

LUIZ GUSTAVO DE ALMEIDA

“Caracterização do mutante *phoU* de *Pseudomonas aeruginosa*”

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Beny Spira

“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível na Secretaria de Pós-graduação que aloja o Programa de Pós-Graduação”.

São Paulo
2019

RESUMO

Uma das características mais notáveis de microrganismos é a capacidade de adaptação às mudanças do ambiente. A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* é encontrada em diversos habitats, alguns com condições bastante desfavoráveis à sobrevivência e ao crescimento. Para adaptar-se à diferentes condições ambientais, *P. aeruginosa* possui um arsenal sofisticado de genes e regulons que controlam a expressão gênica. A baixa disponibilidade de fosfato solúvel no meio gera a expressão coordenada dos genes do regulon PHO, entre eles, o operon *pst*, que codifica um sistema de transporte de fosfato inorgânico (Pi) de alta afinidade. O último gene do operon *pst* codifica a proteína PhoU, que não participa do transporte de Pi, mas que, em conjunto com o sistema Pst, atua como repressora da expressão do regulon PHO quando há excesso desse nutriente no meio. *P. aeruginosa* também é um patógeno oportunista, que tem a capacidade de infectar uma ampla gama de organismos hospedeiros, de plantas a humanos. A promiscuidade patogênica dessa bactéria é devida a um repertório variado de genes de virulência em seu genoma. Nessa tese são descritos diversos aspectos relacionados aos efeitos fenotípicos do nocaute de *phoU* na cepa PA14 de *P. aeruginosa*. Entre eles, foi analisado o efeito da mutação *phoU* sobre a virulência em larvas de *Galleria mellonella* e a capacidade antibacteriana de nanopartículas de prata. Foram também estudados os efeitos da suplementação de ferro e magnésio no meio sobre o crescimento bacteriano e a atividade enzimática da fosfatase alcalina. O metaboloma do mutante *phoU* e da cepa selvagem cultivados em carência e suficiência de fosfato foi comparado. Além disso, isolados de um experimento de evolução em cultura contínua foram sequenciados e os fenótipos de virulência e sensibilidade à antibióticos foram avaliados. Os resultados mostram que a concentração de ferro interfere na taxa de crescimento e no rendimento do mutante *phoU* além de aumentar fortemente a atividade da fosfatase alcalina. Por outro lado, a suplementação de magnésio interfere no rendimento e na motilidade do tipo *swarming*. Além disso foi mostrado que o mutante *phoU* é muito menos virulento quando comparado com a cepa selvagem. Por último, foram identificados SNPs em alguns genes dos isolados do experimento de evolução no quimiostato. A virulência foi parcialmente restaurada nos isolados em comparação à cepa ancestral. Foram feitas tentativas no sentido de complementar as mutações com os genes selvagens correspondentes.

Palavras chaves: Polifosfato, fosfato, *Pseudomonas aeruginosa*, *phoU*, operon *pst*, regulon PHO, ppGpp.

ABSTRACT

One of the most notable characteristics of microorganisms is their ability to adapt to environmental changes. *Pseudomonas aeruginosa* is found in several habitats, some with conditions quite unfavorable to survival and growth. To adapt to different environmental conditions, *P. aeruginosa* has a sophisticated arsenal of genes and regulons that control gene expression. Low availability of soluble phosphate in the media triggers the coordinate expression of the PHO regulon genes, among them, the *pst* operon, which encodes a high-affinity inorganic phosphate (Pi) transport system. The last *pst* operon gene encodes the PhoU protein, which does not participate in the Pi transport, but which, together with the Pst system, acts as a repressor of PHO regulon expression when there is an excess of that nutrient in the media. *P. aeruginosa* is also an opportunistic pathogen, which has the ability to infect a wide range of host organisms, from plants to humans. The pathogenic promiscuity of this bacteria is due to a varied repertoire of virulence genes in its genome. In this thesis several aspects related to the phenotypic effects of the *phoU* knockout in the PA14 strain of *P. aeruginosa* are described. Among them, the effect of *phoU* mutation on virulence in *Galleria mellonella* larvae and the antibacterial capacity of silver nanoparticles was analyzed. The effects of iron and magnesium supplementation in the media on bacterial growth and the enzymatic activity of alkaline phosphatase have also been studied. The *phoU* mutant and the wild-type strain metabolome cultivated in phosphate deficiency and sufficiency was compared. In addition, isolates from a continuous culture evolution experiment were sequenced and virulence and antibiotic susceptibility phenotypes were evaluated. The results show that the iron concentration affects the growth rate and yield of the *phoU* mutant in addition to strongly increasing alkaline phosphatase activity. On the other hand, magnesium supplementation interferes with swarming performance and motility. In addition, it has been shown that the *phoU* mutant is much less virulent when compared to the wild-type strain. Finally, SNPs were identified in some genes from the isolates from the chemostat evolution experiment. Virulence was partially restored in the isolates compared to the ancestral strain. Attempts have been made to complement the mutations with the corresponding wild-type genes.

Key words: Polyphosphate, phosphate, *Pseudomonas aeruginosa*, operon *pst*, PHO regulon, ppGpp.