

**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

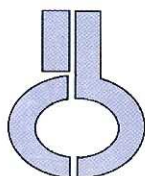
**Aprovado(a)**

**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](mailto: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 n°196 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) , Lívia (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.

## Gracias por visitar este Libro Electrónico

Puedes leer la versión completa de este libro electrónico en diferentes formatos:

- HTML(Gratis / Disponible a todos los usuarios)
- PDF / TXT(Disponible a miembros V.I.P. Los miembros con una membresía básica pueden acceder hasta 5 libros electrónicos en formato PDF/TXT durante el mes.)
- Epub y Mobipocket (Exclusivos para miembros V.I.P.)

Para descargar este libro completo, tan solo seleccione el formato deseado, abajo:

