sob a influencia positiva do regulon PHO, uma vez que regiões similares a PHO-boxes foram encontradas na região promotora deste gene (7).

O estudo realizado por Morohoshi et.al (2002) mostrou que o mutante *phoU* de *E. coli* capta mais Pi do que a cepa selvagem e o nível de captação foi grandemente aumentado quando o mutante *phoU* foi transformado com um plasmídio que super-expressa *ppk* (30). Foi também demonstrado que o aumento nos níveis de PPK em *P. aeruginosa* incrementou o acúmulo de polifosfato em até 100 vezes (62).

Os resultados apresentados nas Figuras 11 e 12 mostram que o mutante *phoU* de PA14 acumulou aproximadamente 3-5 vezes mais polifosfato que a cepa selvagem. Não foi observado um aumento drástico no acúmulo de PPi como o reportado para o mutante *phoU* de *E. coli* (30). Isso pode ser explicado pelo fato de que a cepa selvagem PA14 já acumula muito mais PPi do que a *E. coli* selvagem (63).

Para explicar o fato de que o mutante *phoU* acumula mais polifosfato, poderia-se argumentar que *ppk* faz parte do regulon PHO, portanto a mutação em *phoU* ocasionaria a expressão constitutiva de *ppk*. No entanto, esta hipótese pode ser descartada, uma vez que não foi observado aumento nos níveis de PPK em carência de Pi (30).

A seguir foi proposta uma nova hipótese para explicar este aumento tanto na captação de Pi quanto no acúmulo de PPi.

5.5 O gene *phoU* e sua relação com ppGpp e o acúmulo de polifosfato

É sabido que o aumento nos níveis de ppGpp se deve a chamada resposta severa, que ocorre quando bactérias enfrentam alguma situação de estresse ou carência nutricional. A síntese de DNA, RNAs estáveis e proteínas de membrana dão lugar rapidamente à produção de aminoácidos e fatores cruciais para a resistência a estresses (32).

Está clara a relação entre ppGpp e o acúmulo de polifosfato, embora o mecanismo exato que

descreve este fenômeno ainda não esteja totalmente elucidado. O aumento nos níveis de ppGpp levou ao acúmulo de PPi em *E. coli* (37) e em *P. aeruginosa* (Este estudo). Mutantes incapazes de produzir ppGpp ainda mostraram-se deficientes no acúmulo de polifosfato (37, 64).

Uma explicação plausível para estes fatos foi demonstrada através de ensaios *in vitro* realizados em *E. coli* onde a atividade de PPX e PPK foi medida após a adição de concentrações crescentes de ppGpp. A atividade de PPX caiu quase 100 vezes após a adição de 100 μ M de ppGpp, enquanto a atividade de PPK não foi alterada (37). A Figura 26 mostra um esquema dessa interação.

Figura 26 – **Efeito de ppGpp sobre PPX em *E. coli*:** A proteína PPX tem a ação inibida diretamente por (p)ppGpp. A síntese de (p)ppGpp pode ser via RelA em resposta à carência de aminoácidos ou via SpoT em resposta a outros tipos de estresse, como a carência de Pi. SpoT é uma proteína bifuncional, responsável pela hidrólise de ppGpp em GDP. Este último pode ser transformado em GTP pela proteína nucleosídeo difosfato quinase (Ndk). GppA é a fosfatase que converte pppGpp em ppGpp. Adaptado de (37)

Foi sugerido, porém ainda não demonstrado, que assim como em *E. coli*, ppGpp inibiria a ação da PPX de *P. aeruginosa*, uma vez que os promotores de *ppx* e *ppk* não mostraram qualquer sinal de regulação em resposta a estresses (24).

Os resultados apresentados na Figura 18 sugerem que ppGpp está envolvido no acúmulo de PPi em *P. aeruginosa* assim como foi observado em *E. coli*. Por outro lado, o mutante *phoU* apresentou concentrações significativamente maiores de ppGpp desde a primeira hora, quando comparadas com a bactéria selvagem (Figura 17). A concentração elevada de ppGpp pode ex-

plicar a baixa taxa de crescimento e o maior acúmulo de polifosfato (35, 37).

A hipótese levantada no presente estudo é a de que PhoU estaria reprimindo de alguma forma a concentração de ppGpp na célula. Na ausência desta proteína os níveis de ppGpp aumentariam e consequentemente este inibiria a atividade de PPX. Isso resultaria em um aumento nos níveis de polifosfato.

Uma pergunta que resta ser respondida refere-se ao mecanismo pelo qual PhoU estaria afetando o nível de ppGpp. A proteína PhoU seria uma hidrolase que agiria diretamente sobre ppGpp? O produto de *phoU* agiria indiretamente sobre o *pool* de ppGpp inibindo ou ativando *relA* ou *spoT*? Ou simplesmente, a diminuição na taxa de crescimento do mutante *phoU* é que seria responsável pelo aumento de ppGpp, uma vez que os níveis deste nucleotídeo são modulados pela taxa de crescimento da bactéria (65). Apesar desta última hipótese aparentar ser a mais plausível, é preciso frisar que nem todo estresse que causa aumento de ppGpp resulta em acúmulo de PPi, haja visto que a carência de carbono causa depleção de PPi (62).

Li e Zhang (2007) realizaram uma análise de microarranjo comparando o mutante *phoU* com a cepa selvagem W3110 de *E. coli*. Conforme esperado, genes envolvidos no metabolismo de fosfato foram induzidos no mutante *phoU*. Porém uma gama muito maior de genes tiveram a sua expressão aumentada quando *phoU* foi deletado. Entre esses, genes envolvidos na produção de energia(*atpB*), transportadores de membrana de diversos nutrientes (*proV*, *proW*, *livG*, *secG*, *cusF*) e também *spoT* (39).

PhoU estaria, portanto, modulando a concentração de ppGpp através da regulação da expressão da proteína bifuncional SpoT. É possível também que na ausência de *phoU*, a função de sintetase de SpoT seja predominante sobre a sua função hidrolítica, resultando em um aumento no nível de ppGpp. A Figura 27 apresenta um esquema do mecanismo proposto.

Figura 27 – **Esquema representativo da proposta de modulação de SpoT por PhoU:** **A)** Quando em condições de suficiência de fosfato, PhoU se ligaria (ou sinalizaria) a SpoT para ativar a sua atividade hidrolítica sobre ppGpp. Em condições de carência de fosfato PhoU não se ligaria (ou sinalizaria) a SpoT. Esta proteína passaria a assumir a função de sintetase de ppGpp. **B)** Na ausência de PhoU, tanto em suficiência ou carência de fosfato, SpoT favoreceria a função de sintetase de ppGpp.

5.6 Análise do transcrito do operon *pst*

Apesar de ter sido identificada uma sequência PHO-box na região a montante de *pstCAB-phoU* (20), o resultado apresentado na Figura 20 sugere que *pstS* e *pstC* são transcritos em uma única molécula de mRNA.

Quando foi realizada a primeira análise molecular do operon *pst* de *P. aeruginosa*, não foi encontrada uma sequência correspondente ao gene *pstS* (20). Porém Poole e Hanoc (1984) já haviam identificado uma proteína periplasmática que se liga a fosfato e possui uma alta afinidade pelo mesmo, na época denominada *phoS* (60).

O promotor encontrado a montante de *pstC* em *P. aeruginosa* teve sua atividade aumentada em 15 vezes em carência de fosfato (20).

A fim de verificar se outros sistemas de transporte do tipo ABC, já descritos em *P. aeruginosa*, também apresentam esta característica de possuir um promotor forte na região intergênica de genes pertencentes a um mesmo operon, foi comparada a disposição dos operons *phuSTUVW* e *znuABC*, responsável pela captação e transporte de ferro e zinco, respectivamente (66, 67). Os modelos apresentados mostram que estes operons, diferentemente do operon *pstSCAB-phoU*, não possuem promotores entre regiões intergênicas. Apesar do operon *pst* de *E.coli* conter dois

PHO-boxes a montante de *pstS* e nenhuma outra cópia mais, foram detectados promotores regulares (-10 e -35) a montante de *pstC*, *pstB* e *phoU* (68). A presença de promotores internos no operon *pst* estaria auxiliando na expressão dos genes distais, e poderia ser uma adaptação necessária para o aprimoramento do transporte de Pi, especialmente no caso de *P. aeruginosa* que é capaz de habitar ambientes extremamente limitados em nutrientes (16).

5.7 Relação entre *phoU* e resistência a estresses ambientais e antibióticos

Acumular polifosfato se mostrou essencial para bactérias enfrentarem os mais variados estresses ambientais, como o estresse osmótico, carência de aminoácidos e radiação UV (69, 70, 71, 64). O acúmulo de PPi também se mostrou importante na virulência, na motilidade e na formação de biofilmes (61).

Li e Zhang (2007) mostraram que PhoU está envolvida no fenômeno da persistência, pois o mutante *phoU* apresentou uma suscetibilidade elevada a antibióticos e a estresses ambientais. Os autores sugerem que a função de PhoU é de um regulador negativo global e não apenas do regulon PHO(39).

Os resultados apresentados nas Seções 4.2 e 4.3 mostraram que o mutante *phoU* de PA14 é mais suscetível a estresses ambientais e a antibióticos. Estes resultados corroboram a hipótese de que PhoU é um regulador global.

É possível que o mutante *phoU* não consiga regular seu metabolismo de forma eficaz, comportando-se como uma célula super ativa. Esta hiperatividade metabólica tornaria o mutante mais sensível a estresses pois a bactéria perderia a habilidade de diminuir seu metabolismo e priorizar a indução de genes de sobrevivência.

Para compensar esta deficiência, a bactéria acumularia mais polifosfato e ppGpp, que estão diretamente envolvidos na resistência a estresses e na resposta severa, respectivamente.

Foi demonstrado que em excesso de fosfato, quando a concentração de PhoU é apenas basal, as bactérias são mais suscetíveis a antibióticos e estresses ambientais, enfatizando ainda mais a importância de *phoU* no fenômeno da persistência e na regulação global (39).

Uma possível correlação entre *phoU* e a persistência pode ser observada em *Mycobacterium tuberculosis*, microrganismo conhecido por ser altamente persistente (72), esta bactéria sintetiza duas proteínas homólogas a PhoU, PhoY1 e PhoY2 (73).

5.8 Isolados do quimiostato

Após 13 dias de evolução do mutante *phoU* de PA14 em cultura contínua, foram testadas mais de uma centena de isolados diferentes com a intenção de obter uma bactéria super-accumuladora de polifosfato. É interessante observar que a grande maioria dos isolados testados perderam a habilidade de retirar grandes quantidades de fosfato do meio (Figura 21). Uma possível explicação para esse fato se baseia no estudo de Seed e Wanner (1993) mostrando que mutantes $\Delta phoU$ de *E. coli* tendem a acumular mutações compensatórias em outros genes do operon *pst* ou em *phoB* (44). Hirota et.al (2013) também observou este mesmo fenômeno e estudou pseudorevertentes que continuaram a acumular altas quantidades de polifosfato e reverteram a deficiência no crescimento (59). Porém, analisando os resultados de crescimento, captação de fosfato, acúmulo de polifosfato e resistência a estresses ambientais (Capítulo 4), podemos verificar diferenças significativas nos fenótipos dos isolados em relação a cepa ancestral. O isolado E9 se destacou nos ensaios de resistência aos estresses oxidativo, osmótico e a presença de SDS pois se assemelhou muito mais com a bactéria selvagem do que com o mutante *phoU*. Os isolados E4 e C3 apresentaram pouca melhora no ensaio de sensibilidade a SDS, porém se mostraram altamente resistentes ao estresse osmótico.

No ensaio de polifosfato marcado com ^{32}P , o isolado C3 aparentemente acumulou mais polifosfato do que as demais cepas (Figura 22). Mas como essa técnica requer uma maior manipulação das amostras, é possível que em alguma etapa do protocolo uma quantidade significativa de polifosfato tenha se perdido.

O isolado E4 continuou a captar grandes quantidades de fosfato porém falhou em acumular polifosfato. Uma questão interessante seria a do destino do fosfato captado.

Na última década foi descoberta uma segunda polifosfatoquinase (PPK2) em *P. aeruginosa* e em outras bactérias (74, 75). Esta enzima pode sintetizar PPi a partir de ATP ou GTP. No entanto PPK2 prefere catalisar a reação inversa, de PPi para GTP (75 vezes mais), enquanto a catalise reversa de PPK1 é apenas 1/4 da reação de formação de PPi (62). Os isolados do quimiostato podem ter sofrido as mais diversas mutações, inclusive esta favorecendo a ação de PPK2, uma vez que o mutante *phoU* mostrou sofrer mutações compensatórias em curtos intervalos de tempo (59). O GTP é de grande importância fisiológica e clínica para *P. aeruginosa*, pois este, associado a proteína Ndk, são necessários para a síntese de alginato, um exopolissacarídeo essencial para a formação de biofilmes e consequentemente ligado a virulência da bactéria (76, 77). Assim, o GTP formado pela ação da enzima PPK2 seria utilizado na síntese

de alginato.

Foram feitas duas tentativas de sequenciar o genoma dos isolados na plataforma SOLID em busca de mutações pontuais (SNPs) que pudessem explicar os fenótipos observados, porém a cobertura de *reads* foi muito baixa, provavelmente devido ao alto conteúdo de GC (cerca de 66%) presente no DNA de *P. aeruginosa*.

6 CONCLUSÕES

- A mutação *phoU* em PA14 afetou negativamente a taxa de crescimento e o rendimento das bactérias.
- A mutação do gene *phoU* de PA14 ocasionou um aumento na captação de Pi, um maior acúmulo de PPi e elevou os níveis basais de ppGpp.
- O mutante *phoU* é mais sensível a estresses ambientais e a diversos antibióticos.
- Os isolados do quimiostato captam pelo menos tanto fosfato quanto o mutante *phoU*, não aparentam deficiência no crescimento e são mais resistentes a estresses ambientais.
- PhoU apresenta vários indícios de ser uma proteína reguladora global.

REFERÊNCIAS*

- 1 KATO, J.; ITO, A.; NIKATA, T. Phosphate taxis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*, v. 174, p. 5149–5151, ago. 1992.
- 2 WANNER, B. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. *Escherichia coli and Salmonella*, p. 1357–1381, 1996.
- 3 WANNER, B.; METCALF, W. Molecular genetic studies of a 10.9-kb operon in *Escherichia coli* for phosphonate uptake and biodegradation. *FEMS microbiology letters*, v. 100, n. 1-3, p. 133–139, 1992.
- 4 RAO, N.; TORRIANI, A. Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, v. 4, n. 7, p. 1083–1090, 1990.
- 5 STOCK, J.; NINFA, A.; STOCK, A. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, v. 53, n. 4, p. 450, 1989.
- 6 KURODA, A.; KUNIMOTO, H.; MOROHOSHI, T. Evaluation of phosphate removal from water by immobilized phosphate-binding protein PstS. *Journal of bioscience and bioengineering*, v. 90, p. 688–690, 2000.
- 7 KATO, J. et al. Genetic improvement of *Escherichia coli* for enhanced biological removal of phosphate from wastewater. *Applied and environmental microbiology*, v. 59, p. 3744, 1993.
- 8 BAEK, J.; LEE, S. Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, v. 264, n. 1, p. 104–109, 2006.
- 9 VANBOGELEN, R. et al. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, v. 178, n. 15, p. 4344, 1996.
- 10 CHAN, F.-Y.; TORRIANI, A. PstB protein of the phosphate-specific transport system of *Escherichia coli* is an ATPase. *Journal of bacteriology*, v. 178, n. 13, p. 3974–3977, 1996.
- 11 MAKINO, K. et al. Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *Journal of molecular biology*, v. 210, n. 3, p. 551–559, 1989.
- 12 CARMANY, D.; HOLLINGSWORTH, K.; MCCLEARY, W. Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR. *Journal of bacteriology*, v. 185, n. 3, p. 1112, 2003.
- 13 MAKINO, K. et al. Mechanism of transcriptional activation of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *Phosphate in Microorganisms: C. and Molecular Biology*, p. 5–12, 1994.
- 14 CRÉPIN, S. et al. The Pho regulon and the pathogenesis of *Escherichia coli*. *Veterinary microbiology*, v. 153, n. 1, p. 82–88, 2011.
- 15 RAMOS JL, F. A. *Pseudomonas*, A Model System in Biology. [S.l.: s.n.], 2007.
- 16 RASHID, M.; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *P. N.A. of Sciences*, v. 97, n. 9, p. 4885, 2000.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- 17 BARON, S.; ROWE, J. Antibiotic action of pyocyanin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 20, n. 6, p. 814–820, 1981.
- 18 STOVER, C. et al. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, an opportunistic pathogen. *Nature*, v. 406, n. 6799, p. 959–964, 2000.
- 19 YUAN, Z. et al. Genome prediction of PhoB regulated promoters in *Sinorhizobium meliloti* and twelve proteobacteria. *Nucleic acids research*, v. 34, n. 9, p. 2686, 2006.
- 20 NIKATA, T. et al. Molecular analysis of the phosphate-specific transport (pst) operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Gen. Genet.*, v. 250, p. 692–8, abr. 1996.
- 21 WU, H. et al. Cloning and characterization of *Pseudomonas putida* genes encoding the phosphate-specific transport system. *J. Biosci. Bioeng.*, v. 87, p. 273–9, 1999.
- 22 RAHME, L. G. et al. Common virulence factors for bacterial pathogenicity in plants and animals. *Science*, v. 268, p. 1899–902, jun. 1995.
- 23 KLOCKGETHER, J. et al. Genome diversity of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 laboratory strains. *Journal of bacteriology*, v. 192, n. 4, p. 1113–1121, 2010.
- 24 ZAGO, A.; CHUGANI, S.; CHAKRABARTY, A. Cloning and characterization of polyphosphate kinase and exopolyphosphatase genes from *Pseudomonas aeruginosa* 8830. *Applied and environmental microbiology*, v. 65, p. 2065, 1999.
- 25 GANGAIAH, D. et al. Polyphosphate kinase 2: a novel determinant of stress responses and pathogenesis in *Campylobacter jejuni*. *PLoS One*, v. 5, p. e12142, 2010.
- 26 OHTOMO, R. et al. Different chain length specificity among three polyphosphate quantification methods. *Analytical biochemistry*, v. 383, p. 210–216, 2008.
- 27 CROOKE, E. et al. Genetically altered levels of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 6290, 1994.
- 28 ISHIGE, K. et al. The polyphosphate kinase gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *DNA Research*, v. 5, p. 157, 1998.
- 29 KORNBERG, A.; RAO, N.; AULT-RICHE, D. Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annual review of biochemistry*, v. 68, p. 89–125, 1999.
- 30 MOROHOSHI, T. et al. Accumulation of inorganic polyphosphate in phoU mutants of *Escherichia coli* and *Synechocystis* sp. strain PCC6803. *Applied and environmental microbiology*, v. 68, p. 4107, 2002.
- 31 AMADO, L.; KUZMINOV, A. Polyphosphate accumulation in *Escherichia coli* in response to defects in DNA metabolism. *J. Bacteriol.*, v. 191, p. 7410–6, dez. 2009. ISSN 1098-5530.
- 32 DALEBROUX, Z.; SWANSON, M. ppGpp: magic beyond RNA polymerase. *Nature Reviews Microbiology*, v. 10, n. 3, p. 203–212, 2012.
- 33 POTRYKUS, K.; CASHEL, M. (p) ppGpp: Still Magical?*. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 62, p. 35–51, 2008.

- 34 LAZZARINI, R. A.; CASHEL, M.; GALLANT, J. On the regulation of guanosine tetraphosphate levels in stringent and relaxed strains of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 246, n. 14, p. 4381–4385, 1971.
- 35 SPIRA, B.; SILBERSTEIN, N.; YAGIL, E. Guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi. *J. Bacteriol*, v. 177, p. 4053–8, jul. 1995.
- 36 SPIRA, B.; YAGIL, E. The relation between ppGpp and the PHO regulon in *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics MGG*, v. 257, n. 4, p. 469–477, 1998.
- 37 KURODA, A. et al. Guanosine tetra- and pentaphosphate promote accumulation of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, v. 272, n. 34, p. 21240–21243, 1997.
- 38 BIGGER, J. Treatment of staphylococcal infections with penicillin by intermittent sterilisation. *The Lancet*, v. 244, n. 6320, p. 497–500, 1944.
- 39 LI, Y.; ZHANG, Y. PhoU is a persistence switch involved in persister formation and tolerance to multiple antibiotics and stresses in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 51, n. 6, p. 2092–2099, 2007.
- 40 SCHWEIZER, H. P. Efflux as a mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* and related bacteria: unanswered questions. *Genet. Mol. Res.*, v. 2, p. 48–62, 2003.
- 41 MAH, T.-F. et al. A genetic basis for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm antibiotic resistance. *Nature*, v. 426, p. 306–10, nov. 2003. ISSN 1476-4687.
- 42 MUDA, M.; RAO, N.; TORRIANI, A. Role of PhoU in phosphate transport and alkaline phosphatase regulation. *Journal of bacteriology*, v. 174, n. 24, p. 8057–8064, 1992.
- 43 RICE, C. D. et al. Employment of a promoter-swapping technique shows that PhoU modulates the activity of the PstSCAB2 ABC transporter in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, v. 75, n. 3, p. 573–582, 2009.
- 44 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*, v. 175, n. 21, p. 6797–6809, 1993.
- 45 NAKATA, A.; AMEMURA, M.; SHINAGAWA, H. Regulation of the phosphate regulon in *Escherichia coli* K-12: regulation of the negative regulatory gene phoU and identification of the gene product. *Journal of bacteriology*, v. 159, n. 3, p. 979–985, 1984.
- 46 ALEXEYEV, M. F. The pKNOCK series of broad-host-range mobilizable suicide vectors for gene knockout and targeted DNA insertion into the chromosome of gram-negative bacteria. *Biotechniques*, v. 26, p. 824–6, 828, maio 1999.
- 47 SCHWEIZER, H. P. *Escherichia*-*Pseudomonas* shuttle vectors derived from pUC18/19. *Gene*, v. 97, p. 109–21, jan. 1991.
- 48 BERTANI, G. Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *Journal of bacteriology*, v. 186, n. 3, p. 595–600, 2004.
- 49 CHEN, P.; TORIBARA, T.; WARNER, H. Microdetermination of phosphorus. *Analytical chemistry*, v. 28, p. 1756–1758, 1956.

- 50 ASCHAR-SOBBI, R. et al. High sensitivity, quantitative measurements of polyphosphate using a new DAPI-based approach. *Journal of Fluorescence*, v. 18, p. 859–866, 2008.
- 51 CUMMING, G.; FIDLER, F.; VAUX, D. Error bars in experimental biology. *The Journal of cell biology*, v. 177, n. 1, p. 7–11, 2007.
- 52 TIJSSEN, J.; BEEKES, H.; Van Steveninck, J. Localization of polyphosphates in *Saccharomyces fragilis*, as revealed by 4',6-diamidino-2-phenylindole fluorescence. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, v. 721, n. 4, p. 394–398, 1982.
- 53 RAJAGOPAL, S.; SUDARSAN, N.; NICKERSON, K. W. Sodium dodecyl sulfate hypersensitivity of *clpP* and *clpB* mutants of *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, v. 68, n. 8, p. 4117–4121, 2002.
- 54 HAAGENSEN, J. A. et al. Differentiation and distribution of colistin-and sodium dodecyl sulfate-tolerant cells in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Journal of bacteriology*, v. 189, n. 1, p. 28–37, 2007.
- 55 POOLE, K. et al. Multiple antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: evidence for involvement of an efflux operon. *J. Bacteriol*, v. 175, p. 7363–72, nov. 1993. ISSN 0021-9193.
- 56 AGUENA, M.; YAGIL, E.; SPIRA, B. Transcriptional analysis of the *pst* operon of *Escherichia coli*. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 268, n. 4, p. 518–524, 2002.
- 57 TORRIANI-GORINI, A. Introduction: the *Pho* regulon of *Escherichia coli*. *Phosphate in Microbiology: Cellular and Molecular Biology*, p. 1–4, 1994.
- 58 KATO, J. et al. Cloning and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene involved in the negative regulation of phosphate taxis. *Journal of bacteriology*, v. 176, p. 5874, 1994.
- 59 HIROTA, R. et al. Stable polyphosphate accumulation by a pseudo-revertant of an *Escherichia coli* *phoU* mutant. *Biotechnology letters*, p. 1–7, 2013.
- 60 POOLE, K.; HANCOCK, R. Phosphate transport in *Pseudomonas aeruginosa*. *European Journal of Biochemistry*, v. 144, p. 607–612, 1984.
- 61 FRALEY, C. et al. A polyphosphate kinase 1 (*ppk1*) mutant of *Pseudomonas aeruginosa* exhibits multiple ultrastructural and functional defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 104, p. 3526, 2007.
- 62 RENNINGER, N. et al. Uranyl precipitation by *Pseudomonas aeruginosa* via controlled polyphosphate metabolism. *Applied and environmental microbiology*, v. 70, p. 7404, 2004.
- 63 RASHID, M. H.; RAO, N. N.; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *Journal of bacteriology*, v. 182, n. 1, p. 225–227, 2000.
- 64 AULT-RICHE, D. et al. Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, v. 180, p. 1841, 1998.
- 65 POTRYKUS, K. et al. *ppGpp* is the major source of growth rate control in *E. coli*. *Environmental microbiology*, v. 13, n. 3, p. 563–575, 2011.

- 66 OCHSNER, U. A.; JOHNSON, Z.; VASIL, M. L. Genetics and regulation of two distinct haem-uptake systems, *phu* and *has*, in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology*, v. 146, n. 1, p. 185–198, 2000.
- 67 ELLISON, M. L. et al. The Transcriptional Regulator Np20 Is the Zinc Uptake Regulator in *Pseudomonas aeruginosa*. *PloS one*, v. 8, n. 9, p. e75389, 2013.
- 68 SPIRA, B. et al. Alternative promoters in the *pst* operon of *Escherichia coli*. *Molecular Genetics and Genomics*, v. 284, n. 6, p. 489–498, 2010.
- 69 RAO, N. N.; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate supports resistance and survival of stationary-phase *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, v. 178, n. 5, p. 1394–1400, 1996.
- 70 KURODA, A.; OHTAKE, H. Molecular analysis of polyphosphate accumulation in bacteria. *Biochemistry Of Biokhimiia*, v. 65, n. 3, p. 304–308, 2000.
- 71 NIKEL, P. I. et al. Accumulation of inorganic polyphosphate enables stress endurance and catalytic vigour in *Pseudomonas putida* KT2440. *Microbial cell factories*, v. 12, n. 1, p. 50, 2013.
- 72 ZHANG, Y. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 45, p. 529–564, 2005.
- 73 COLE, S. et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, v. 393, n. 6685, p. 537–544, 1998.
- 74 ZHANG, H.; ISHIGE, K.; KORNBERG, A. A polyphosphate kinase (PPK2) widely conserved in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 26, p. 16678–16683, 2002.
- 75 ISHIGE, K.; ZHANG, H.; KORNBERG, A. Polyphosphate kinase (PPK2), a potent, polyphosphate-driven generator of GTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 99, n. 26, p. 16684–16688, 2002.
- 76 MAY, T. B.; CHAKRABARTY, A. *Pseudomonas aeruginosa*: genes and enzymes of alginate synthesis. *Trends in microbiology*, v. 2, n. 5, p. 151–157, 1994.
- 77 CHAKRABARTY, A. Nucleoside diphosphate kinase: role in bacterial growth, virulence, cell signalling and polysaccharide synthesis. *Molecular microbiology*, v. 28, n. 5, p. 875–882, 1998.