GERSON MOURA FERREIRA

**REGULAÇÃO DA ADESÃO DE *Escherichia coli*
ENTEROPATOGENICA (EPEC) POR GENES DE
RESPOSTA À LIMITAÇÃO NUTRICIONAL E
ESTRESSE**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências (Microbiologia).

São Paulo

2009

GERSON MOURA FERREIRA

**REGULAÇÃO DA ADESÃO DE *Escherichia coli*
ENTEROPATOGÊNICA (EPEC) POR GENES DE
RESPOSTA À LIMITAÇÃO NUTRICIONAL E
ESTRESSE**

Tese apresentada ao Instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São
Paulo, para a obtenção do Título de
Doutor em Ciências (Microbiologia).

Área de concentração: Microbiologia
Orientador: Prof. Dr. Beny Spira

São Paulo
2009

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

© reprodução total

Ferreira, Gerson Moura.

Regulação da adesão de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)
por genes de resposta à limitação nutricional e estresse / Gerson
Moura Ferreira. -- São Paulo, 2009.

Orientador: Beny Spira.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências
Biomédicas. Departamento de Microbiologia. Área de concentração:
Microbiologia. Linha de pesquisa: Genética de Microorganismos.

Versão do título para o inglês: Regulation of enteropathogenic
Escherichia coli (EPEC) adhesion by genes related to nutritional
shortage and stress.

Descritores: 1. *Escherichia coli* enteropatogênica 2. Adesão 3.
Estresse 4. Operon *pst* 5. RpoS 6. ppGpp I. Spira, Beny II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB0101/2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Gerson Moura Ferreira.

Título da Tese: Regulação da adesão de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) por genes de resposta à limitação nutricional e estresse.

Orientador(a): Beny Spira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB N° 158 , referente ao projeto intitulado “*Estudo sobre a relação entre Genes do Regulon PHO e a Adesão de Escherichia coli Enteropatogênica*” sob a responsabilidade de **Gerson Moura Ferreira** foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEP SH - COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS, tendo sido deliberado que o referido projeto não envolve manipulação animal ou humana que justifique uma aprovação quanto aos princípios éticos exigidos por ambas as Comissões.

São Paulo, 23 de junho de 2006.

Prof. Dr. MARÍLIA C.L. SEELAENDER
Coordenadora da CEEA - ICB/USP

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da CEP SH - ICB/USP

Aos meus pais José e Laura
pelo incentivo, estímulo,
carinho e apoio durante
todos esses anos

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Beny Spira pelo incentivo, confiança, paciência e orientação deste trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro.

Aos professores Dr. Antônio Fernando Pestana de Castro, Dra. Márcia Mayer. Dra. Marilis do Valle Marques, Dr. René Schneider e Dr. Paolo Zanotto pela disponibilidade de utilização dos equipamentos de seus laboratórios.

À Profa. Dra. Roxane Fontes Piazza e ao Prof. Dr. Antônio Pestana de Castro pelo fornecimento de anticorpos e linhagens de bactérias.

À Juliana Velasco, pelo sequenciamento das amostras de DNA.

Às técnicas Marlene Queluz e Íris Moribe pelo apoio técnico e amizade e aos demais funcionários do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas que auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas do laboratório Adelaide, Cássia, Eduardo, Heloísa, Johana, Juliana, Meire, Natália e Viviane pela amizade e contribuição para este trabalho

Aos amigos e familiares pelo apoio e confiança.

E à todos os outros que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho

RESUMO

FERREIRA, G. M. **Regulação da adesão de *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) por genes de resposta à limitação nutricional e estresse.** 167 f. Tese (Doutorado em Ciências – Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Escherichia coli enteropatogênica (EPEC) é uma das principais causadoras de diarreia em crianças em países em desenvolvimento. Durante sua evolução, *E. coli* desenvolveu respostas específicas às situações de estresse e carência nutricional. A relação entre genes envolvidos nessas respostas e a virulência de EPEC foi estudada neste trabalho. Na carência de fosfato (Pi), um conjunto de genes conhecido como regulon PHO é induzido. Esses genes são controlados pelo sistema de dois componentes PhoB/PhoR e pelo sistema Pst, que reprime a expressão de PHO quando Pi é abundante. Pst também é um transportador de Pi de alta afinidade que, assim como os demais genes de PHO, é induzido sob limitação de Pi. A deleção de *pst* reduziu a adesão de EPEC *in vitro*, pois diminuiu a expressão dos reguladores PerA e PerC, que por sua vez controlam a expressão dos genes *bfpA* e *eae*, que codificam, respectivamente, para a principal subunidade da fímbria BFP, responsável pelo padrão de adesão localizada, e para intimina, uma adesina da membrana externa responsável pela adesão íntima. A expressão constitutiva dos genes do regulon PHO, causada pela deleção de *pst*, não afetou a adesão de EPEC, nem a expressão de suas adesinas. Pst, portanto, afeta diretamente a adesão de EPEC. A expressão de BFP, PerA e PerC também dependem da síntese de ppGpp, uma molécula de alarme envolvida na regulação de genes relacionados à carência nutricional. Como consequência, ppGpp regula positivamente a adesão. Entretanto, RpoS, o fator σ relacionado à resposta ao estresse, afetou negativamente o nível de adesão de EPEC e a expressão de *bfpA*.

Palavras-chave: *Escherichia coli* enteropatogênica; Adesão; Regulação gênica; Estresse; Operon *pst*; RpoS; ppGpp

ABSTRACT

FERREIRA, G. M. **Regulation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion by genes related to nutritional shortage and stress.** 167 f. Thesis (Doctoral in Sciences – Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is one of the leading causes of diarrhea in infants in developing countries. *E. coli* elicits specific responses under stress and nutritional starvation conditions. In this thesis, the relation between genes involved in those responses and EPEC virulence was evaluated. Phosphate (Pi) shortage induces transcription of the PHO regulon. These genes are controlled by the two-component system PhoB/PhoR and by the Pst system that represses PHO expression under Pi-replete conditions. Pst is also a high-affinity Pi transport system. Deletion of the *pst* operon caused a reduction in the adhesion level of EPEC to epithelial cells *in vitro* due to a decrease in the expression of the regulators PerA and PerC that in turn reduced the transcription of the *bfpA* and *eae* genes, which encode the main subunit of the BFP fimbriae, and intimin, respectively. The constitutive expression of the PHO genes caused by *pst* deletion was not the cause of adhesion inhibition. Expression of BFP and the regulators PerA and PerC was also dependent on ppGpp, an alarmone involved in the regulation of genes related to nutrient limitation. On the other hand, RpoS, the σ factor that controls the general stress response, negatively affected EPEC adhesion and *bfpA* expression.

Keywords: Enteropathogenic *Escherichia coli*; Adhesion; Gene regulation; Stress; *pst* operon; RpoS; ppGpp.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Pi - carência de fosfato
- (p)ppGpp - guanosina tetra-fosfato e/ou guanosina penta-fosfato
- + Pi - excesso de fosfato
- A/E - *attaching and effacing*
- A410 - absorbância a 410 nanômetros
- ABC - *ATP-binding cassette*
- Amp^R – resistência à ampicilina
- AL - adesão localizada
- APEC - *Escherichia coli* extraintestinal aviária
- AT - 3-amino-1,2,4-triazol
- BFP - *bundle-forming pilus*
- BSA - albumina do soro bovino
- cAMP - AMP cíclico
- CAT - Cloranfenicol Acetil Transferase
- Ci - currie
- Cm^R – resistência a cloranfenicol
- CoA - coenzima A
- CRP - proteína de regulação catabólica
- DAEC - *Escherichia coli* de adesão difusa
- DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- dNTP - desoxirribonucleotídeos
- DO₅₄₀ - densidade óptica a 540 nanômetros
- DTT - ditionitrito
- EAEC - *Escherichia coli* enteroagregativa
- EAF - *EPEC adherence factor*
- EHEC - *Escherichia coli* enterohemorrágica
- EIEC - *Escherichia coli* enteroinvasiva
- EPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica
- ETEC - *Escherichia coli* enterotoxigênica
- EU - unidades enzimáticas
- Eσ – holoenzima da RNA polimerase (associada ao fator sigma)
- FA - fosfatase alcalina
- GASP - *growth advantage in stationary phase*
- GTP - guanosina 5'-trifosfato
- H-NS - *Heat-stable Nucleoid-Structuring protein*
- HS - hidroxamato de serina
- IHF - *Integration Host Factor*
- IPTG - isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo
- kb - quilobases de DNA ou RNA
- Km^R - resistência à canamicina
- LB - meio Luria-Bertani
- LEE - *locus of enterocyte effacement*
- mRNA - RNA mensageiro
- ONPG - orto-nitrofenil-β-galactosídeo

ORF - *Open reading frame* (quadro de leitura aberto)
p-NPP - p-nitrofenilfosfato
PAGE - gel de eletroforese de poliacrilamida
pb - pares de base
PBS - Solução Salina Tamponada
PEPEC - *Escherichia coli* enteropatogênica de porcos
PhoB-P - PhoB fosforilada
PhoR-R – PhoR desfosforilada (reprimida)
PhoR-A – PhoR fosforilada (ativa)
Pi – fosfato inorgânico
Pit - *Phosphate inorganic transport*
Poli-Pi - polifosfato
ppGpp – guanosina tetra-fosfato
PPi - pirofosfato
Pst – *Phosphate Specific Transport*
RNAP - RNA polimerase
rRNA - RNA ribossômico
SDS - dodecil sulfato de sódio
SFB - soro fetal bovino
Sp^R - resistência à espectinomicina
SSC – Cloreto de Sódio/Citrato de Sódio
SSTT – sistema de secreção do tipo III
Tc^R – resistência à tetraciclina
Tir - *Translocated intimin receptor*
TLC - *Thin layer chromatography* (cromatografia de camada delgada)
Tm – temperatura de anelamento (*melting temperature*)
tRNA – RNA transportador
UE – unidades enzimáticas
UFC – unidade formadora de colônia
UPEC - *Escherichia coli* uropatogênica
XP - 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
 σ^{70} – subunidade sigma 70
 σ^S – subunidade sigma S

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação esquemática de LEE (<i>locus of enterocyte effacement</i>).....	21
Figura 2. Modelo do sistema de secreção do tipo III (SSTT) de EPEC.....	22
Figura 3. Representação esquemática dos 14 genes do operon <i>bfp</i> essenciais para a biogênese da fímbria BFP.....	25
Figura 4. Modelo esquematizando os principais elementos envolvidos na regulação de virulência em EPEC.	28
Figura 5. Mapa do cromossomo de <i>E. coli</i> K-12 mostrando a localização dos principais genes do regulon PHO.	29
Figura 6. Exemplo de promotores de genes do regulon PHO de <i>E. coli</i>	31
Figura 7. Esquema da regulação do regulon PHO pelo sistema de dois componentes PhoB/PhoR.	32
Figura 8. Esquema do transporte de fosfato via Pst.....	34
Figura 9. Esquema representando a construção de de pGM7.	55
Figura 10. Esquema representando a ligação do operon <i>pst</i> no vetor pGB2.....	58
Figura 11. Clonagem de <i>relA</i> e <i>spoT</i>	60
Figura 12. Construção de fusões transcricionais das regiões promotoras de <i>bfpA</i> (pGM14), LEE5 (<i>cesT-tir-eae</i>) (pGM17) e <i>per</i> (pGM18) com o gene <i>lacZ</i>	61
Figura 13. Esquema representando a construção de pGM29.....	62
Figura 14. Ensaio de adesão dos mutantes do regulon PHO de LRT9.....	73
Figura 15. Ensaio quantitativo de adesão por β -galactosidase dos mutantes <i>pst</i> de EPEC LRT9.....	75
Figura 16. Ensaio quantitativo de adesão por β -galactosidase dos mutantes <i>phoB</i> e <i>phoR</i> de EPEC LRT9.....	76
Figura 17. Atividade endógena de β -galactosidase e curvas de crescimento de LRT9, LRT9 Δpst e LRT9 Δpst transformado com pGM2.....	78
Figura 18. Efeito de <i>pst</i> sobre a expressão de <i>bfpA</i>	80
Figura 19. Efeito de <i>pst</i> sobre a expressão de <i>bfp-lacZ</i>	82
Figura 20. Efeito de <i>pst</i> sobre a expressão de <i>eae</i>	83
Figura 21. Efeito de <i>pst</i> sobre a expressão de LEE5- <i>lacZ</i>	84
Figura 22. Efeito de <i>pst</i> sobre a expressão de <i>per-lacZ</i>	86

Figura 23. Ensaio de adesão quantitativo por atividade endógena de β -galactosidase de mutantes <i>pst</i> de E2348/69.....	90
Figura 24. Análise dos níveis de ppGpp em mutantes <i>relA</i> e <i>spoT</i>	93
Figura 25. Acúmulo de glicogênio medido pela coloração com solução de iodo de mutantes para a síntese de (p)ppGpp.....	94
Figura 26. Ensaio quantitativo de adesão de mutantes para a síntese de (p)ppGpp.	95
Figura 27. Efeito de (p)ppGpp sobre a expressão de BfpA.....	97
Figura 28. Efeito de (p)ppGpp sobre a expressão de <i>per-lacZ</i>	98
Figura 29. Ensaio de adesão com competição entre as linhagens selvagens e mutantes <i>rpoS</i> de LRT9 e E2348/69.....	101
Figura 30. Ensaio de adesão com competição entre as linhagens EPEC E2348/69 e LRT9.....	101
Figura 31. Efeito de <i>rpoS</i> sobre o mRNA de <i>bfpA</i> em E2348/69 e LRT9.....	104
Figura 32. Efeito de RpoS sobre a expressão de BfpA e intimina em E2348/69... .	106
Figura 33. Efeito de RpoS sobre a expressão de BfpA em LRT9.....	107
Figura 34. Análise da taxa de sobrevivência das cepas EPEC LRT9 e E2348/69 e seus respectivos mutantes <i>rpoS</i> submetidos a diferentes estresses.....	109
Figura 35. Modelo esquematizando os principais elementos envolvidos na regulação de virulência em EPEC e o possível mecanismo de ação de <i>pst</i>	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Linhagens de bactérias.....	45
Tabela 2 - Vetores e plasmídios.....	48
Tabela 3 - Oligonucleotídeos.....	49
Tabela 4 - Ensaio de fosfatase alcalina (FA) de LRT9.....	72
Tabela 5 - Ensaio de atividade de FA (fosfatase alcalina) e de CAT (cloranfenicol acetil transferase) da fusão <i>pstS-cat</i>	88
Tabela 6 - Ensaio de fosfatase alcalina (FA) de E2348/69.	89

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatogênica (EPEC)	18
1.1.1 O <i>locus of enterocyte effacement</i> (LEE) e a lesão A/E	19
1.1.2 A Fímbria BFP e a adesão localizada de EPEC	23
1.1.3 Regulação da virulência de EPEC	25
1.2 O regulon PHO	28
1.2.1 O Regulon PHO e virulência em bactérias	34
1.3 O fator σ^s (RpoS) da RNA polimerase	36
1.4 Guanosina tetrafosfato (ppGpp)	39
2 OBJETIVOS	43
3 MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1 Meios de cultura e soluções	44
3.2 Cepas, plasmídios e oligonucleotídeos	45
3.3 Manipulações de DNA e técnicas de biologia molecular	49
3.3.1 Extração de plasmídios (Mini-prep)	49
3.3.2 Extração de DNA genômico	50
3.3.3 Digestão de DNA com enzimas de restrição	50
3.3.4 Ligação de moléculas de DNA	50
3.3.5 Reações de PCR	51
3.3.6 Eletrotransformação de bactérias	51
3.3.7 Eletroforese e purificação de DNA	51
3.3.8 Sequenciamento de DNA	52
3.4 Transferência de alelos por transdução com fago P1	52
3.4.1 Preparação do lisado de P1	52
3.4.2 Transdução por fago P1	53
3.5 Obtenção e construção de mutantes	53
3.5.1 Construção de um mutante <i>pstS</i> não polar	53
3.5.2 Inserção de mutações em EPEC via transdução com o fago P1	54
3.5.2.1 Obtenção de mutantes de genes do regulon PHO	54
3.5.2.2 Obtenção de mutantes <i>rpoS</i>	55

3.5.2.3 Obtenção de mutantes de genes envolvidos na síntese de (p)ppGpp.....	55
3.5.3 Complementação <i>in cis</i> da mutação <i>relA</i>	56
3.6 Construção de plasmídios	56
3.6.1 Clonagem do operon <i>pst</i>	56
3.6.2 Clonagem de <i>relA</i> e <i>spoT</i>	57
3.6.3 Construção de fusões <i>bfpA-lacZ</i> , <i>per-lacZ</i> e <i>LEE5-lacZ</i>	57
3.6.4 Construção do vetor suicida pGM4.....	59
3.7 Extração de RNA	59
3.8 Preparação de sondas de DNA	62
3.9 Northern-blot	63
3.10 Ensaio enzimáticos	63
3.10.1 Ensaio de fosfatase alcalina (FA).....	63
3.10.1.1 Ensaio quantitativo de FA.....	63
3.10.1.2 Ensaio qualitativo de FA.....	64
3.10.2 Ensaio de β -galactosidase das fusões <i>lacZ</i>	64
3.10.3 Ensaio de atividade da fusão <i>pstS-cat</i>	65
3.10.4 Ensaio de acúmulo de glicogênio.....	65
3.10.5 Ensaio de catalase.....	66
3.11 Cultivo de células humanas HEp-2	66
3.12 Ensaio de adesão <i>in vitro</i> às células epiteliais	66
3.12.1 Ensaio de adesão qualitativo.....	66
3.12.2 Ensaio de adesão quantitativo.....	67
3.12.2.1 Ensaio quantitativo de adesão por unidades formadoras de colônias (UFC)	
.....	67
3.12.2.2 Ensaio quantitativo de adesão por atividade endógena de β -galactosidase	
.....	67
3.13 Cultivo de bactérias e extração de (p)ppGpp	67
3.14 Detecção de (p)ppGpp em placas de TLC	68
3.15 Immunoblotting	68
4 RESULTADOS	70
4.1 O papel do regulon PHO na virulência de EPEC	70
4.1.1 Obtenção de mutantes em genes do regulon PHO.....	70

4.1.2	Efeito de mutações em genes de PHO sobre a adesão <i>in vitro</i> de LRT9.....	71
4.1.3	O operon <i>pst</i> regula positivamente a expressão de <i>bfp</i> , <i>eae</i> e <i>per</i>	77
4.1.4	O operon <i>pst</i> é parcialmente induzido em meio DMEM.....	86
4.1.5	Análise de mutantes no regulon PHO de EPEC E2348/69.....	88
4.2	O papel de (p)ppGpp na virulência de EPEC	90
4.2.1	Obtenção de mutantes para a síntese de (p)ppGpp.....	90
4.2.2	Complementação das mutações <i>relA</i> e <i>spoT</i>	91
4.2.3	O efeito de (p)ppGpp sobre a adesão de EPEC.....	94
4.2.4	O efeito de (p)ppGpp sobre a expressão de BFP.....	96
4.2.5	O efeito de (p)ppGpp sobre a expressão de <i>per</i>	97
4.3	O papel de <i>rpoS</i> na virulência de EPEC	99
4.3.1	Obtenção de mutantes <i>rpoS</i> de EPEC.....	99
4.3.2	Ensaio de competição entre bactérias <i>rpoS</i> ⁺ e <i>rpoS</i> ⁻	99
4.3.3	O efeito diferencial de RpoS em duas linhagens de EPEC.....	102
4.3.4	A super-expressão de <i>rpoS</i> afeta a expressão de adesinas em EPEC.....	103
4.3.5	Análise da resistência ao estresse nas cepas E2348/69 e LRT9.....	107
5	DISCUSSÃO.....	110
5.1	O operon <i>pst</i> aumenta o nível de adesão de EPEC.....	110
5.2	(p)ppGpp é essencial para expressão de <i>bfp</i> e <i>per</i>	117
5.3	O papel de RpoS (σ^s) na patogenicidade de EPEC.....	120
6	CONCLUSÕES.....	125
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	126
	ANEXOS.....	147

1 INTRODUÇÃO

Escherichia coli é um bacilo Gram-negativo, pertencente ao grupo das proteobactérias gama, que compõe a microbiota normal do intestino de animais de sangue quente. Por mais de 50 anos foi considerado somente um microorganismo comensal que coloniza o intestino humano, mas atualmente está amplamente estabelecido que *E. coli* está associada a infecções do trato intestinal, infecções urinárias e septicemia (NATARO; KAPER, 1998).

1.1 *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC)

No decorrer do curso evolutivo, bactérias desenvolveram inúmeras estratégias com o propósito de colonizar e infectar animais e plantas. Embora o mecanismo de emergência de novos patógenos ainda não esteja totalmente esclarecido, essas estratégias conferem vantagens evolutivas e favorecem a aquisição de novos fatores de virulência (REID *et al.*, 2000).

A patogênese microbiana é complexa e multifatorial, e patógenos possuem mecanismos bioquímicos que, individualmente ou em conjunto, produzem infecções e doenças. Para o estabelecimento da infecção, a adesão é essencial, pois permite ao patógeno ligar-se às células do hospedeiro, funcionando como um ponto de apoio para futuras interações, que resultam em doenças (FINLAY; FALKOW, 1989).

Embora *E. coli* já fosse conhecida como um dos principais componentes da microbiota normal do intestino do homem e já existissem evidências para o seu possível papel em patogenias, somente em 1945, Bray e Beaven demonstraram a relação entre *E. coli* enteropatogênica (EPEC) e um surto de diarreia em crianças em Middlesex, no Reino Unido (LAW, 1994; CHEN; FRANKEL, 2005; FRANKEL; PHILLIPS, 2008).

A patogenicidade de *E. coli* depende de um complexo mecanismo envolvendo um grande número de fatores de virulência que interagem entre si, incluindo fatores de adesão, modificação da superfície da célula hospedeira, invasinas, toxinas e sistemas de excreção que transportam toxinas e outros fatores de virulência para o interior da célula hospedeira (KUHERT *et al.*, 2000).

Atualmente são descritas seis categorias ou patótipos de *E. coli* relacionadas com infecções intestinais: enteropatogênica (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroagregativa (EAEC), enterotoxigênica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC) e *E. coli* de aderência difusa (DAEC) (LEVINE, 1987; NATARO; KAPER, 1998). Além disso, linhagens de *E. coli* extraintestinais estão relacionadas a infecções urinárias, meningite e septicemia (ORSKOV, I.; ORSKOV, F., 1995).

Em 1995, durante o Segundo Simpósio Internacional sobre EPEC, realizado em São Paulo, foi proposta uma definição para EPEC. Foi definido que linhagens diarreiogênicas de *E. coli* que produzem uma histopatologia conhecida como lesão *attaching and effacing* (adesão e obliteração) em células intestinais, que não produzem toxinas Shiga ou toxinas semelhantes e não produzem verocitotoxinas são consideradas EPEC (KAPER, 1996). Dentro dessa definição, essas linhagens ainda são divididas em dois outros grupos. Aquelas que possuem um plasmídio de alto peso molecular conhecido como EAF (*EPEC adherence factor*) são consideradas EPECs típicas, enquanto as que não têm EAF são consideradas atípicas (TRABULSI *et al.*, 2002).

EPEC é uma das mais comuns causas de diarreia em crianças de até um ano de idade nos países em desenvolvimento. Embora o número de casos esteja diminuindo, EPEC ainda continua a ser uma importante causadora de diarreia em países desenvolvidos. Ela coloniza normalmente o intestino delgado, causando diarreia e alterações na superfície das células do epitélio intestinal. Sua patogênese é caracterizada pela adesão localizada (AL) (em EPEC típica), adesão íntima e lesão *attaching and effacing*, ou simplesmente lesão A/E (NATARO; KAPER, 1998).

1.1.1 O *locus of enterocyte effacement* (LEE) e a lesão A/E

A lesão A/E foi primeiramente descrita por Staley *et al.* (1969), mas o termo *attaching and effacing* foi atribuído por Moon *et al.* (1983), devido ao fato da bactéria aderir intimamente à superfície do enterócito (*attaching*), obliterar os microvilli (*effacing*) e formar estruturas em forma de pedestal na célula hospedeira. Essas estruturas variam de 1 a 10 µm de comprimento e contêm uma grande quantidade de filamentos de actina polimerizada (ROSENSHINE *et al.*, 1996; KNUTTON *et al.*,

1989) além de outros elementos do citoesqueleto como α -actinina, talina, e ezrina (FINLAY *et al.*, 1992).

Os genes que codificam para os produtos responsáveis pela lesão A/E estão localizados na “ilha de patogenicidade” de 35,6 kb conhecida como *locus of enterocyte effacement* (LEE), inserida no minuto 82 do mapa de *E. coli* K-12 adjacente ao gene *sefC* no caso da linhagem padrão de EPEC E2348/69 (MCDANIEL *et al.*, 1995). LEE está presente em outros patógenos gastrointestinais como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *Hafnia alvei*, *Citrobacter rodentium*, *Helicobacter pylori*, além de outras linhagens patogênicas de *E. coli* que infectam animais (MCDANIEL; KAPER, 1997; FRANKEL, *et al.*, 1998). A sequência LEE de EPEC é suficiente para atribuir a uma cepa de *E. coli* K-12 não-patogênica a capacidade de induzir lesões A/E e secretar proteínas (MCDANIEL; KAPER, 1997), embora o LEE clonado a partir de EHEC não é capaz de causar o mesmo efeito (ELLIOTT *et al.*, 1999).

O LEE de EPEC E2348/69 contém 41 genes, incluindo cinco operons que compreendem três regiões cujos produtos têm funções distintas (ELLIOTT *et al.*, 1998) (Fig. 1). A região média de LEE (operon LEE5) contém o gene *eae* (*E. coli attaching and effacing*), que codifica para a intimina, responsável pela adesão íntima da bactéria (JERSE *et al.*, 1990; DONNENBERG; KAPER, 1991; JERSE; KAPER, 1991) e o gene *tir* que codifica para o receptor da intimina, Tir (*Translocated intimin receptor*). De forma surpreendente, Tir é translocado para a superfície da célula hospedeira (KENNY *et al.*, 1997a). À montante de *eae* e *tir*, está a região proximal de LEE composta por três operons (LEE1, LEE2 e LEE3) cujos genes codificam para o sistema de secreção do tipo III (SSTT), formado pelas proteínas Esc e Sep (ELLIOTT *et al.*, 1998), responsáveis pela secreção de proteínas Esp (*E. coli-secreted proteins*). EspA, EspB e EspD e outras proteínas secretadas são codificadas pela região distal de LEE que compreende o operon LEE4, que fica à jusante dos genes *tir* e *eae*, e estão envolvidas na transdução de sinal na célula hospedeira e formação de lesões A/E (KENNY; FINLAY, 1995).

Figura 1. Representação esquemática de LEE (*locus of enterocyte effacement*). LEE é composto por ao menos 40 ORFs, divididas em pelo menos cinco operons. Os genes apresentados estão envolvidos na virulência de EPEC. Adaptado de Garmendia *et al.* (2005).

Dentro do operon LEE1 há o gene *ler*, que codifica para a proteína Ler (*LEE-encoded regulator*), que é o regulador chave de LEE. Ler é responsável pela ativação de LEE2, LEE3 e LEE4, e compartilha similaridade com a família de reguladores transcricionais H-NS (MELLIES *et al.*, 1999). Mutantes *ler* apresentam uma grande diminuição na capacidade de causar lesões A/E, bem como ausência de expressão de Tir e intimina, além de menor adesão localizada. Ler também está envolvido na regulação de genes não pertencentes a LEE, como por exemplo *espC* (ELLIOT *et al.*, 2000), que codifica para uma endotoxina (MELLIES *et al.*, 2001).

Muitos patógenos entéricos utilizam sistemas de secreção do tipo III (SSTT), que funcionam como uma seringa macromolecular que injeta proteínas efetoras no interior da célula hospedeira. Eles são formados por um corpo basal, que compreende um anel interno e um anel externo, ancorados na membrana citoplasmática e na membrana externa da bactéria, respectivamente, interligados por um canal (Fig. 2). Ligado ao corpo basal existe uma estrutura em forma de agulha do lado externo da célula. O SSTT possui similaridades com o flagelo encontrado em bactérias, sugerindo um mecanismo de evolução comum (HUECK, 1998). Embora a estrutura do SSTT de EPEC não esteja totalmente elucidada, baseado em homologia com outras bactérias e dados experimentais, modelos têm sido propostos. EscN é uma ATPase que fornece energia para a secreção. EscF faz parte do complexo da agulha, ancorado no anel externo, e está envolvido na montagem dos filamentos formados por EspA. EscJ faz parte do anel interno e EscC forma o anel externo ancorado a membrana externa do corpo basal (SEKIYA *et al.*, 2001; WILSON *et al.*, 2001; OGINO *et al.*, 2006). As proteínas secretadas pelo sistema SSTT (EspA, EspB, EspD, EspF, Map, Tir, etc.) são essenciais para a adesão íntima,

transdução de sinal e formação da lesão A/E na célula hospedeira. Na Figura 2 estão reapresentados o SSTT, bem como as proteínas secretadas.

Figura 2. Modelo do sistema de secreção do tipo III (SSTT) de EPEC. As proteínas que formam o sistema são denominadas Esc e Sep e ficam localizadas na membrana citoplasmática (interna) e na membrana externa da bactéria. As proteínas secretadas incluem EspA, que forma um filamento em forma de agulha; EspBD que formam o poro de translocação pelo qual as demais proteínas secretadas são expelidas para o exterior da bactéria; Tsr é translocado pela bactéria e atua como receptor na célula hospedeira para intimina, que é uma adesina da membrana externa, também secretada. Adaptado de Garmendia *et al.* (2005).

A adesão íntima em EPEC é mediada por uma proteína de aproximadamente 94 KDa conhecida como intimina, codificada pelo gene *eae* localizado no operon LEE5 (JERSE *et al.*, 1990; DONNENBERG; KAPER, 1991; JERSE; KAPER, 1991; ELLIOTT, *et al.*, 1998). Intimina liga-se ao receptor Tir previamente translocado para a célula hospedeira (ROSENSHINE *et al.*, 1996). Essa ligação é importante, pois causa o agrupamento de Tir e inicia a formação dos pedestais (CAMPELLONE *et al.*, 2004).

1.1.2 A Fímbria BFP e a adesão localizada de EPEC

Um fenótipo observado principalmente em amostras de EPEC típicas é o padrão de adesão localizada (AL) *in vitro* das bactérias, que formam microcolônias sobre a superfície de células epiteliais (SCALETSKY *et al.*, 1984). Baldini *et al.* (1983) mostraram que a adesão localizada de EPEC depende de um plasmídio de alto peso molecular, que eles denominaram pMAR2. Quando transferido para uma linhagem de *E. coli* K-12 não patogênica, pMAR2 conferiu a capacidade de adesão (MCCONNELL *et al.*, 1989). Posteriormente, em um ensaio *in vivo* com voluntários, Levine *et al.* (1985) mostraram que este plasmídio era essencial para a patogênese de EPEC, pois indivíduos infectados com uma linhagem de EPEC curada do plasmídio não apresentaram diarreia ou apresentaram uma diarreia mais branda. Este plasmídio passou a ser chamado EAF (EPEC *adherence factor*). Knutton *et al.* (1987) mostraram, em ensaios *in vitro* com células epiteliais, que EPEC adere de maneira localizada e produz lesões A/E, e propôs que um fator fimbrial poderia estar associado a EAF.

Somente em 1991, Girón *et al.* descreveram uma fímbria ou pilus cuja principal característica era a formação de filamentos de feixes, que constituíam uma rede interligando as bactérias. Por causa dessa característica, a fímbria foi chamada de *bundle-forming pilus* (BFP). Linhagens de EPEC curadas do plasmídio EAF não sintetizam BFP, confirmando definitivamente que o fator de adesão codificado por EAF é a fímbria BFP (GIRÓN *et al.*, 1991).

BfpA ou bundlina, codificada pelo gene *bfpA*, é a principal subunidade da fímbria BFP, estando relacionada à outras pilinas encontradas em fímbrias do tipo IV

de outras bactérias (DONNENBERG *et al.*, 1992). Além de *bfpA*, a biogênese de BFP depende de outros 13 genes presentes no plasmídio EAF, transcritos na mesma direção, compondo o operon *bfp* (SOHEL *et al.*, 1996; STONE *et al.*, 1996) (Fig. 3). Esses genes são denominados *bfpAGBCUDEFPHIJKL* (SOHEL *et al.*, 1996), transcritos nessa ordem. *bfpP* codifica para uma pré-pilina peptidase, envolvida na maturação de BfpA, que inicialmente é sintetizada como uma pré-pilina (ZHANG *et al.*, 1994). BfpB é uma lipoproteína (RAMER *et al.*, 1996; SOHEL *et al.*, 1996) que forma um complexo de secreção juntamente com BfpG, pelo qual BFP é expelido (SCHMIDT *et al.*, 2001). BfpI, BfpJ e BfpK são proteínas semelhantes a pilina que formam um complexo na membrana citoplasmática da bactéria. BfpE funcionaria como uma plataforma para a montagem do complexo, sendo requerida para a movimentação das proteínas montadas dentro da membrana citoplasmática. BfpU, BfpL e BfpC são proteínas que interagem com o complexo interno e externo, sugerindo que o complexo de montagem de BFP atravessa o espaço periplasmático, ligando a membrana citoplasmática à membrana externa (RAMER *et al.*, 2002). Em um estudo mais recente, foi mostrado que na presença de ATP, BfpD forma um hexâmero com atividade de ATPase, que é aumentada pela interação com BfpE e BfpC, funcionando como um motor molecular (CROWTHER *et al.*, 2005).

BfpF não é necessário para a expressão, mas desempenha um papel importante na morfologia de BFP. Mutações em BfpF causam um aumento na adesão localizada, na agregação das bactérias e na piliação (ANANTHA *et al.*, 1998; BIEBER *et al.*, 1998). BfpF está associado também à mudanças na estrutura da fímbria durante a adesão, caracterizadas pela transformação de BFP de feixes finos para feixes mais grossos, permitindo a dispersão da bactéria sobre a superfície da célula epitelial, e por consequência a extinção das microcolônias após estágios mais prolongados de adesão (KNUTTON *et al.*, 1999).

Além do operon *bfp*, outros genes estão associados a expressão de BFP. *dsbA* que codifica para DsbA, uma proteína periplasmática envolvida na formação de pontes dissulfeto em várias proteínas extra-citoplasmáticas, como a fosfatase alcalina, é essencial para a estabilização de BfpA (ZHANG; DONNENBERG, 1996; DONNENBERG *et al.*, 1997). Outros genes envolvidos na regulação da expressão de BFP serão detalhados mais adiante.

Um modelo para a adesão de EPEC proposto por Donnenberg *et al.* (1992) divide as etapas de patogênese de EPEC em três estágios. O primeiro é a adesão primária, que depende de BFP. Em seguida, ocorre a transdução de sinal que causa alterações no citoesqueleto da célula hospedeira e a formação da lesão A/E. O último estágio é a adesão íntima mediada por intimina e seu receptor Tir.

Figura 3. Representação esquemática dos 14 genes do operon *bfp* essenciais para a biogênese da fímbria BFP.

Embora BFP seja reconhecidamente uma adesina (CLEARY *et al.*, 2004), até o momento ainda não foram encontrados receptores para BFP na célula hospedeira. Hicks *et al.* (1998), utilizando biopsias de células intestinais de crianças, afirmaram que BFP está envolvido somente nas interações bactéria-bactéria que levam a formação de colônias tridimensionais. Há outros estudos que indicam a atuação de outras fímbrias (GIRÓN *et al.*, 1993) e até mesmo o flagelo como possíveis adesinas de EPEC (GIRÓN *et al.*, 2002).

Apesar dos avanços no estudo da patogênese de EPEC, o mecanismo que leva à diarreia ainda não está totalmente compreendido. A destruição das microvilosidades e a consequente diminuição da superfície do epitélio intestinal contribuem para a diarreia, mas não são os únicos fatores (NATARO; KAPER, 1998). A perda das junções oclusivas causadas por EspF e consequentemente alterações na permeabilidade celular (descrito acima) e alterações no transporte de íons promovida por EPEC também podem contribuir para a diarreia (CHEN; FRANKEL, 2005).

1.1.3 Regulação da virulência de EPEC

A formação da lesão A/E em EPEC é fortemente induzida durante a fase exponencial de crescimento a temperatura de 37 °C (ROSENSHINE *et al.*, 1996). Além dessas condições, a presença do meio DMEM (*Dulbecco's Modified Early Medium*), um meio utilizado para o cultivo de células humanas, pH fisiológico,

bicarbonato e cálcio, também contribuem para a lesão A/E, que é inibida pela presença de sais de amônio (KENNY *et al.*, 1997b; IDE *et al.*, 2003). Um esquema mostrando as principais vias de regulação da adesão em EPEC está descrito na Figura 4.

Ler é um regulador transcricional que age como anti-repressor, aliviando o efeito silenciador de H-NS sobre os promotores de LEE. Na ausência de H-NS a transcrição de LEE ocorre de maneira independente de Ler, mostrando que Ler é importante somente para atenuar o efeito repressor de H-NS (BUSTAMANTE *et al.*, 1998). Ler liga-se à sequências reguladoras de LEE2 a LEE5 rompendo o complexo de nucleoproteínas formado por H-NS, responsável pela repressão desses operons (HAACK *et al.*, 2003; SÁNCHEZ-SANMARTIN *et al.*, 2001).

Fis, uma proteína predominantemente expressa no início da fase exponencial, IHF (*Integration host factor*), uma proteína que promove o dobramento do DNA, e BipA, uma GTPase que se liga ao ribossomo, regulam positivamente Ler (GOLDBERG *et al.*, 2001; FRIEDBERG *et al.*, 1999; FARRIS *et al.*, 1998).

Da mesma forma que LEE, a expressão de BFP também é regulada por fatores ambientais. A adesão localizada de EPEC às células epiteliais ocorre predominantemente a 37 °C e em meio DMEM, mas é inibida em meio rico como LB (VUOPIO-VARKILA; SCHOOLNIK, 1991; GIRÓN *et al.*, 1991; PUENTE *et al.*, 1996). A presença de glicose também é um fator importante na indução de BFP (VANMAELE; ARMSTRONG, 1997), mas a presença de células epiteliais e de soro fetal bovino no meio de cultura não são essenciais para a sua expressão (VUOPIO-VARKILA; SCHOOLNIK, 1991). O promotor principal de *bfp* (localizado à montante do primeiro gene do operon, *bfpA*) é reconhecido pelo fator σ^{70} , sendo que sua expressão ocorre predominante durante a fase exponencial. Somado a isso, a expressão de *bfpA* é positivamente regulada por cálcio e inibida por amônio (PUENTE *et al.*, 1996).

À jusante de *bfp*, no plasmídio EAF, se encontra o operon *per* (*plasmid-encoded regulator*). Este operon codifica para os genes *perA*, *perB* e *perC* (anteriormente conhecidos como *bfpT*, *bfpV* e *bfpW*) envolvidos na regulação da virulência de EPEC. Mutações em *perA*, cujo produto é um membro da família de

reguladores transcricionais AraC, reduzem consideravelmente tanto a expressão de *bfpA*, como o nível de adesão localizada. PerA liga-se a sequências à montante do gene *bfpA* (TOBE *et al.*, 1996), sendo ativado sob as mesmas condições descritas acima para a expressão de *bfpA* e também sofre auto-ativação (MARTINEZ-LAGUNA *et al.*, 1999). Uma região rica em bases AT, contendo duas repetições de 8 pares de bases e dois elementos com repetições invertidas são necessários para a ligação de PerA à região promotora de *bfp* e *per* (BUSTAMANTE *et al.*, 1998). Essa sequência compreende uma região consenso de 29 pares de bases presente em ambos os promotores (IBARRA *et al.*, 2003).

Além disso, PerA e PerC têm influência positiva sobre genes envolvidos na lesão A/E (GÓMEZ-DUARTE; KAPER, 1995; TOBE *et al.*, 1996) bem como na ativação dos genes de LEE (MELLIES *et al.*, 1999; SÁNCHEZ-SANMARTIN *et al.*, 2001). Porter *et al.* (2004) mostraram que a ativação de *perA* e *bfp* depende exclusivamente de PerA, e que a ativação de *ler* depende tanto de PerA como de PerC. PerA ativa a transcrição de *perC*, cujo produto se liga a região promotora de *ler* e consequentemente atua positivamente sobre os genes de LEE, caracterizando, portanto uma cascata regulatória. Uma vez que PerA e PerC são reguladores globais, os genes envolvidos na patogênese de EPEC são algumas vezes descritos como regulon PER.

A expressão de *per* é reprimida por GadX, um ativador dos genes necessários para a síntese da glutamato descarboxilase, uma enzima envolvida na tolerância à acidez. De acordo com esse modelo, quando EPEC passa pelo estômago (pH $\simeq$ 2), GadX ativa a glutamato descarboxilase, promovendo a resistência à acidez e ao mesmo tempo inibe a expressão de genes envolvidos na patogênese de EPEC, evitando desta forma a ativação prematura dos genes de adesão antes que a bactéria alcance o intestino (SHIN *et al.*, 2001).

Figura 4. Modelo esquematizando os principais elementos envolvidos na regulação de virulência em EPEC. A ilha de patogenicidade LEE é composta por cinco operons e está localizada no cromossomo de EPEC. O plasmídeo EAF carrega os operons *bfp* e *per*. Setas indicam regulação positiva e linhas em “T” indicam regulação negativa. Linhas pontilhadas indicam expressão da proteína a partir da sequência de DNA.

1.2 O regulon PHO

Fósforo é o terceiro componente intracelular mais abundante, atrás de carbono e hidrogênio, fazendo parte de lipídios de membrana, carboidratos complexos, ácidos nucleicos e proteínas fosforiladas, além de ser um componente essencial do metabolismo energético. Fosfato, que é a forma mais comum de fósforo na natureza, pode ser encontrado na célula constituindo moléculas inorgânicas ou orgânicas. Os fosfatos inorgânicos podem estar na forma de ortofosfato (Pi), pirofosfato (PPi) ou polifosfato (poli-Pi), sendo que apenas o primeiro é captado diretamente pela célula (WANNER, 1996).

O regulon PHO de *E. coli* compreende um grupo de mais de 40 genes,

incluindo vários operons, envolvidos na captação e assimilação de compostos fosforilados (Fig. 5). Esses genes são ativados em resposta à carência de Pi no meio externo, sendo que alguns deles podem ser induzidos em até 100 vezes nessas condições (WANNER, 1996; RAO; TORRIANI, 1990).

O controle da expressão do regulon PHO é realizado por um sistema de dois componentes formado pelo ativador transcricional PhoB e pela proteína sensora PhoR, uma histidina-quinase (MAKINO *et al.*, 1993). Todas as regiões promotoras dos genes do regulon PHO possuem uma sequência –10 funcional e pelo menos uma cópia de PHO-box, que é uma sequência de 18 pb localizada à montante da sequência –10, na porção correspondente a sequência –35 (KIMURA *et al.*, 1989; MAKINO *et al.*, 1986). Essa sequência consenso apresenta duas repetições CTGCTAT separadas por 4 pares de base do tipo A/T (Fig. 6) (MAKINO *et al.*, 1986; WANNER, 1996).

Figura 5. Mapa do cromossomo de *E. coli* K-12 mostrando a localização dos principais genes do regulon PHO.

Em condições de abundância de Pi no meio externo, a proteína sensora PhoR permanece desfosforilada, inibindo a ativação da transcrição dos genes do regulon PHO. Porém, quando a concentração de Pi no meio externo diminui para menos de 4 μM , por um mecanismo ainda desconhecido o domínio periplasmático de PhoR detecta a baixa concentração de Pi e autofosforila seu resíduo de histidina 213. PhoR fosforilada transfere o grupo fosfato para o aspartato 53 de PhoB (MAKINO *et al.*, 1994; SHINAGAWA *et al.*, 1994). Na forma ativa (fosforilada), PhoB regula positivamente a expressão, e é essencial para a transcrição dos genes do regulon PHO (MAKINO *et al.*, 1989). Devido a ausência de uma sequência -35, o fator σ^{70} da RNA polimerase somente pode interagir com as regiões promotoras dos genes de PHO por intermédio de PhoB fosforilada (PhoB-P), que se liga especificamente aos PHO-boxes de todos os genes do regulon promovendo a transcrição dos mesmos (MAKINO *et al.*, 1996). Quando a abundância de Pi é restaurada, PhoR muda de conformação e passa a apresentar atividade de fosfatase, removendo o grupo fosfato de PhoB-P, inativando-o, e em consequência, a transcrição dos genes de PHO é suprimida (WANNER, 1996; CARMANY *et al.*, 2003) (Fig. 7).

Um estudo de análise de proteínas por eletroforese bi-dimensional revelou que 208 proteínas foram induzidas e 205 foram reprimidas durante a carência de Pi. Muitos desses genes apresentaram regiões regulatórias similares à sequência consenso do PHO-box, revelando que o número de genes regulados por Pi externo é maior do que se havia constatado até então (VANBOGELEN *et al.*, 1996). Análises por micro-arranjos de DNA revelaram que ao menos 18 genes não pertencentes ao regulon PHO são ativados durante a carência de Pi. Destes, cinco possuem PHO-boxes e três são dependentes de PhoB. Esses genes não estão diretamente envolvidos no metabolismo de Pi, mas poderiam estar envolvidos em repostas ao estresse ácido e a íons metálicos (BAEK; LEE, 2006).

Figura 6. Exemplo de promotores de genes do regulon PHO de *E. coli*. Esses genes compartilham seqüências consensuais chamadas PHO-boxes (destacadas por retângulos) ao invés de uma sequência -35 típica, podendo haver mais de um PHO-box como, por exemplo, no caso de *pstS*. A sequência -10 está sublinhada.

Na ausência de PhoR, PhoB ainda pode ser fosforilada por mecanismos de regulação cruzada. Hiratsu *et al.* (1995) demonstraram que *in vitro*, na presença de acetil fosfato, PhoB é capaz de se auto-fosforilar, tornando-se ativa e com capacidade de ligar-se a região promotora dos genes de PHO, ativando a transcrição destes.

CreC é uma histidina-quinase sintetizada constitutivamente e que está relacionada à regulação de genes envolvidos no catabolismo de fontes de carbono. Na ausência de PhoR, CreC é capaz de transferir seu grupo fosfato para PhoB *in vitro*, promovendo a síntese dos genes do regulon PHO (AMEMURA *et al.*, 1990; WANNER; WILMES-RIESENBERG, 1992). Mutações no gene *phoR*, que afetam somente a atividade de fosfatase de PhoR induzem a constitutividade do regulon PHO, já que a proteína ainda mantém somente a função de fosforiladora de PhoB (CARMANY *et al.*, 2003; KREUZER *et al.*, 1975).

Além do operon *phoBR*, que codifica para PhoB e PhoR, o regulon PHO compreende o operon *pst*, que codifica para o sistema de transporte de alta afinidade conhecido como Pst; *phoA*, que codifica para a enzima fosfatase alcalina (FA); o operon *ugp*, que codifica para o transportador de glicerol-fosfato Ugp; o operon *phn*, que codifica para o transportador de fosfonato Phn; e o gene *phoE*, que codifica para a porina da membrana externa PhoE, responsável pelo transporte de ânions, principalmente organofosfatos e Pi (WANNER, 1996) (Fig. 5).

Figura 7. Esquema da regulação do regulon PHO pelo sistema de dois componentes PhoB/PhoR. Na abundância de Pi PhoR permanece na sua forma inativa (PhoR-R). Porém, quando a concentração de Pi é menor que 4 μM , PhoR se torna ativa (PhoR-A) e transfere seu grupo fosfato para PhoB (PhoB-Pi ou PhoB-P). Quando fosforilado, PhoB interage com as sequências consenso nos promotores de genes de PHO (PHO-boxes) e promove a transcrição desses genes. M. I. – membrana interna. M. E. – membrana externa.

E. coli possui dois sistemas de transporte de Pi denominados Pit (*Phosphate inorganic transport*) e Pst (*Phosphate specific transport*). Embora apresente baixa afinidade por Pi ($K_m = 38,2 \mu\text{M Pi}$), Pit transporta Pi com velocidade relativamente alta ($V_{\max} = 55 \text{ nmol Pi min}^{-1}$). A síntese de Pit ocorre de maneira constitutiva, e portanto, não está sob controle do regulon PHO (HOFFER *et al.*, 2001). Por outro lado, Pst apresenta alta afinidade por Pi ($K_m = 0,43 \mu\text{M Pi}$) e sua expressão é induzida sob carência de Pi (ROSENBERG *et al.*, 1977; WANNER, 1996). Pst pertence à família de transportadores do tipo ABC (*ATP-binding cassette*) que estão presentes em uma grande variedade de células, inclusive em mamíferos, e cuja energia para o transporte depende da hidrólise de ATP (WEBB *et al.*, 1992).

Os componentes do sistema de transporte Pst são codificados pelo operon *pst*, que é composto por cinco genes, *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB* e *phoU*, transcritos nessa ordem, localizados no minuto 84 do mapa do cromossomo de *E. coli* K-12 (RAO; TORRIANI, 1990). As proteínas codificadas por *pst* são PstS, PstC, PstA e PstB, que

formam o sistema de transporte de Pi e PhoU, que é um regulador negativo de PHO, mas cuja função específica ainda é desconhecida. De qualquer forma, foi demonstrado que PhoU não é necessário para o transporte de fosfato via Pst (STEED; WANNER, 1993). A alta afinidade do sistema Pst é devida a proteína periplasmática PstS [ou PiBP (*Phosphate binding protein*)] que capta Pi presente no periplasma, proveniente diretamente do meio externo ou originado de compostos orgânicos fosforilados hidrolisados pela fosfatase alcalina, transportando-o até as proteínas PstA e PstC que formam o canal na membrana citoplasmática, pelo qual Pi penetra na célula (WEBB *et al.*, 1992). PstB é uma ATPase que interage com o canal transportador PstA-PstC, fornecendo energia para o transporte (Fig. 8) (CHAN; TORRIANI, 1996).

Além de transportar Pi, Pst tem um papel repressor sobre a atividade do regulon PHO em condições de abundância de Pi, pois a maioria das mutações em qualquer um dos cinco genes do operon *pst* causa a síntese constitutiva de todos os produtos do regulon PHO (STOCK *et al.*, 1989). Por isso, níveis basais de Pst são necessários para manter o regulon PHO reprimido em abundância de Pi (WANNER, 1996). O mecanismo pelo qual Pst reprime PHO não está ainda claro, mas é sabido que este independe do transporte de Pi via Pst, pois algumas mutações pontuais nos genes *pstA* e *pstC* foram capazes de eliminar o transporte de Pi, mas mantiveram a função regulatória de Pst (COX *et al.*, 1988, 1989). Um modelo possível para a regulação de PHO propõe que PstSCAB, PhoU e PhoR formariam um complexo que responderia aos níveis extracelulares de Pi (WANNER, 1996). Diferentemente de *E. coli*, em *Bacillus subtilis*, o gene *phoU* está ausente e mutações *pst* não induzem a síntese constitutiva do regulon PHO nesta bactéria (QI *et al.*, 1997). Resultados recentes mostraram que PhoU regula a expressão dos demais genes de Pst, que estão envolvidos diretamente no transporte de Pi (RICE *et al.*, 2009).

O sistema Pst da linhagem protótipo de EPEC E2348/69 é 99,2% idêntico ao de *E. coli* K-12. Já ao nível de DNA, as ORFs que compõe o operon *pst* são em média 97,5% idênticas. A única diferença significativa é uma deleção de 92 pb na região intergênica entre *pstA* e *pstB* de EPEC.

Figura 8. Esquema do transporte de fosfato via Pst. Pi penetra célula passando pela membrana externa e periplasma. Compostos fosforilados entram no periplasma e são clivados pela fosfatase alcalina (FA) liberando Pi . Em ambos os casos, os ânions de fósforo atravessam a porina PhoE para atingir o periplasma. PstS se liga ao Pi e interage com o canal formado por PstA e PstC. A energia necessária para o transporte ativo de Pi é proveniente da hidrólise de ATP promovida por PstB. A função de PhoU é desconhecida.

1.2.1 O Regulon PHO e a virulência em bactérias

Além de seu papel na captação e assimilação Pi , diversos estudos vêm mostrando que genes do regulon PHO estão relacionados à regulação de virulência em várias espécies bacterianas. Abaixo estão descritos os principais relatos publicados até o momento na literatura.

A inativação de *chvI*, um gene similar a *phoB* em *Agrobacterium tumefaciens*, torna a bactéria avirulenta (MANTIS; WINANS, 1993). Mutantes *phoB* de *Vibrio cholerae* mostraram menor capacidade em colonizar o intestino delgado de coelhos em comparação a linhagem selvagem (VON KRÜGER *et al.*, 1999). Philippe *et al.* (2006) relataram que a limitação de Pi é um sinal universal para o início da esporulação e a produção de toxina em *Clostridium perfringens*.

Uma mutação em um dos genes do operon *pst* produzida pela inserção do transposon *TnphoA* no gene *pstC* reduziu a patogenicidade da linhagem extra-intestinal de *E. coli* 5131 (O115:K”V165”:F165) isolada de leitão, tornando a bactéria avirulenta (DAIGLE *et al.*, 1995). Sinai e Bavoil (1993) verificaram que a inserção de *TnphoA* no operon *pst*, mais precisamente entre *pstA* e *pstB*, em EIEC aumentou em cerca de cinco vezes o nível de invasão á células epiteliais humanas *in vitro*, tornando a bactéria “hiper-invasiva”.

Na *E. coli* uropatogênica (UPEC) CFT073, mutações no gene *phoU* causaram uma diminuição de cerca de 100 vezes na capacidade de colonizar o trato urinário de camundongos quando comparado à linhagem selvagem (BAHRANI-MOUGEOT *et al.*, 2002; BUCKLES *et al.*, 2006). Da mesma forma, a deleção de *pst* em uma linhagem de *E. coli* extraintestinal aviária (APEC) reduziu a virulência da bactéria, causando diminuição no número de lesões nos órgãos, menos bactérias na corrente sanguínea e em tecidos dos frangos após a infecção (LAMARCHE *et al.*, 2005). Mutantes *pst* de linhagens extraintestinais de *E. coli* (ExPEC) tiveram a síntese de 1-pirofosfato reduzida, causando modificações na composição do lipídio A, além de alterações na expressão de genes envolvidos na síntese do LPS (LAMARCHE *et al.*, 2008).

Batissou *et al.* (2003) isolaram dois mutantes *pstS* em uma cepa de *E. coli* enteropatogênica de porcos (PEPEC), cuja adesão aos enterócitos de leitões foi significativamente menor em relação à cepa selvagem.

No patógeno intracelular *Shigella flexneri*, uma mutação no gene *pstS* levou à formação de placas menores sobre a superfície de células epiteliais humanas. (RUNYEN-JANECKY *et al.*, 2005).

Mutações nos genes *pstS* e *pstA* do patógeno extra-intestinal *Proteus mirabilis* foram deficientes na competição pela colonização na urina, bexiga e rins de camundongos em relação a linhagem selvagem (BURALL *et al.*, 2004; JACOBSEN *et al.*, 2008). Na bactéria *Edwardsiella tarda*, que causa infecção intestinal em humanos e septicemia em peixes, mutações nos genes *pstC*, *pstB* e *pstS* atenuaram significativamente a virulência em um modelo de infecção em peixes (SRINIVASA RAO *et al.*, 2003, 2004).

Além de estar envolvido na virulência, genes do regulon PHO afetam a formação de biofilmes em bactérias. A indução de genes do regulon PHO causada pela baixa concentração de Pi ou por mutações em genes do operon *pst* reduziram a formação de biofilme em *Pseudomonas aureofaciens* (MONDS *et al.*, 2001). Por outro lado, a limitação de Pi aumentou a adesão de *A. tumefaciens* e a super-expressão de PhoB causou um aumento da formação de biofilme independentemente da concentração de Pi no meio (DANHORN *et al.*, 2004).

Vale destacar que na maioria dos casos acima mencionados, o efeito de genes de PHO sobre a virulência das bactérias descritas até o momento foi constatado de forma casual, geralmente através de mutações aleatórias seguidas de seleção ou varredura de alterações em fenótipos relacionados à virulência.

1.3 O fator σ^s (RpoS) da RNA polimerase

Em *E. coli*, o núcleo da RNA polimerase é formado por 5 subunidades: uma única cópia de cada uma das subunidades β , β' e ω , e mais duas cópias da subunidade α (ISHIHAMA, 2000). As subunidades β e β' formam o sítio ativo da enzima, a porção amino-terminal da subunidade α está envolvida na montagem das subunidades β e β' , enquanto que a porção carboxi-terminal é a responsável pela ligação à região promotora do gene no DNA (BROWNING; BUSBY, 2004). O papel da subunidade ω ainda não está totalmente esclarecido.

Embora seja cataliticamente ativo, o núcleo da RNA polimerase somente é capaz de se ligar a região promotora do gene e iniciar a transcrição por meio de uma sexta subunidade conhecida como fator σ . Juntos, o fator σ e o cerne formam a holoenzima ($E\sigma$) (BROWNING; BUSBY, 2004). Portanto, o fator σ reconhece especificamente e posiciona a RNA polimerase na região promotora do gene, além de facilitar o desenrolamento da dupla fita de DNA (WÖSTEN, 1998; BROWNING; BUSBY, 2004). Embora se acredite que o fator σ seja liberado após o início da transcrição (METZGER *et al.*, 1993), foi mostrado que em muitos casos, o fator σ^{70} permanece ligado ao cerne da polimerase durante o processo de transcrição (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2001; KAPANIDIS *et al.*, 2005).

E. coli possui sete fatores σ conhecidos: σ^{70} (ou σ^D), σ^S (ou σ^{38}), σ^H (ou σ^{32}), σ^F

(ou σ^{28}), σ^E (ou σ^{24}) σ^{FecI} e σ^N (ou σ^{54}). Os seis primeiros estão incluídos na família de fatores σ^{70} , que reconhecem sequências de 5 a 6 pares de bases localizadas aproximadamente nas posições -35 e -10 em relação ao sítio de início de transcrição. Já a família de fatores σ^{54} é formada por proteínas funcionalmente similares, mas estruturalmente distintas da família σ^{70} (PAGET; HELMANN, 2003; WÖSTEN, 1998). O principal fator σ é σ^{70} ou σ^D , também conhecido como fator σ vegetativo, pois está envolvido na transcrição de genes predominantemente expressos durante a fase exponencial de crescimento (TANAKA *et al.*, 1993).

O fator σ^S ou RpoS é o principal fator σ em *E. coli* depois de σ^{70} . Seu nome foi dado devido ao fato de estar associado a resposta celular à carência de nutrientes (*starvation*) e ser predominantemente expresso durante a entrada na fase estacionária de crescimento (*stationary*) (LANGE; HENGGE-ARONIS, 1991). Também é conhecido como σ^{38} , devido ao seu peso molecular de 38 kDa comum em muitas linhagens de *E. coli* (mas não em todas). É considerado o regulador chave na resposta geral ao estresse, que ocorre quando há uma pausa ou diminuição drástica no crescimento, desencadeando mecanismos para a sobrevivência da célula nessas situações (HENGGE-ARONIS, 2002).

A maioria dos cerca de 70 genes regulados por σ^S estão envolvidos na resposta geral ao estresse, ativada na presença de radiação ultravioleta, choque térmico, pH ácido, estresse oxidativo, hiper-osmolaridade e etanol. σ^S induz modificações no envelope celular que alteram a morfologia da célula e também está relacionado à morte celular programada. Os níveis de σ^S também aumentam em resposta à carência de fontes de carbono, nitrogênio, fosfato e aminoácidos, bem como também devido ao aumento da densidade celular (HENGGE-ARONIS, 2002).

σ^S é codificado pelo gene *rpoS*, formando um operon com o gene *nlpD* (LANGE; HENGGE-ARONIS, 1994a). Por este motivo, σ^S é também chamado RpoS. A regulação da expressão de RpoS é muito complexa, sendo controlada ao nível da transcrição, tradução e estabilidade da proteína (LANGE; HENGGE-ARONIS, 1994b). Embora os níveis de RpoS sejam baixos em células em crescimento exponencial, os níveis de seu mRNA são relativamente altos. Isto sugere que a regulação de RpoS se dá principalmente ao nível pós-transcricional (LANGE;

HENNGE-ARONIS, 1994b).

Entre as principais moléculas envolvidas na regulação da transcrição de *rpoS* podemos citar cAMP, polifosfatos e o nucleotídeo (p)ppGpp. Este último será descrito abaixo com mais detalhes. O complexo CRP-cAMP regula negativamente *rpoS* (LANGE; HENNGE-ARONIS, 1994b), enquanto que polifosfatos (SHIBA *et al.*, 1997) e (p)ppGpp têm efeito positivo. Células deficientes na síntese de (p)ppGpp expressam menos RpoS, e quando os níveis de (p)ppGpp são elevados artificialmente, ocorre acúmulo de RpoS, mesmo durante a fase exponencial (GENTRY *et al.*, 1993).

Após sua síntese, RpoS pode sofrer extensa proteólise. De fato, este é o principal mecanismo de modulação dos níveis de RpoS na célula (LANGE; HENGGE-ARONIS, 1994b). Além disso, RpoS também é regulado ao nível de tradução pelo mRNA de *pst*. Ruiz e Silhavy (2003) mostraram que uma mutação *pstS* constitutiva, ou seja, que é deficiente na síntese de PstS, mas que expressa os genes distais do operon (*pstC-pstA-pstB-phoU*), produz níveis altos de RpoS durante a fase exponencial de crescimento. Schurdell *et al.* (2007) sugeriram que o efeito positivo de Pst sobre RpoS é devido ao fato de que a região intergênica entre *pstA* e *pstB* formada pelo processamento do mRNA de *pst* (AGUENA *et al.*, 2002) é similar a um pequeno RNA (DsrA) que normalmente interage com a região 5' não-codificadora de *rpoS*, estimulando a tradução de seu mRNA. O mRNA intergênico entre *pstA* e *pstB* estaria mimetizando o efeito positivo de DsrA sobre a tradução de *rpoS*.

Devido a natureza de sua função regulatória global, é de se esperar que fatores σ alternativos regulem a expressão de genes diretamente ou indiretamente relacionados à virulência (KAZMIERCZAK *et al.*, 2005). De fato, RpoS está envolvido na regulação da patogenicidade em várias bactérias.

Análises da expressão das proteínas Esp, bem como da região promotora do operon LEE4 em EHEC mostraram que a transcrição desses genes é positivamente regulada por RpoS (BELTRAMETTI *et al.*, 1999). Nesta bactéria, *rpoS* também aumentou o nível de adesão à cultura de células intestinais (BHAGWAT *et al.*, 2006) e a expressão dos operons de LEE via o RNA regulador DsrA, que requer RpoS

para seu efeito positivo sobre a expressão de *ler* (LAABERKI *et al.*, 2006). Além disso, a expressão de hemolisina é fortemente dependente de RpoS em EHEC (LI *et al.*, 2008). RpoS também regula positivamente a expressão de genes de LEE, e é essencial para a virulência de *C. rodentium* (DONG *et al.*, 2009).

Em um modelo de competição, o mutante *rpoS* de uma linhagem de *E. coli* patogênica intestinal de rato colonizou o intestino grosso em um nível significativamente mais alto do que a linhagem selvagem (KROGFELT *et al.*, 2000). Em *V. cholerae*, Yildiz e Schoolnik (1998) mostraram que *rpoS* não tem efeito sobre a sobrevivência da bactéria em intestinos de ratos. Porém, Merrel *et al.* (2000), relataram que o mutante *rpoS* colonizou significativamente menos que a cepa selvagem em um ensaio de competição.

Em *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium, mutantes *rpoS* apresentaram menor capacidade em colonizar placas de Peyer após infecção oral em camundongos. RpoS controla a expressão dos genes plasmidiais *spv* envolvidos na virulência desta bactéria, e também regula genes cromossomais associados à virulência (FANG *et al.*, 1992; NOREL *et al.*, 1992; KOWARZ *et al.*, 1994; NICKERSON; CURTISS III, 1997; WILMES-RIESENBERG *et al.*, 1997). RpoS também é fundamental para a expressão de Yst, uma enterotoxina de *Yersinia enterocolitica* (IRIARTE *et al.*, 1995) e para a invasão de células endoteliais microvasculares do cérebro por uma cepa de *E. coli* K1 (WANG; KIM, 2000). RpoS também afeta positivamente a formação de biofilmes por *E. coli*. Mutações em *rpoS* afetam a densidade e o arranjo das células no biofilme (ADAMS; MCLEAN, 1999).

1.4 Guanosina tetrafosfato (ppGpp)

A molécula de alarme ppGpp está relacionada à resposta severa em *E. coli*, que é caracterizada principalmente pela queda nos níveis de rRNA e ribossomos, e pela drástica redução dos níveis de tradução de proteínas (HASELTINE *et al.*, 1972). Este tipo de resposta ocorre quando bactérias são submetidas à carência de nutrientes, principalmente aminoácidos. A molécula que sinaliza essa resposta é um pequeno nucleotídeo chamado guanosina tetrafosfato ou ppGpp. ppGpp é sintetizado a partir de GTP, ao qual é agregado uma molécula de pirofosfato

proveniente do ATP, resultando na guanosina pentafofato (pppGpp) (METZGER *et al.*, 1988). A maioria das moléculas de pppGpp é então convertida em ppGpp por ação da hidrolase Gpp. Uma vez que tanto ppGpp como pppGpp acumulam-se na bactéria ao mesmo tempo, é comum designar ambas as formas deste nucleotídeo por (p)ppGpp (CASHEL *et al.*, 1996; MAGNUSSON *et al.*, 2005; POTRYKUS; CASHEL, 2008; SRIVATSAN; WANG, 2008).

Em *E. coli*, duas vias são conhecidas para a síntese de (p)ppGpp. A primeira envolve a proteína RelA, associada ao ribossomo, que sintetiza (p)ppGpp em resposta à presença de tRNA descarregados no sítio A do ribossomo durante a carência de aminoácidos (HASELTINE; BLOCK, 1973; CASHEL *et al.*, 1996). Além da limitação de aminoácidos outras condições de estresse desencadeiam a síntese desta pequena molécula. Neste caso, a síntese de (p)ppGpp é realizada predominantemente por uma segunda proteína, SpoT. Pouco é conhecido sobre o mecanismo de síntese de (p)ppGpp via SpoT, e tampouco sobre como ela detecta a carência de nutrientes. Situações de estresse como limitação de Pi, carbono, ferro e ácidos graxos, induzem o acúmulo de (p)ppGpp via SpoT (CASHEL *et al.*, 1996; SPIRA *et al.*, 1995; VINELLA *et al.*, 2005; BATTESTI; BOUVERET, 2006). SpoT é uma enzima bifuncional pois além de sintetizar, também hidrolisa (p)ppGpp, evitando seu acúmulo no interior da célula (MAGNUSSON *et al.*, 2005). Hoje em dia sabemos que o acúmulo de (p)ppGpp dependente de SpoT é mais devido a inibição da atividade hidrolítica da enzima do que a um aumento na síntese do nucleotídeo (MURRAY; BREMER, 1996).

A proteína DksA complementa o efeito de (p)ppGpp interagindo com a RNA polimerase, reduzindo a meia vida do complexo aberto e inibindo a atividade do promotor de rRNA, sendo essencial para o efeito de fatores ambientais sobre a expressão de rRNA (PAUL *et al.*, 2004). Além disso, DksA tem efeito positivo sobre a indução de RpoS via (p)ppGpp, provavelmente ao nível traducional (BROWN *et al.*, 2002).

O acúmulo de (p)ppGpp é importante para a expressão dos genes do regulon PHO durante a limitação de Pi e em contrapartida a presença do regulador PhoB afeta positivamente o acúmulo de (p)ppGpp (SPIRA; YAGIL, 1998).

Um dos principais alvos de (p)ppGpp na célula é a RNA polimerase, onde interage com o sítio ativo da enzima (ARTSIMOVITCH *et al.*, 2004). Esta interação afeta a afinidade da RNA polimerase pelos seus promotores. (p)ppGpp também influencia a competição entre fatores σ pelo cerne da RNA polimerase, favorecendo a ligação de fatores σ alternativos, tal como RpoS, o que favorece a transcrição de genes relacionados a estresses (KVINT *et al.*, 2000; JISHAGE *et al.*, 2002).

(p)ppGpp está também associado à virulência de diversas bactérias. Em EHEC, o aumento dos níveis de (p)ppGpp causado pela passagem de um meio rico para um meio mais pobre ou a entrada na fase estacionária aumentaram o nível de adesão e a expressão de LEE. Foi também demonstrado que juntamente com DksA, o acúmulo de (p)ppGpp é essencial para a ativação de *ler* e *pch*, genes que codificam os principais ativadores de LEE em EHEC (NAKANISH *et al.*, 2006). Fis, que tem influência positiva sobre a expressão de LEE4 (ver acima) é regulado negativamente por (p)ppGpp e DksA. Na ausência de DksA o período de transcrição do mRNA de *fis* é estendido até a fase estacionária (MALLIK *et al.*, 2006).

Outro patógeno intestinal, *S. enterica* sorovar Typhimurium apresentou menor virulência e menor expressão dos reguladores globais de virulência Hila e InvF na ausência de (p)ppGpp (PIZARRO-CERDÁ; TEDIN, 2004; SONG *et al.*, 2004; THOMPSON *et al.*, 2006). (p)ppGpp estimula a produção da fímbria do tipo 1 em UPEC por promover a expressão da recombinase FimB, envolvida na inversão da região promotora do operon *fim* (ABERG *et al.*, 2006), embora resultados *in vitro* contradigam essa afirmação (ABERG *et al.*, 2008). Mutantes de *E. coli* nulos para (p)ppGpp ((p)ppGpp⁰) e DksA não formam agregados e são menos móveis, além de apresentarem menor nível de adesão em um modelo de aglutinação de leveduras (MAGNUSSON *et al.*, 2007).

No patógeno nosocomial *Enterococcus faecalis*, a supressão da síntese de (p)ppGpp atenuou a virulência em um modelo de infecção com *Caenorhabditis elegans* (ABRANCHES *et al.*, 2009). Da mesma forma, uma mutação do gene *relA* reduziu a produção do plúvis TCP e da toxina colérica, dois importantes fatores de virulência de *V. cholerae*, e reduziu a colonização da bactéria em intestinos de camundongos (HARALALKA *et al.*, 2003). SpoT é essencial para a replicação e

transmissão em macrófagos no patógeno oportunista *Legionella pneumophila* (DALEBROUX *et al.*, 2009) e para a sobrevivência de *Helicobacter pylori* no interior de macrófagos (ZHOU *et al.*, 2008).

A inserção de uma mutação no gene *relA* aboliu a síntese de (p)ppGpp em *P. aeruginosa*, causando uma atenuação da patogenicidade. O papel de (p)ppGpp na virulência foi demonstrado também em *Brucella* (DOZOT *et al.*, 2006), *Campylobacter jejuni* (GAYNOR *et al.*, 2005) e *Listeria monocytogenes* (TAYLOR *et al.*, 2002).

Em *E. coli*, a formação de biofilmes em meios de cultura limitados em nutrientes é dependente de (p)ppGpp. Na falta de (p)ppGpp, a densidade celular do biofilme é menor, alterando a morfologia do mesmo (BALZER; MCLEAN, 2002).

Portanto, além de ser um regulador global, (p)ppGpp exerce um papel importante na regulação da virulência em uma grande variedade de bactérias, sugerindo uma forte relação entre genes envolvidos na resposta ao estresse e a patogenicidade.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal deste trabalho foi estudar a relação entre genes relacionados ao estresse em *Escherichia coli* e a adesão e expressão de adesinas em *Escherichia coli* enteropatogênia (EPEC). Para estudar essa relação, foram realizados os seguintes experimentos:

- Inserção de mutações em genes envolvidos na regulação do regulon PHO e avaliação do efeito sobre adesão, expressão de adesinas e expressão do regulador global PerA.
- Análise do efeito da mutação e super-expressão do gene *rpoS* sobre a adesão e expressão de adesinas.
- Avaliação do papel de (p)ppGpp sobre a adesão e expressão de adesinas sob diferentes condições.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura e soluções

Meio Luria-Bertani (LB) (MILLER, 1992)

1% (m/v) extrato de triptona, 0,5% (m/v) extrato de levedura, 1% (m/v) NaCl; pH 7,4.

Meio A (meio semi-rico utilizado para indução de carência de Pi) (LEVINTHAL *et al.*, 1962)

0,12 M Tris, 80 mM NaCl, 20 mM KCl, 20 mM NH₄Cl, 3 mM Na₂SO₄, 1 mM MgCl₂, 0,2 M CaCl₂, 2 µM ZnCl₂, 0,5% (m/v) de glicose, 0,5% (m/v) peptona; pH 7,5.

Meio SOC (HANAHAN, 1985)

2% (m/v) triptona, 0,5% (m/v) extrato de levedura, 10 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 10 mM MgCl₂.

Meio GYT (TUNG; CHOW, 1995)

10% (v/v) glicerol, 0,125% (m/v) extrato de levedura, 0,25% (m/v) triptona.

Meio T-salts (TORRIANI, 1966)

0,468% (m/v) NaCl, 0,15% (m/v) KCl, 0,108% (m/v) NH₄Cl, 1,452% (m/v) Tris-base, 0,02% (m/v) MgCl₂.6H₂O, 0,035% (m/v) Na₂SO₄, 0,2 ml CaCl₂ (1 M), 0,2 ml FeCl₃ (0,01 M), 0,2 ml ZnCl₂ (0,01 M), 7,5 ml HCl (12 M), 0,2% glicose; pH 7,5. Quando não mencionada, a concentração de fosfato foi de 1 mM KH₂PO₄.

Tampão Sorensen

16 mM KH₂PO₄, 18 mM Na₂HPO₄.2H₂O, 51 mM Na₂HPO₄.

Tampão PBS (Solução Salina Tamponada)

136,8 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄; pH 7,4.

Tampão TE (Tris-EDTA)

10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8

Tampão TAE (Tris-acetato EDTA)

40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA; pH 8

Tampão MOPS

200 mM MOPS, 50 mM acetato de sódio, 10 mM EDTA

Quando necessário, antibióticos foram adicionados nas seguintes concentrações: canamicina, 50 µg/ml; tetraciclina, 15 µg/ml; ampicilina, 100 µg/ml; cloranfenicol, 20 µg/ml e espectinomicina, 100 µg/ml.

3.2 Cepas, plasmídios e oligonucleotídios

As linhagens bacterianas utilizadas estão descritas na Tabela 1, os plasmídios na Tabela 2 e os oligonucleotídeos na Tabela 3.

Tabela 1 – Linhagens de bactérias.

Linhagem	Genótipo	Fonte
BS1	MG1655 <i>phoB23 proC::Tn10</i>	Coleção do laboratório
BS10	MG1655 <i>pstS1::Tn5</i> (Km ^R)	Coleção do laboratório
BS16	MG1655 <i>rpoS::Tn10</i>	Coleção do laboratório
BS7	MG1655 $\Delta(pstSCAB-phoU)$ 560::Km ^R	Spira <i>et al.</i> (1995)
BS8	MG1655 <i>proC::Tn10</i>	Transdução de <i>proC::Tn10</i> a partir de RW3390 com P1 <i>vir</i>
BW10200	$\Delta lac-169 phoB519::Tn5 creB510 thi$	Steed e Wanner (1993)
C3T	Hfr <i>relA1 pit-10 spoT1 tonA22 phoR69</i>	Echols <i>et al.</i> (1961)
CF12489	CF1649 <i>argA::Tn10 relA</i> ⁺	Michael Cashel
CFP1	E2348/69 <i>rpoS::Tn10</i>	Transdução de <i>rpoS::Tn10</i> a partir de BS6 com P1 <i>clr100</i>
E2348/69	EPEC O127:H6	Levine <i>et al.</i> (1985)
GMF175	E2348/69 $\Delta(pstSCAB-phoU)$ 560::Km ^R	Transdução de $\Delta(pstSCAB-phoU)$ 560::Km ^R a partir de BS7 com P1 <i>vir</i>
GMF195	LRT9 $\Delta(pstSCAB-phoU)$ 560::Km ^R	Transdução de $\Delta(pstSCAB-phoU)$ 560::Km ^R a partir de BS7 com P1 <i>vir</i>
GMF197	KM32 <i>pstS::Km^R</i>	Este estudo
GMF199	E2348/69 <i>phoB::Cm^R</i>	Este estudo
GMF200	pBS1 em GMF199	Este estudo
GMF201	pGM2 em GMF195	Este estudo
GMF202	pGM2 em GMF175	Este estudo
GMF204	LRT9 $\Delta relA::KmR$	Transdução de $\Delta relA::KmR$ a partir de NP52 com P1 <i>vir</i>

(continua)

Tabela 1 – Linhagens de bactérias (continuação).

Linhagem	Genótipo	Fonte
GMF205	LRT9 $\Delta relA :: Km^R \Delta spoT :: Cm^R$	Transdução de $\Delta spoT :: Cm^R$ a partir de NP52 com P1 <i>vir</i> em GMF204
GMF210	pBS1 em JC1	Este estudo
GMF211	LRT9 <i>pstS1::Tn5</i>	Transdução de <i>pstS1::Tn5</i> a partir de BS10 com P1 <i>vir</i>
GMF236	LRT9 <i>phoB23 proC::Tn10</i>	Transdução de <i>phoB23 proC::Tn10</i> a partir de BS1 com P1 <i>vir</i>
GMF246	pNP5 em CFP1	Este estudo
GMF247	LRT9 $\Delta(pstSCAB-phoU) 560::Km^R phoB23 proC::Tn10$	Transdução de <i>phoB23 proC::Tn10</i> a partir de BS1 em GMF195 com P1 <i>vir</i>
GMF248	pBS16 em GMF211	Este estudo
GMF257	LRT9 <i>phoR69</i>	Transdução de <i>proC::Tn10</i> a partir de BS8 seguida de transdução de <i>phoR69 proC⁺</i> a partir de C3T com P1 <i>vir</i>
GMF260	pGM22 em GMF205	Este estudo
GMF262	pGM24 em GMF204	Este estudo
GMF264	pBS1 em GMF257	Este estudo
GMF269	pGB2 em GMF195	Este estudo
GMF275	LRT9 <i>pstS::Km^R</i>	Transdução de <i>pstS::Km^R</i> a partir de GMF197 com P1 <i>vir</i>
GNF276	pBS16 em GMF275	Este estudo
GMF288	pBS11 em LRT9	Este estudo
GMF290	LRT9 <i>rpoS::Tn10</i>	Transdução de <i>rpoS::Tn10</i> a partir de BS16 com P1 <i>vir</i>
GMF293	pNP5 em GMF290	Este estudo
GMF295	pNP5 em E2348/69	Este estudo
GMF296	LRT9 $\Delta relA :: Km^R zib563::Tn10 spoT^+$	Transdução a partir de MC4100TF <i>spoT1655</i> com P1 <i>vir</i> em GMF205
GMF302	LRT9 <i>argA::Tn10 relA⁺</i>	Transdução de <i>argA::Tn10 relA⁺</i> a partir de CF12489 com P1 <i>vir</i> em GMF204

(continua)

Tabela 1 – Linhagens de bactérias (continuação).

Linhagem	Genótipo	Fonte
GMF46	E2348/69 <i>pstS1::Tn5</i>	Transdução de <i>pstS1::Tn5</i> a partir de BS10 com P1vir
GMF49	pGM2 em GMF46	Este estudo
JC1	LRT9 <i>phoB519::Tn5</i>	Transdução de <i>phoB519::Tn5</i> de BW10200 com P1 <i>vir</i>
JPN15	EPEC E2348/69 curada de pEAF	Levine <i>et al.</i> (1985)
KM32	$\Delta recBCD::Ptac-gam-bet-exo cat$	Murphy e Campellone (2003)
LRT9	EPEC O111:abH2	L. R. Trabulsi
MC4100TF <i>spoT</i> 1655	MC4100TF <i>spoT</i> ⁺ <i>zib563::Tn10</i>	Spira <i>et al.</i> , 2008
MG1655	<i>E. coli</i> K-12 selvagem	Xiao <i>et al.</i> (1991)
NP52	MG1655 $\Delta relA::Km^R$ $\Delta spoT::Cm^R$	Coleção do laboratório
RW3390	$\Delta [lacU169] proC::Tn10 leu thi strR$	R. Weisberg

(conclusão)

Tabela 2 – Vetores e plasmídios.

Plasmídio	Característica	Fonte
pACT3	Vetor de clonagem, promotor <i>lac</i> , <i>lacI^q</i>	Thomas Linn
pBS1	<i>phoBR</i> de <i>E. coli</i> K-12 clonado em pBR322	Spira e Yagil (1998)
pBS11	promotor de <i>pstS</i> clonado em pKK232-8	Taschner <i>et al.</i> (2004)
pBS16	<i>pstS</i> clonado em pKK232-8	Aguena <i>et al.</i> (2009)
pGB2	vetor de clonagem	Churchward <i>et al.</i> (1984)
pGEM T-easy	Vetor de clonagem	Promega
pGM14	promotor de <i>bfpA</i> clonado em pRK/ <i>lacZ</i> 290	Este estudo
pGM17	promotor de <i>perA</i> clonado em pRK/ <i>lacZ</i> 290	Este estudo
pGM18	promotor de LEE5 clonado em pRK/ <i>lacZ</i> 290	Este estudo
pGM2	<i>pstSCAB-phoU</i> de E2348/69 clonado em pGB2	Este estudo
pGM21	cassete de resistência à espectinomicina (Sp^R) de pJL74 inserido em pUC19	Este estudo
pGM22	<i>spoT</i> clonado em pGM21	Este estudo
pGM24	<i>relA</i> clonado em pGM21	Este estudo
pGM29	promotor de <i>perABC</i> clonado em pRK/ <i>lacZ</i> 290 contendo um cassete Sp^R	Este estudo
pGM4	Fragmento truncado de <i>phoB</i> clonado em pKNOCK-Cm	Este estudo
pGM7	Km ^R inserido em <i>pstS</i> de pBS16	Este estudo
pJL74	Plasmídio contendo cassete Sp^R	LeDeaux e Grossman (1995)
pKK232-8	Vetor de clonagem contendo o gene <i>cat</i> sem promotor	Amersham Biosciences
pKNOCK-Cm	vetor suicida	Alexeyev (1999)
pNP5	<i>rpoS⁺</i> de MG1655 clonado em pACT3	Coleção do laboratório
pRK/ <i>lacZ</i> 290	Vetor de poucas cópias contendo o gene <i>lacZ</i> sem promotor	Gober e Shapiro (1992)
prpoD	<i>rpoD⁺</i> clonado em pBR322	K. Makino
pUC19	Vetor de clonagem	Yanisch-Perron <i>et al.</i> (1985)
pUC4K	pUC19 contendo cassete de resistência à canamicina (Km ^R)	Pharmacia

Tabela 3 – Oligonucleotídeos.

Oligonucleotídeo	Sequência
bfp-A	5' - AAT GGT GCT TGC GCT TGC TGC
bfp-B	5' - GCC GCT TTA TCC AAC CTG GT
bfp-P1	5' - GCACTGGTCATGGATACAGTT
bfp-P2	5' - TCA GAC GCA GAC TGG TAG TAA
eae-A	5' - ACG TTG CAG CAT GGG TAA CTC
eae-B	5' - GAT CGG CAA CAG TTT CAC CTG
lacZ-1391	5' - CCT CTT CGC TAT TAC GCC AG
per-P1	5' - CTT AGC CGC GTG TCC ACT AT
per-P2	5' - TTC GGT GAA TTC TTT CTT GTT TC
phoB-4821	5' - TCA AAC ACC TCA AGC GCG AG
phoB-5430	5' - GCA AAG TAG AAG CTT CAG CAC C
pst1	5' - TCC TGC GAA TTC CAT GTG AC
pst2	5' - GAC CAT GCC TGC AGT TAT TA
relA-A	5' - AGC AGA ATG CGC GTC TTA AT
relA-B	5' - TGC TGA CCA GTT CAG CAA G
rpoD1	5' - GCC GAA GCA GTT TGA CTA CC
rpoD2	5' - GCC ACG GTT GGT GTA TTT CT
spoT-A	5' - ATT GCT GAA GGT CGT CGT TAA T
spoT-B	5' - ACG TTA TGA GGT TTG TGG ACC T
tir-P1	5' - AGT GGA TCC CAT TAC ACG TTT T
tir-P2	5' - CCG TCT GTT TGT GAA GGT AGT G

3.3 Manipulações de DNA e técnicas de biologia molecular

3.3.1 Extração de plasmídios (Mini-prep)

Bactérias foram crescidas durante a noite em 2 ml de meio LB. Em seguida, a cultura foi centrifugada e ressuspensa em 100 µl de uma solução contendo 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA e 20 µg RNase A. A esta solução foi adicionado 100 µl de tampão de lise (200 mM NaOH, 1% SDS) por cinco minutos a 4 °C. A seguir, foi adicionado 120 µl de 3 M acetato de potássio, pH 5,5. Após centrifugação a 13000 rpm, o sobrenadante foi transferido para outro tubo onde foi adicionado 300 µl de

uma solução de fenol:clorofórmio (1:1) previamente equilibrado com 0,1 M Tris pH 8 e a centrifugação foi repetida. Ao sobrenadante colhido foram adicionados 300 µl de isopropanol para precipitar o DNA. Novamente a solução foi centrifugada e o sobrenadante descartado. O DNA precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em tampão TE.

3.3.2 Extração de DNA genômico

A cultura bacteriana foi crescida durante a noite em 1,5 ml de meio LB. No dia seguinte, bactérias foram centrifugadas e ressuspendidas em 567 µl de TE e a seguir foram adicionados 30 µl de 10% SDS e 3 µl de proteinase K (20 mg/ml). A reação foi incubada por 1 hora a 37 °C. Após a incubação foram adicionados 100 µl de 5 M NaCl e a solução foi homogeneizada. Em seguida, foram acrescentados 80 µl de uma solução de 10% de brometo de cetil trimetilamônia (CTAB) e 0,7 M NaCl, seguido por uma incubação de 10 minutos a 65°C. Após a adição de igual volume de clorofórmio, as amostras foram centrifugadas a 13000 rpm por cinco minutos. Ao sobrenadante coletado foi adicionado uma solução de fenol:clorofórmio (1:1) previamente equilibrado com 0,1 M Tris pH 8 e o procedimento de centrifugação foi repetido. Um volume de 60% de isopropanol foi adicionado para precipitar o DNA, que foi centrifugado por 5 minutos a 13000 rpm, lavado com etanol 70% e ressuspendido em TE.

3.3.3 Digestão de DNA com enzimas de restrição

As amostras de DNA foram digeridas totalmente durante quatro horas ou durante noite a 30 °C ou 37 °C com enzimas de restrição (Fermentas) conforme recomendado pelo fabricante. No caso de digestão parcial da amostra, o procedimento está descrito com detalhes abaixo.

3.3.4 Ligação de moléculas de DNA

A ligação de moléculas de DNA com vetores plasmidiais foi realizada utilizando 1 U de ligase (Fermentas), duas a três vezes excesso de inserto em relação ao vetor e tampão da enzima fornecido pelo fabricante. A reação foi realizada por 18 horas a

15 °C.

3.3.5 Reações de PCR

As amplificações de DNA por PCR foram feitas no termociclador *Master Cycler Personal* (Eppendorf). Em cada reação foram adicionados 0,2 mM de cada dNTP, 1 mM MgCl₂, 1,5 µM de cada um dos oligonucleotídeos (Invitrogen), 2,5 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen ou Fermentas) e tampão da enzima fornecido pelo fabricante. O número de ciclos variou de 35 a 40. A temperatura de anelamento foi calculada subtraindo-se 3 a 4 graus da temperatura de *melting* (T_m) indicada pelo fabricante do oligonucleotídeo. A desnaturação do DNA foi realizada por 30 segundos a 95 °C. A extensão do DNA foi realizada a 72 °C, e o tempo calculado foi de 1 minuto por kb de DNA a ser amplificado.

3.3.6 Eletrotransformação de bactérias

A bactéria a ser transformada foi cultivada durante a noite em meio LB. No dia seguinte, a cultura foi diluída (1:100) em meio LB e cultivada até uma densidade óptica (DO₅₄₀) de 0,5 medida em espectrofotômetro (Pharmacia). Para obtenção de células eletrocompetentes, a cultura foi lavada duas vezes com água gelada. Em seguida, as bactérias foram ressuspensas em meio GYT. A cultura foi transferida para cubetas de eletroporação junto com 1 a 2 µl de DNA. A transformação foi realizada submetendo as células a um campo elétrico de 12 kV/cm, 25 µF e 200 Ω durante 5 ms no eletroporador *MicroPulser* (Bio-Rad). Logo em seguida, as bactérias foram ressuspensas em 1 ml de meio SOC e incubadas a 37 °C por 1-2h para expressar o gene de resistência ao antibiótico contido no plasmídeo. Para isolar as bactérias transformantes, cerca de 0,1 ml dessa cultura foi semeada sobre placas de ágar LB contendo o antibiótico apropriado.

3.3.7 Eletroforese e purificação de DNA

Amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel contendo 0,7 ou 1% de agarose em tampão TAE. Para a visualização das bandas de DNA, o gel foi corado com brometo de etídeo (0,1%) e visualizado no foto-documentador (Kodak

GL200). Para a purificação das bandas de DNA, o gel foi visualizado com o auxílio de uma luz ultravioleta portátil de comprimento de onda de 254 nm e as bandas de DNA desejadas foram cortadas do gel e purificadas com o *kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega), conforme recomendado pelo fabricante.

3.3.8 Sequenciamento de DNA

As amostras de DNA foram amplificadas por PCR, submetidas à eletroforese, purificadas conforme descrito acima e sequenciadas (ambas as fitas de DNA) com os iniciadores indicados na Tabela 2 utilizando-se o kit *BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit* em sequenciador automático modelo ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems/Hitachi).

3.4 Transferência de alelos por transdução com fago P1

3.4.1 Preparação do lisado de P1

A bactéria doadora foi cultivada durante a noite em meio LB. No dia seguinte, a cultura foi diluída 100 vezes no mesmo meio contendo 5 mM CaCl_2 e 0,2% glicose e cultivada até atingir a DO_{540} de aproximadamente 0,3. Neste momento foi adicionado 1/50 do volume da cultura de um lisado de fagos P1 *vir* contendo aproximadamente 10^9 fagos/ml. As bactérias foram então cultivadas por mais duas a três horas a 37 °C até que fosse observada a lise das células. Neste momento, clorofórmio foi adicionado ao lisado (1/20 do volume), para matar as bactérias que não sofreram lise e em seguida centrifugado para descartar os restos de bactérias. O lisado foi armazenado a 4 °C.

Para a preparação do lisógeno de P1 *clr100*, a cepa doadora foi cultivada durante a noite em meio LB e no dia seguinte diluída 100 vezes, e ressuspensa em LB e cultivada até atingir a $\text{DO}_{540} = 0,2$. Em seguida, foi adicionado um décimo do volume de lisado e 10 mM CaCl_2 . A cultura foi incubada por 1 hora a 32 °C e os lisógenos foram selecionados em placas ágar LB contendo cloranfenicol. Para a preparação do lisado, os lisógenos foram crescidos durante a noite a 32 °C sem agitação e no dia seguinte a cultura foi diluída 10 vezes e cultivada em meio LB a

37 °C com agitação até atingir a $DO_{540} = 0,3$. Após isso, a cultura foi incubada a 32 °C por 20 minutos e depois crescida a 37 °C por 2 horas até as bactérias lisarem. Neste momento foi adicionado clorofórmio conforme descrito acima.

3.4.2 Transdução por fago P1

A bactéria a ser transduzida foi crescida por 18 horas em meio LB. No dia seguinte, uma alíquota dessa cultura foi diluída em meio LB contendo 5 mM $CaCl_2$ e crescida a 37 °C sob agitação até atingir uma concentração de cerca de 5×10^8 bactérias/ml ($DO_{540} \simeq 0,5$). Um volume de 0,5 ml do lisado do fago P1 *vir* foi adicionado a 5 ml dessa cultura que em seguida foi incubada a 37 °C por 20 minutos. Em seguida, as bactérias foram centrifugadas por dez minutos a 5000 rpm e o sobrenadante foi descartado, e então foi adicionado 200 µl de meio LB e a cultura semeada em placas ágar LB contendo o antibiótico apropriado. Os transductantes foram selecionados pela aquisição de resistência ao antibiótico ou pela capacidade de crescer na ausência de algum aminoácido. Para a transdução com P1 *clr100*, a metodologia utilizada foi a mesma descrita acima, exceto que as placas foram incubadas a 39,5 °C para evitar a formação de lisógenos.

3.5 Obtenção e construção de mutantes

3.5.1 Construção de um mutante *pstS* não polar

Um cassete de resistência a canamicina foi obtido a partir da digestão de pUC4K com EcoRI. O cassete foi purificado e ligado ao plasmídio pBS16 (*pstS*⁺) previamente digerido com MunI, que corta dentro de *pstS*, dando origem a pGM7 (Fig. 9). pGM7 foi digerido com EcoRI e o fragmento *pstS*::Km^R foi purificado e transformado na linhagem KM32, de acordo com Murphy e Campellone (2003). Para selecionar bactérias em que ocorreu a recombinação entre o alelo *pstS* selvagem e o fragmento *pstS*::Km^R, os transformantes foram selecionados em meio contendo canamicina. Essa recombinação deu origem à cepa GMF197 (KM32 *pstS*::Km^R). A mutação *pstS*::Km^R foi transduzida para LRT9 por transdução com fago P1 conforme descrito acima.

3.5.2 Inserção de mutações em EPEC via transdução com o fago P1

3.5.2.1 Obtenção de mutantes de genes do regulon PHO

A deleção de *pst* nas cepas de EPEC E2348/69 e LRT9 foi realizada por meio da transdução por fago P1 vir a partir de um lisado da cepa BS7 (MG1655 $\Delta pst::Km^R$). Os mutantes no gene *pstS* foram também obtidos por transdução a partir das cepas doadoras GMF197 (*pstS::Km^R*) ou BS10 (*pstS1::Tn5*). Os transductantes foram selecionados em placas de ágar LB contendo canamicina. Mutantes *phoB* foram obtidos por meio de transdução de um lisado da cepa BW1200 (*phoB519::Tn5*) e selecionados em placas contendo canamicina. O duplo mutante *pst phoB* foi obtido por transdução da cepa LRT9 $\Delta pst::Km^R$ com um lisado da cepa BS1 (MG1655 *phoB23 proC::Tn10*), originando LRT9 $\Delta pst::Km^R$ *phoB23 proC::Tn10* (JC1).

A mutação *phoR69* foi transferida para LRT9 em dois passos. Primeiro, um lisado da cepa BS8 (MG1655 *proC::Tn10*) foi utilizado para transduzir *proC::Tn10* para LRT9, as bactérias foram selecionadas para resistência à tetraciclina e auxotrofia para prolina. Em seguida, um lisado de P1 da linhagem C3T (*phoR69 proC⁺*) foi usado para transduzir LRT9 *proC::Tn10* e os transductantes *phoR69 proC⁺* de LRT9 foram selecionados por crescimento em meio mínimo T-salts contendo 1 mM KH_2PO_4 e 0,2% glicose. Devido a pequena distância entre *proC* e *phoR* (0,3 minutos) a taxa de co-transdução entre os dois genes é de 85%. Os mutantes Δpst , *pstS* e *phoR* foram testados em relação à expressão constitutiva da fosfatase alcalina (FA) e os mutantes *phoB* foram testados em relação a não indução de FA sob limitação de fosfato.

A mutação *phoB::Cm^R* foi transferida para E2348/69 por meio da transformação com o vetor suicida pGM4 que carrega o alelo *phoB* truncado (descrito abaixo). A inserção de pGM4 no alelo *phoB* selvagem de E2349/69 gerou duas cópias truncadas de *phoB* que foi confirmada pela resistência a cloranfenicol e ausência de indução de FA em meio A -Pi devido a inativação de *phoB*.

3.5.2.2 Obtenção de mutantes *rpoS*

A mutação *rpoS* foi transferida para E2348/69 e LRT9 por transdução com o fago P1 *clr100* e P1 *vir*, respectivamente. A cepa BS16 (MG1655 *rpoS*::Tn10) foi utilizado como doadora. Os mutantes foram selecionados por resistência à tetraciclina e a avaliação do nível de RpoS foi realizada por meio de ensaios de catalase descritos abaixo.

Figura 9. Esquema representando a construção de de pGM7. O vetor pUC4K foi digerido com EcoRI e o cassete de resistência à canamicina (Km^R) foi ligado a pBS16 digerido com MunI. A ligação deu origem a pGM7. Os plasmídios não estão representados em escala.

3.5.2.3 Obtenção de mutantes de genes envolvidos na síntese de (p)ppGpp

A deleção do gene *relA* foi transferida para LRT9 via transdução por fago P1 a partir de um lisado da cepa NP52 (MG1655 $\Delta relA$::Km^R $\Delta spoT$::Cm^R), e os transductantes foram selecionados pela resistência à canamicina. O duplo mutante

$\Delta relA::Km^R \Delta spoT::Cm^R$ de LRT9 (GMF205) foi obtido por meio de transdução da linhagem LRT9 $\Delta relA::Km^R$ (GMF204) obtida na transdução anterior com o mesmo lisado, porém os transductantes foram selecionados pela resistência a cloranfenicol. A mutação *relA* foi confirmada pelo aumento da sensibilidade ao análogo de histidina aminotriazol (AT): bactérias foram semeadas em meio T-salts contendo 40 µg/ml de todos os 20 aminoácidos exceto histidina, 20 µg/ml de adenina, 20 mM aminotriazol (AT), 1 µg/ml tiamina, 0,2% glicose e 1 mM KH_2PO_4 , no qual somente bactérias *relA*⁺ são capazes de crescer (RUDD *et al.*, 1985). O principal efeito da AT é o bloqueio da biossíntese de histidina devido à inibição da enzima HisB (HILTON *et al.*, 1965). Entretanto, AT inibe também a síntese de purinas e por isso, o meio de cultura foi suplementado com adenina. Além disso, para diminuir o nível basal de (p)ppGpp, acentuando o efeito inibitório de AT, os aminoácidos foram adicionados. Para confirmar o fenótipo do duplo mutante $\Delta relA \Delta spoT$, bactérias foram crescidas em meio mínimo T-salts na qual bactérias (p)ppGpp⁰, que possuem múltiplas auxotrofias, não conseguem crescer.

3.5.3 Complementação *in cis* da mutação *relA*

Uma cópia selvagem do alelo *relA*⁺ foi transferida para LRT9 $\Delta relA::Km^R$ (GMF204) via transdução por fago P1 a partir da cepa CF12489 (*relA*⁺ *argA::Tn10*). Os transductantes *relA*⁺ *argA::Tn10* foram selecionados em meio LB contendo tetraciclina e posteriormente testados quanto a auxotrofia para arginina em meio mínimo T-salts. Para confirmar a complementação da mutação *relA*, os transductantes foram testados em relação a resistência a AT, conforme descrito acima.

3.6 Construção de plasmídios

3.6.1 Clonagem do operon *pst*

O plasmídio pGM2 foi construído por meio da ligação de um fragmento contendo todo o operon *pst* obtido por PCR utilizando o DNA genômico de E2348/69 como molde, e os oligonucleotídeos *pst1* e *pst2*, que adicionaram os sítios de restrição PstI e EcoRI às pontas do fragmento de DNA. O produto de PCR foi

digerido com PstI e EcoRI e ligado ao plasmídio de poucas cópias pGB2 previamente digerido com as mesmas enzimas (Fig. 10).

3.6.2 Clonagem de *relA* e *spoT*

Os genes *relA* e *spoT* da linhagem MG1655 foram amplificados por PCR utilizando os pares de iniciadores *relA*-A/*relA*-B e *spoT*-A/*spoT*-B, respectivamente. Os produtos de PCR foram clonados individualmente no vetor pGEM-T-Easy. Os plasmídios recombinantes foram digeridos com EcoRI e os genes *relA* e *spoT* foram purificados e subclonados individualmente no sítio EcoRI do vetor pGM21 (pUC19 Sp^R). Para construir pGM21, foi obtido o cassete de resistência à espectinomicina através da digestão do plasmídio pJL74 com BamHI e PstI. O fragmento correspondente ao cassete foi purificado e as pontas coesivas foram cegadas por meio de tratamento com o fragmento Klenow da DNA polimerase (Fermentas). O plasmídio pUC19 foi digerido com Scal e ligado ao cassete de resistência a espectinomicina proveniente de pJL74, originando pGM21 (Fig. 11).

3.6.3 Construção de fusões *bfpA-lacZ*, *per-lacZ* e LEE5-*lacZ*

A região promotora do operon LEE5 (*tir-eae-cesT*) foi amplificada por PCR utilizando como molde o DNA genômico da linhagem de EPEC E2348/69 e os iniciadores *tir*-P1 e *tir*-P2. Para amplificar a região promotora dos genes *bfpA* e *perA* foram utilizados o plasmídio EAF de E2348/69 como molde e os iniciadores *bfp*-P1/*bfp*-P2 e *per*-P1/*per*-P2, respectivamente. O fragmento obtido foi clonado no vetor de clonagem pGEM T-Easy. Em seguida, o plasmídio recombinante originado da ligação entre pGEM T-Easy e a região promotora de *bfpA*, LEE5 ou *perA* foi digerido com EcoRI. O fragmento correspondente a região promotora de *bfpA*, *perA* ou LEE5 foi purificado e subclonado no vetor pRK/*lacZ*290, originando os plasmídios pGM14, pGM17 e pGM18, respectivamente (Fig. 12). Para confirmar a orientação do promotor em relação ao gene *lacZ*, foi realizado sequenciamento utilizando os iniciadores *tir*-P1 (correspondente a uma região na fita (+) do DNA localizada no início do promotor LEE5) e *lacZ*-1391 (correspondente a fita (-) de DNA localizado no início do gene *lacZ*) para a fusão LEE5-*lacZ* e da mesma forma, foram utilizados os iniciadores *Per*-P1/*lacZ*-1391 para a fusão *perA-lacZ* e *bfp*-P1/*lacZ*-1391 para a

fusão *bfp-lacZ*.

Figura 10. Esquema representando a ligação do operon *pst* no vetor pGB2. O vetor foi digerido com PstI e EcoRI e ligado ao fragmento de PCR do operon *pst* contendo os mesmos sítios de restrição. As moléculas de DNA não estão representadas em escala. Sp^R/Sm^R: gene de resistência à espectinomicina e estreptomicina. MSC: múltiplo sítio de clonagem.

O plasmídeo pGM29 foi obtido a partir da inserção do cassete de resistência à espectinomicina no plasmídeo pGM17. pGM17 foi digerido parcialmente por EcoRV (que corta dentro do gene de resistência à tetraciclina e em mais um sítio) com 0,2 unidades da enzima por 2 horas. O cassete de resistência à espectinomicina foi obtido da mesma forma como descrito para a construção de pGM21. O plasmídeo pGM17 foi ligado ao cassete e foram isoladas bactérias resistentes a

espectinomomicina que eram sensíveis a tetraciclina, e que portanto, cuja inserção do cassete ocorreu dentro do gene de resistência à tetraciclina (Fig. 13).

3.6.4 Construção do vetor suicida pGM4

Um fragmento truncado do gene *phoB* de cerca de 400 pb foi amplificado por PCR utilizando os oligonucleotídeos *phoB*-4821 e *phoB*-5240 e clonado no vetor pGEM T-Easy (Promega). O plasmídeo recombinante foi digerido com *EcoRI* e o fragmento truncado do gene *phoB* foi purificado e ligado ao vetor pKNOCK-Cm previamente digerido com *EcoRI*, originando pGM4.

3.7 Extração de RNA

Bactérias foram crescidas durante a noite em meio LB ou DMEM (Cultilab) e no dia seguinte diluídas para cerca de 5×10^8 bactérias por ml ($DO_{540} = 0,5$) em meio DMEM contendo 2% de soro fetal bovino (SFB). As amostras foram coletadas durante a fase exponencial de crescimento ($DO_{540} = 0,3-0,5$) ou no início da fase estacionária ($DO_{540} = 0,8-1$). Aos transformantes contendo pNP5, foi adicionado 1 mM isopropil-beta-D-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para induzir a atividade do promotor. Quando necessário, foram adicionados aminoácidos na concentração de 40 µg/ml e no caso de serina 200 µg/ml. A extração de RNA foi realizada de acordo com o “método de passo único” descrito em Chomczynski e Sacchi (1987). Quarenta ml da cultura de bactérias foram centrifugados e o *pellet* homogeneizado em 2 ml de uma solução de RNAzol (50% fenol (pH 4), 1,86 M guanidina tiocianato, 12 mM citrato de sódio, 87 mM acetato de sódio (pH 4), 0,37% sarcosil e 42 mM β-mercaptoetanol). Ao homogeneizado foi adicionado 800 µl de clorofórmio e em seguida centrifugado por 15 minutos a 12000 rpm. À fase aquosa contendo o RNA, foi adicionado um volume igual de isopropanol e o precipitado foi centrifugado por dez minutos a 12000 rpm. O precipitado obtido foi lavado com etanol 70% e ressuspenso em formamida. A concentração e a pureza do RNA foi medida pela absorbância da amostra a 260 e 280 nm em espectrofotômetro.

Figura 11. Clonagem de *relA* e *spoT*. O vetor pUC19 foi digerido com *Scal* e um cassete de resistência à espectinomicina (*Sp^R*) proveniente de pJL74 foi inserido dentro do gene de resistência à ampicilina (*Amp^R*) originando pGM21. Os genes *relA* e *spoT* previamente digeridos com *EcoRI* foram ligados a pGM21 originando respectivamente pGM24 e pGM22. Os plasmídios não estão representados em escala.

Figura 12. Construção de fusões transcricionais das regiões promotoras de *bfpA* (pGM14), LEE5 (*cesT-tir-eae*) (pGM17) e *per* (pGM18) com o gene *lacZ*. Os fragmentos de DNA dos respectivos promotores dos genes foram amplificados por PCR utilizando o par de iniciadores *bfpA*-P1/*bfpA*-P2 para *bfp*, *tir*-P1/*tir*-P2 para LEE5 e *per*-P1/*per*-P2 para *per* e foram ligados ao vetor pRK/*lacZ*290. A orientação correta do promotor em relação a *lacZ* foi confirmada pela amplificação da região da fusão com os iniciador P1 de cada um dos promotores e o iniciador *lacZ*1391 e posterior sequenciamento do fragmento. Tc^R: gene de resistência à tetraciclina. Os plasmídios não estão representados em escala.

Figura 13. Esquema representando a construção de pGM29. O plasmídeo pGM29 foi obtido a partir da inserção do cassete de resistência à tetraciclina proveniente de pJL74 em pGM17. Os plasmídios não estão representados em escala.

3.8 Preparação de sondas de DNA

Fragmentos de DNA correspondentes aos genes *bfpA*, *eae* e *rpoD* foram obtidos por amplificação a partir do plasmídeo EAF, do cromossomo de E2348/69 e do plasmídeo *prpoD*, utilizando-se os pares de iniciadores *bfp-A/bfp-B*, *eae-A/eae-B* e *rpoD-1/rpoD-2*, respectivamente. Para a síntese das sondas radioativas, 200 ng dos fragmentos de DNA foram incubados com $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP (Amersham Biosciences), 500 ng de hexâmeros aleatórios (Promega), 10 mM de uma mistura de dATP, dGTP e dTTP (Invitrogen), e o fragmento Klenow da DNA polimerase (Fermentas), por duas horas a 37 °C. A reação foi terminada com 10 mM EDTA, e o produto da reação precipitado e ressuspendido em água.

3.9 Northern-blot

Cerca de 20 µg do RNA extraído de cada amostra foi resolvido em gel desnaturante de agarose 1%, acrescido de 1X MOPS (MOPS 20 mM, NaAc 5 mM, EDTA 1 mM), que é também o tampão de corrida, e 2,2 M formaldeído. Após a eletroforese, o gel foi transferido a uma membrana de náilon (Hybond-N, Amersham Biosciences) por capilaridade, utilizando-se uma solução de 20X SSC (3 M NaCl, 0,3 M citrato de sódio, pH 7,5). Após a transferência, o RNA foi fixado à membrana através de aquecimento a 80 °C por 2 horas. As bandas de rRNA foram visualizadas com luz ultravioleta e suas posições marcadas na membrana. As sondas radioativas foram desnaturadas por dez minutos a 100 °C e hibridizadas com as membranas mergulhadas em solução de hibridização (HS-114F, Molecular Research Cloning) a 42 °C por 15 a 20 horas. As membranas foram expostas a filmes de raios-X, em temperatura ambiente ou a -80 °C com intensificadores, dependendo da intensidade da radiação medida na membrana. O tempo de exposição também variou de acordo com a intensidade de radiação. Os filmes foram revelados e fotografados. A densitometria das bandas correspondente ao RNA dos genes estudados foi feita pelo programa ImageJ (disponível em <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

3.10 Ensaio enzimáticos

3.10.1 Ensaio de fosfatase alcalina (FA)

3.10.1.1 Ensaio quantitativo de FA

Para analisar a expressão de fosfatase alcalina (FA) foi utilizado o substrato p-nitrofenilfosfato (TORRIANI, 1966). As bactérias foram cultivadas durante a noite em meio carente em fosfato (meio A) e rico em fosfato (meio A suplementado com 1 mM KH_2PO_4). A cultura foi centrifugada e ressuspenida em 0,1 M Tris pH 8. Em seguida, a concentração de bactérias foi medida na DO_{540} . O ensaio foi realizado acrescentando-se 100 µl da cultura de bactérias a uma solução de 900 µl de p-nitrofenilfosfato (p-NPP) 1 mg/ml em 1 M Tris pH 8, que foi em seguida incubada a 37 °C. A reação foi interrompida com a adição de 250 µl de 1 M Na_2HPO_4 quando a

solução adquiriu a coloração amarela. Bactérias foram precipitadas por centrifugação a 6000 rpm por 5 minutos e o conteúdo da reação (sobrenadante) foi submetido à leitura de absorbância a 410 nm. A atividade específica da fosfatase alcalina (EU) foi medida pela seguinte equação: $EU = (A_{410} \times FD) / (\text{min} \times DO_{540})$, onde A_{410} é a absorbância da solução a 410 nm; FD é o fator de diluição das bactérias; min é o tempo de reação em minutos; e DO_{540} é a concentração de bactérias medida a 540 nm.

3.10.1.2 Ensaio qualitativo de FA

Volumes iguais de soluções de α -naftilfosfato (2 mg/ml dissolvido em 1 M Tris pH 8) e o-dianisidina tetrazotizada (*fast blue*) (10 mg/ml) foram misturados e aplicados sobre as colônias, conforme descrito por Bracha e Yagil (1969). A expressão de FA é verificada pela reação com o substrato e consequente escurecimento da colônia. Alternativamente foi utilizado 20 μ g/ml XP (5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) como substrato. No caso de XP, o produto da reação forma um precipitado azul no interior da colônia.

3.10.2 Ensaio de β -galactosidase das fusões *lacZ*

Bactérias foram crescidas durante a noite a 37 °C em meio LB contendo 0,4% de glicose. No dia seguinte a cultura foi diluída para uma $DO_{540} = 0,025$ e crescida a 37 °C em meio DMEM contendo 2% SFB e 0,4% glicose para inibir qualquer atividade endógena de β -galactosidase. Amostras foram coletadas a cada hora e o ensaio de β -galactosidase foi realizado de acordo com Miller (1992). A amostra foi ressuspensa em tampão Z (16,1 g/l Na_2HPO_4 , 5,5 g/l NaH_2PO_4 , 0,75 g/l KCl, 0,25 g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ e 2,7 ml/l β -mercaptoetanol) e a membrana das bactérias foi permeabilizada com 50 μ l de clorofórmio e 50 μ l de 0,1% SDS. O ensaio foi iniciado com a adição de 200 μ l de orto-nitrofenil- β -galactosídeo (ONPG) (4 mg/ml) e a reação foi terminada com a adição de 500 μ l de 1 M Na_2CO_3 . O produto da reação foi medido em espectrofotômetro na absorbância de 420 nm e a atividade específica foi calculada de acordo com a seguinte equação: $EU = (A_{420} \times FD \times 1000) / (\text{min} \times DO_{540})$, onde A_{420} é a absorbância da solução a 420 nm; FD é o fator de diluição das bactérias; min é o tempo de reação em minutos; e DO_{540} é a concentração de

bactérias medida a 540 nm. Paralelamente ao ensaio foi realizada uma curva de crescimento das cepas.

3.10.3 Ensaio de atividade da fusão *pstS-cat*

A atividade de cloranfenicol acetil transferase (CAT) da fusão *pstS-cat* foi medida utilizando uma modificação do ensaio bioquímico descrito por Shaw (1975). Bactérias foram crescidas durante a noite a 37 °C e ressuspendidas em meio A sem suplementação de Pi (meio A –Pi), meio A suplementado com 1 mM KH₂PO₄ (meio A +Pi), meio DMEM suplementado com 0, 2 ou 10% SFB, DMEM suplementado com 2% SFB e 1 mM KH₂PO₄ ou DMEM sem SFB. As células foram crescidas até a metade da fase exponencial (DO₅₄₀ = 0,4-0,5), lavadas com 0,1 M Tris pH 8 e lisadas por meio de incubação em tampão de lise (100 mM tampão potássio fosfato, pH 8; 2 mM EDTA; 1% Triton; 5 mg/ml BSA; 1mM DTT; 5 mg lisozima/ml) por 15 minutos a temperatura ambiente. O lisado celular foi centrifugado para remover os restos bacterianos e a solução foi adicionada a uma cubeta contendo 0,4 mg/ml ácido ditio-bis-2-nitrobenzóico (DNTB) e 0,1 mM acetil-coenzima A (acetil-CoA), ambos diluídos em Tris 0,1 M pH 7,8. A reação foi iniciada pela adição de 0,1 mM de cloranfenicol. A atividade específica de CAT foi calculada usando a fórmula: (taxa de aumento de absorção a 412 nm x fator de diluição)/(13,6 x DO₅₄₀ x volume do extrato de células celular). Paralelamente foi realizado um ensaio de fosfatase alcalina (descrito acima) para comparar a expressão de FA com a expressão de *pst*.

3.10.4 Ensaio de acúmulo de glicogênio

Alternativamente, a expressão de (p)ppGpp foi medida via acúmulo de glicogênio. O acúmulo de glicogênio ocorre na fase estacionária e depende de RpoS (HENGGE-ARONIS; FISCHER, 1992), que é positivamente regulado por (p)ppGpp (vide “Introdução”). Cepas foram crescidas durante a noite em LB e 5 µl da cultura foram aplicados sobre de placas ágar LB. As placas foram incubadas durante a noite a 37°C e em seguida a 4 °C por 24 horas. No dia seguinte, os *patches* de bactérias foram cobertos com uma solução de iodo contendo 20 g/l iodeto de potássio, 250 ml/l etanol e 10 g/l cristais de iodo. O nível de acúmulo de glicogênio foi analisado pela coloração das colônias. Quanto mais escuro, maior a quantidade de glicogênio

acumulada na célula.

3.10.5 Ensaio de catalase

Para testar a atividade de catalase de forma qualitativa, 10 µl de peróxido de hidrogênio 3% foram aplicados diretamente sobre a colônia de bactérias, observando-se a produção de efervescência.

3.11 Cultivo de células humanas HEp-2

Células humanas da linhagem HEp-2, provenientes de carcinoma da laringe, foram mantidas em garrafas de poliestireno em meio DMEM contendo 10% SFB, 50 U/ml de penicilina e 50 µg/ml de estreptomicina. A cultura foi mantida a 37 °C com 5% de CO₂ até atingir a confluência máxima. Para a utilização nos ensaios de adesão, o meio foi removido e as células foram lavadas 2 vezes com 3 ml de uma solução de tripsina-EDTA (0,25% (v/v) tripsina, 1 mM EDTA em PBS) (Cultilab). Em seguida, foram adicionados 5 ml de tripsina-EDTA e as células foram incubadas a 37 °C até a monocamada de células se descolar do fundo da garrafa. Em seguida, as células são ressuspensas em meio DMEM e 10% SFB a uma concentração de 10⁵ células por ml (medidos em uma câmara de Neubauer), e transferidas para placas de poliestireno de 24 orifícios, cada um contendo 1 ml da suspensão celular.

3.12 Ensaios de adesão *in vitro* às células epiteliais

3.12.1 Ensaio de adesão qualitativo

O ensaio de adesão foi realizado de acordo com Cravioto *et al.* (1979). As células HEp-2 foram incubadas por 48 horas em placas de poliestireno contendo meio DMEM e 10% SFB. Em cada orifício da placa contendo 1 ml da suspensão de células foi previamente colocada uma lamínula sobre a qual as células aderiram. As células foram lavadas com PBS e em seguida foi adicionado meio DMEM e 2% SFB contendo 1% de D-manose, sem antibióticos. Cerca de 5 x 10⁷ de bactérias previamente crescidas durante a noite em LB sem agitação foram adicionadas a cada orifício da placa. Em seguida, as placas foram incubadas a 37 °C por 3 horas.

A seguir, o meio de cultura das células foi descartado e as células foram lavadas 6 vezes com PBS. Após a lavagem, as células foram fixadas com metanol durante dez minutos e coradas com corante May-Grünwald (diluído 1:5 em tampão Sorensen) por 5 minutos e depois com o corante Giemsa (diluído 1:10 em tampão Sorensen) por 20 minutos. As lamínulas foram lavadas com tampão Sorensen e logo em seguida lavadas com água destilada e montadas sobre lâminas de microscopia óptica. A adesão foi visualizada em microscópio óptico sob aumento de 1000 vezes.

3.12.2 Ensaio de adesão quantitativo

3.12.2.1 *Ensaio quantitativo de adesão por unidades formadoras de colônias (UFC)*

Os procedimentos utilizados para este ensaio são idênticos ao do ensaio de adesão qualitativo, porém após a lavagem com PBS para eliminar as bactérias não aderidas, as células HEp-2 foram lisadas com 1 ml de uma solução de 0,1% de Triton X-100 em PBS por 5 minutos. Em seguida, as bactérias foram diluídas em PBS e semeadas em placas de ágar LB. No dia seguinte o número de colônias viáveis ou unidades formadoras (UFC) foi contado.

3.12.2.2 *Ensaio quantitativo de adesão por atividade endógena de β -galactosidase*

Para a quantificação da adesão foi utilizada uma modificação do método de Minami *et al.* (1987). Bactérias foram cultivadas durante a noite em meio LB sem agitação na presença de 1 mM IPTG para induzir a expressão do *lacZ* endógeno. O procedimento de adesão foi realizado como descrito acima, porém foi adicionado 1 mM IPTG antes do ensaio. Após as 3 horas de incubação, as células foram lavadas e foram adicionados 200 μ l de tampão de lise (0,1M Tris-HCl, pH 8; 2 mM EDTA; 1% Triton; 1 mM DTT; 5 mg/ml lisozima). Então, as células foram incubadas durante 20 minutos em temperatura ambiente. O ensaio de β -galactosidase foi realizado conforme descrito acima.

3.13 Cultivo de bactérias e extração de (p)ppGpp

Para a extração de (p)ppGpp, bactérias foram cultivadas durante a noite a

37 °C em meio T-salts suplementado com 0.2% de glicose e 1 mM de Pi. No dia seguinte as culturas foram ressuspensas no mesmo meio e cultivadas até atingir a fase exponencial de crescimento ($DO_{540} \sim 0.4$).

Para extrair (p)ppGpp de bactérias carentes de aminoácidos, as culturas de bactérias foram diluídas em T-salts suplementado com 0,2% de glicose, 0,25 mM Pi e 100 μ Ci 32 P e cultivadas por uma hora. Em seguida, foi adicionado hidroxamato de serina (HS) a uma concentração final de 1 mg/ml. HS é um inibidor competitivo de serina, o que induz a carência deste aminoácido. Os nucleotídeos fosforilados foram extraídos misturando a cultura de bactérias com ½ volume de 11 M de ácido fórmico gelado.

3.14 Detecção de (p)ppGpp em placas de TLC

O extrato ácido marcado radioativamente foi centrifugado a 4 °C por 5 minutos e 5 μ l foram aplicados à placas de TLC de troca iônica [cromatografia em placa delgada com PEI-celulose (Macherey-Nagel)]. O extrato foi separado em uma câmara de cromatografia contendo 1,5 M KH_2PO_4 (pH 3,4) como solvente. Quando o solvente atingiu a extremidade superior da placa, esta foi retirada, seca e analisada em um Phosphor-imager (Molecular Dynamics). A quantidade de ppGpp foi estimada através da medição da intensidade dos pontos correspondentes a (p)ppGpp dividido pela intensidade dos pontos de ppGpp + GTP.

3.15 Immunoblotting

Bactérias crescidas durante a noite em LB ou DMEM foram diluídas em meio DMEM contendo 2% SFB para uma DO_{540} de 0,025 e incubadas a 37 °C sem agitação. Após 4 ou 9 horas as culturas foram centrifugadas e ressuspensas em 1 ml de PBS. A DO_{540} foi medida e 2×10^9 bactérias foram ressuspensas em 100 μ l de tampão de lise (0,1 M Tris-HCl, pH 6,8; 2% SDS; 5% β -mercaptoetanol; 10% glicerol; 0,002% bromofenol). Em seguida, as amostras foram fervidas em banho-maria por 3 minutos. Dez microlitros de cada amostra foram separados em gel de poli(acrilamida 12% (SDS-PAGE) e transferidos por capilaridade para membranas de nitrocelulose (Hybond-ECL; Amersham Biosciences). A membrana foi bloqueada

durante uma hora com 5% de leite desnatado diluído em PBS contendo 0,05% Tween-20 (PBS-T). Em seguida, a membrana foi incubada com anticorpos primários contra BFP, intimina, RpoA (subunidade α da RNA polimerase) ou RpoS durante 1 hora. O anticorpo monoclonal anti-intimina foi diluído 500 vezes, o anticorpo policlonal anti-BFP foi diluído 2000 vezes. Ambos foram gentilmente cedidos pela Dra. Roxanne M. Piazza (Instituto Butantan). Os anticorpos monoclonais anti-RpoS e anti-RpoA (Neoclone) foram diluídos 2000 vezes. Para a detecção foram utilizadas imunoglobulinas G anti-camundongo ou anti-coelho conjugadas com peroxidase como anticorpos secundários (Promega). A detecção foi realizada com o sistema Supersignal West Pico Chemiluminescent (Pierce), de acordo com o fabricante. Filmes de raio-X foram utilizados para a detecção das bandas correspondentes às proteínas BfpA, intimina e RpoS. A normalização das amostras de proteínas foi realizada com anticorpo anti-RpoA.

4 RESULTADOS

4.1 O papel do regulon PHO na virulência de EPEC

4.1.1 Obtenção de mutantes em genes do regulon PHO

Duas cepas de EPEC típica foram utilizadas para avaliar o efeito de genes do regulon PHO sobre a adesão. Uma delas foi E2348/69 (O127:H6), considerada a linhagem protótipo, isolada de um surto de diarreia no Reino Unido (LEVINE *et al.*, 1985). A segunda cepa foi LRT9 (O111:abH2), isolada no Chile e estocada no laboratório do Dr. Luiz R. Trabulsi.

Ao contrário de E2348/69, a cepa LRT9 mostrou-se bem mais susceptível à transdução com o fago P1 e demais manipulações genéticas, tal como transformação de plasmídios, e portanto, foi utilizada como a cepa de EPEC principal nesta parte do trabalho.

A deleção do operon *pst* ($\Delta pst::Km^R$), as mutações no gene *pstS* (*pstS1::Tn5* e *pstS::Km^R*), *phoR* (*phoR69*) e *phoB* (*phoB519::Tn5* e *phoB23 proC::Tn10*) foram obtidas por transdução com o fago P1. Para confirmar o fenótipo dos transductantes, todas as cepas foram submetidas a ensaios de fosfatase alcalina (FA). Bactérias foram crescidas em meio A para induzir a carência de Pi e meio A enriquecido com 1 mM KH_2PO_4 . Conforme o esperado, mutações em *pst* e *phoR* causaram a síntese constitutiva de genes do regulon PHO, que pôde ser observada pela alta atividade de FA no meio suplementado com Pi (Tabela 4). A atividade de FA foi maior na cepa GMF195 (LRT9 Δpst) do que na cepa GMF257 (LRT9 *phoR*), confirmando os resultados obtidos por Kreuzer *et al.* (1975), que mostraram que a constitutividade de mutantes *pst* é mais forte do que a de mutantes *phoR*. Mutações no gene *phoB*, que codifica para o ativador transcricional do regulon PHO aboliram a expressão de FA sob qualquer condição, confirmando que a presença de PhoB é essencial para a ativação de PHO em EPEC. A introdução de uma segunda mutação na cepa GMF195, que resultou no duplo mutante $\Delta pst phoB$ (GMF247), extinguiu a expressão constitutiva de PHO causada inicialmente pela deleção de *pst*. Portanto, em relação a regulação de PHO, *phoB* é epistático sobre *pst*. Estes fenótipos são

similares aos obtidos com cepas de *E. coli* K-12, nas quais o regulon PHO foi estudado detalhadamente.

A inserção de plasmídios contendo genes selvagens do regulon PHO complementou as mutações correspondentes (Tabela 4). pGM2 (*ppstSCAB-phoU*⁺) complementou as mutações Δpst e *pstS1::Tn5*, restaurando a repressão dos genes do regulon PHO em abundância de Pi. A introdução de pBS16 (*ppstS*⁺) reduziu o nível de FA do mutante *pstS::Km*^R (GMF275) aos níveis da cepa selvagem. A mutação *pstS1::Tn5* (GMF211) foi complementada apenas parcialmente por pBS16, uma vez que a atividade de FA do transformante não foi reduzida ao nível de cepa selvagem, o que sugere que a mutação *pstS1::Tn5* tem efeito polar sobre os demais genes do operon (Tabela 4).

A indução de FA sob carência de Pi no mutante *phoB* (JC1) foi restaurada com a presença do plasmídio pBS1 (*pphoBR*⁺). pBS1 também restaurou a repressão da FA no mutante *phoR* constitutivo (GMF257) em condições de abundância de Pi (Tabela 4).

Em suma, esses resultados confirmam os fenótipos dos mutantes, bem como o papel de *pst* como repressor do regulon PHO em EPEC.

4.1.2 Efeito de mutações em genes de PHO sobre a adesão *in vitro* de LRT9

Ensaio de adesão *in vitro* à células epiteliais são amplamente utilizados como parâmetro de virulência em EPEC. Em ensaios preliminares os níveis de adesão foram estimados através de observação das lâminas em microscópio óptico, resultando em estimativas qualitativas dos níveis de adesão.

Para quantificar os níveis de adesão, uma metodologia baseada na medição da atividade endógena de β -galactosidase das cepas foi utilizada (vide “Métodos”).

Tabela 4 - Ensaio de fosfatase alcalina (FA) de LRT9.

Linhagem	Fenótipo	Plasmídio	+ Pi^a	- Pi^a
LRT9	selvagem	-	0,01 ± 0,01	1,76 ± 0,47
GMF211	<i>pstS1::Tn5</i>	-	1,213 ± 0,234	-
GMF248	<i>pstS1::Tn5</i>	pBS16 (<i>ppstS</i> ⁺)	0,232 ± 0,042	-
GMF275	<i>pstS::Km^R</i>	-	0,493 ± 0,072	-
GMF276	<i>pstS::Km^R</i>	pBS16 (<i>ppstS</i> ⁺)	0	-
GMF195	Δpst	-	2,97 ± 0,73	3,09 ± 0,39
GMF201	Δpst	pGM2 (<i>ppst</i> ⁺)	0,09 ± 0,11	1,57 ± 0,32
JC1	<i>phoB519</i>	-	0	0
GMF210	<i>phoB519</i>	pBS1 (<i>pphoBR</i> ⁺)	0,04 ± 0,04	1,28 ± 0,35
GMF257	<i>phoR69</i>	-	1,93 ± 0,31	1,23 ± 0,30
GMF264	<i>phoR69</i>	pBS1 (<i>pphoBR</i> ⁺)	0,04 ± 0,04	1,63 ± 0,15
GMF247	$\Delta pst phoB$	-	0 ± 0,02	0,07 ± 0,11

^a - Valores representam a média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

- Pi - meio A sem adição de fosfato

+ Pi - meio A enriquecido com fosfato (1 mM KH₂PO₄)

A cepa LRT9 apresentou um padrão típico de adesão de EPEC, com a presença de microcolônias aderidas de maneira localizada sobre a superfície de células HEp-2. O mutante $\Delta pst::Km^R$ (GMF195) apresentou focos de adesão menos densos, com microcolônias mais espalhadas, ou seja, um padrão de adesão mais difuso. A complementação *in trans* do operon *pst* com o plasmídio pGM2 restaurou o fenótipo selvagem, pois as bactérias voltaram a apresentar vários focos de adesão localizada como na cepa selvagem (Fig. 14).

Figura 14. Ensaio de adesão dos mutantes do regulon PHO de LRT9. Bactérias foram adicionadas a uma monocamada de células HEp-2 e incubadas por 3 horas. Após a incubação as células foram lavadas e fixadas A. LRT9 selvagem; B. GMF195 (LRT9 Δ pst); C. JC1 (LRT9 *phoB519*); D. GMF195 transformada com pGM2 (*ppst**); E. GMF247 (LRT9 Δ pst *phoB23*); F. GMF257 (LRT9 *phoR69*). Setas indicam focos de bactérias aderidas. Coloração May Grünwald-Giemsa. Aumento 1000X.

Medições quantitativas por meio da atividade endógena de β -galactosidase mostraram que o mutante GMF195 adere duas vezes e meia menos que a cepa selvagem. A complementação *in trans* da mutação Δpst com pGM2 (*ppst*⁺) restaurou o nível normal de adesão da cepa. O vetor pGB2 foi utilizado como controle negativo e de acordo com o esperado não alterou o nível de adesão do mutante *pst*. O mutante *pstS*::Tn5 (GMF211) também apresentou menor nível de adesão, que não foi restaurado com pBS16 (*ppstS*⁺) (Fig. 15). Esse resultado já era esperado, pois pBS16 também não complementou totalmente a atividade constitutiva de FA de GMF211 (Tabela 4), confirmando o efeito polar dessa mutação sobre os demais genes de *pst*. A mutação no gene *phoB* resultou em um aumento de 20% no nível de adesão, embora não tenha sido estatisticamente significativa. Este resultado indica que PhoB não é necessário para manter níveis normais de aderência. Inesperadamente a introdução de pBS1, que carrega o operon *phoBR* selvagem, neste mutante reduziu quase pela metade o grau de adesão (Fig. 16). Esse resultado poderia ser explicado pelo fato de pBS1 ser um plasmídeo de múltiplas cópias, mas conforme descrito abaixo, pBS1 não causou o mesmo efeito quando transformado no mutante *phoR*.

Mutações nos genes do operon *pst* causam a expressão constitutiva do regulon PHO. Portanto, investigamos a possibilidade do efeito da mutação em *pst* ser devido a transcrição constitutiva de um ou mais genes do regulon PHO. Para testar essa hipótese, foram construídos o mutante *phoR* (GMF257) e o duplo mutante Δpst *phoB* (GMF247). Se a expressão constitutiva de PHO causada pela deleção de *pst* for a responsável pela redução no nível de adesão, uma segunda mutação no gene *phoB* aliviaria o efeito deletério da constitutividade sobre a adesão. Vale lembrar que a constitutividade de um mutante *pst* é abolida quando *phoB* é mutado (Tabela 4). Da mesma forma, mutantes *phoR* que também são constitutivos para a expressão de PHO deveriam ter a adesão prejudicada, de acordo com essa hipótese.

O mutante Δpst *phoB* (GMF247) mostrou um nível de adesão similar ao do mutante Δpst (Fig. 14 e 16), o que sugere que embora a mutação *phoB* tenha abolido a expressão constitutiva de PHO, o duplo mutante (GMF247) continuou a aderir menos que o mutante *phoB* (JC1) e menos que a linhagem selvagem. Isto

indica que *pst* é epistático para *phoB* em relação a seu efeito sobre a adesão de EPEC. De modo interessante, a situação oposta ocorre na regulação de PHO, em que *phoB* é epistático sobre *pst* (vide Tabela 4). A mutação *phoR* não alterou significativamente o nível de adesão de LRT9 (Fig. 14 e 16), indicando que *phoR* e a constitutividade do regulon PHO causada por esta mutação, não têm efeito sobre a adesão de EPEC. Os fenótipos de adesão dos mutantes Δpst *phoB* e *phoR* conjuntamente sugerem que o efeito da mutação Δpst não é devido a constitutividade do regulon PHO.

Figura 15. Ensaio quantitativo de adesão por β -galactosidase dos mutantes *pst* de EPEC LRT9. O valor de 100% foi atribuído a linhagem selvagem LRT9. Barras correspondem a média $\pm$ desvio padrão de ao menos 3 ensaios independentes. * valores significativamente diferentes em comparação a linhagem selvagem de acordo com o teste *t* ($p < 0,05$).

Figura 16. Ensaio quantitativo de adesão por β -galactosidase dos mutantes *phoB* e *phoR* de EPEC LRT9. O valor de 100% foi atribuído a linhagem selvagem LRT9. Barras correspondem a média $\pm$ desvio padrão de ao menos 3 ensaios independentes. * valores significativamente diferentes em comparação a linhagem selvagem de acordo com o teste *t* ($p < 0,05$).

Poderia ser argumentado que o efeito negativo de *pst* foi devido a um artefato causado pela diminuição no crescimento bacteriano ou alguma inibição sobre a expressão de β -galactosidase. Para testar essas hipóteses foram realizados ensaios cinéticos de expressão de β -galactosidase endógena e curvas de crescimento das cepas LRT9, GMF195 ($\Delta pst::Km^R$) e GMF195 transformada com pGM2. Bactérias foram crescidas durante a noite em meio LB e no dia seguinte a cultura foi diluída em DMEM suplementado com 2% SFB e 1 mM IPTG a uma concentração de 5×10^7 bactérias por ml, e crescidas por 9 horas sem agitação a 37 °C. Amostras foram colhidas a cada hora e avaliadas em relação ao nível de expressão de β -galactosidase e em relação a turbidez das culturas (Fig.17). Todas as bactérias cresceram exponencialmente com taxas de crescimento similares por 5 a 6 horas (DO_{540} final $\simeq 0,7$), quando atingiram a fase estacionária (Fig. 17B). A presença de *pst* poderia ser vantajosa nessas condições em comparação ao mutante, pois linhagens *pst*⁺ poderiam captar Pi com mais eficiência. Porém, o meio DMEM é rico em Pi (0,9 mM), permitindo um bom rendimento de bactérias, mesmo na ausência do sistema de transporte de alta afinidade Pst. Nessas condições o transporte é majoritariamente realizado pelo transportador Pit. A entrada na fase estacionária após 5 horas de crescimento provavelmente foi causada pelo esgotamento de O₂ e

pela presença de IPTG, que limitaram o crescimento da cultura.

A atividade de β -galactosidade de todas as três linhagens atingiu um platô após 3 horas (Fig. 17A). Neste momento a linhagem contendo pGM2 apresentou atividade ligeiramente mais alta que diminuiu levemente daquele ponto em diante. A atividade de β -galactosidade manteve-se bem semelhante entre as cepas até o final do ensaio. De maneira geral, a taxa de crescimento, bem como o nível de atividade de β -galactosidade de todas as cepas foi bastante similar e, portanto, concluímos que o efeito da mutação Δpst sobre a adesão não é devido à redução do crescimento, nem à uma possível influência sobre a expressão de β -galactosidade.

4.1.3 O operon *pst* regula positivamente a expressão de *bfp*, *eae* e *per*

A adesão de EPEC depende da expressão de pelo menos duas adesinas: BFP e intimina. O efeito da deleção de *pst* sobre a adesão de LRT9 poderia estar associado a inibição da expressão desses fatores de adesão. Para testar essa hipótese, análises de *northern-blot* e *western-blot* foram realizadas para medir os níveis de mRNA dos genes *bfpA* e *eae* e das proteínas BfpA e intimina. Para extrair o mRNA das amostras, bactérias foram crescidas em meio DMEM contendo 2% SFB e coletadas após 3 horas de incubação a 37 °C, quando atingiram a metade da fase exponencial. O RNA total foi hibridizado com uma sonda de DNA correspondente ao primeiro gene do operon *bfp*, *bfpA*. A sonda *bfpA* hibridizou com uma banda de cerca de 0,6 kb correspondente ao gene *bfpA* somente (Fig. 18A). Embora o operon *bfp* seja composto de ao menos 14 genes, bandas contendo os genes distais do operon não puderam ser observadas. Somente quando os filmes de raio-X foram expostos por um longo período outras bandas de maior tamanho puderam ser vistas (dados não apresentados). A presença de uma estrutura em forma de alça [$\Delta G = -16,9$ kcal/mol (-70 kJ/mol)] na região intergênica entre *bfpA* e *bfpG* pode estar agindo como uma estrutura estabilizadora do transcrito de *bfpA* ou como um terminador de transcrição. Isto explicaria porque o transcrito de *bfpA* é bem mais abundante que os demais transcritos do operon. As membranas foram re-hibridizadas com uma sonda de DNA correspondente ao gene *rpoD*, de expressão constitutiva, para normalizar a quantidade de RNA total presente em cada amostra.

Figura 17. Atividade endógena de β -galactosidase e curvas de crescimento de LRT9, Δ pst e Δ pst transformado com pGM2. Bactérias foram crescidas em meio DMEM enriquecido com 2% SFB e 1 mM IPTG por 9 horas. Amostras foram colhidas a cada hora e ensaiadas para a atividade de β -galactosidase (A) e crescimento (B). ♦. LRT9; ■. GMF195 (LRT9 Δ pst); ▲. GMF195 transformada com pGM2 (GMF201).

A partir da análise densitométrica das bandas, foi verificado em média uma diminuição de duas vezes nos níveis de mRNA de *bfpA* no mutante GMF195 (Δpst), quando comparado com a linhagem selvagem. O mesmo foi observado para o duplo mutante GMF247 ($\Delta pst phoB$). Quando o mutante foi transformado com o plasmídio de poucas cópias pGM2 (*ppst*⁺) o nível de mRNA de *bfpA* foi restaurado e até mesmo ligeiramente aumentado, talvez devido a presença de várias cópias de *pst*. O vetor pGB2 foi utilizado como controle negativo. Conforme o esperado, a inserção de pGB2 não complementou a deleção de *pst*. Por outro lado, a mutação *pstS*::Km^R não polar (GMF275) não afetou a transcrição de *bfpA*, indicando que outros genes à jusante de *pstS* é que estão envolvidos no mecanismo de expressão de *bfpA*. Da mesma forma, o mutante *phoR* (GMF257) não apresentou diferenças significativas no nível de mRNA de *bfpA* em relação a cepa selvagem (Fig. 18A).

Para verificar se o efeito sobre a expressão do mRNA de *bfpA* é também reproduzido ao nível de proteínas, a expressão de BfpA foi avaliada por *western-blot* com anticorpos anti-BFP (Fig. 18B). Resultados similares aos observados nos ensaios de *northern-blot* foram obtidos em relação à proteína BfpA. Houve um decréscimo de cerca de 1,7 vez tanto no mutante Δpst como no mutante $\Delta pst phoB$ em comparação a linhagem selvagem. A complementação *in trans* da mutação Δpst com pGM2 restaurou o fenótipo selvagem (Fig. 18B). Esses resultados mostram claramente que *pst* exerce um efeito positivo sobre a expressão da fímbria BFP. A ausência de efeito das mutações *phoR* e *pstS*, bem como o fato de que o duplo mutante $\Delta pst phoB$ não restaurou os níveis de expressão de *bfpA*, mostram que a expressão constitutiva dos genes de PHO não tem efeito sobre a expressão de BFP.

A cinética da atividade do promotor de *bfpA* foi medida por meio de fusões transcricionais *bfpA-lacZ* (plasmídio pGM14). Para induzir a atividade do promotor, bactérias foram diluídas em meio DMEM contendo 2% SFB. A expressão de β -galactosidase endógena foi inibida pela suplementação do meio com 0,4% de glicose.

Figura 18. Efeito de *pst* sobre a expressão de *bfpA*. A. Análises de *northern-blot* do mRNA de *bfpA*. RNA total de MG1655, LRT9, GMF195 (LRT9 Δpst), GMF201 (pGM2 transformado em GMF195), GMF269 (pGB2 transformado em GMF195), GMF247 (LRT9 Δpst *phoB*23), GMF275 (*pstS*::Km^R) e GMF257 (LRT9 *phoR*69) foi extraído de culturas crescidas até a metade da fase exponencial em DMEM e hibridizado com sondas de *bfpA* e *rpoD* marcadas radioativamente. Análises densitométricas das bandas normalizadas com o mRNA de *rpoD* são mostradas nos gráficos. B. *western-blot* de BFP. Células foram crescidas como descrito acima e os extratos de proteínas totais foram ensaiados para BFP utilizando um soro policlonal anti-BFP. As bandas correspondem à proteína BfpA de 19 kDa. As barras representam análises densitométricas das bandas. Cada barra corresponde a médias de três experimentos independentes $\pm$ desvio padrão. As figuras representam *blots* de experimentos típicos. *, significativamente diferente da linhagem parental LRT9 pelo teste *t* ($p < 0,05$).

O transformante JPN15 (E2348/69 curada do plasmídio EAF) apresentou atividade de β -galactosidase baixa, apesar de carregar a fusão *bfpA-lacZ*, pois carece do plasmídio EAF, fundamental para a indução de *bfpA*, confirmando a importância de EAF para a expressão de *bfp*. A cepa LRT9 contendo o vetor pRK/*lacZ*290 (sem a fusão) apresentou atividade de β -galactosidase praticamente nula. As demais linhagens apresentaram uma atividade crescente de β -galactosidase que atingiu seu pico máximo após 5 horas de cultivo, correspondendo à metade da fase exponencial de crescimento ($OD_{540} = 0,6$) (Fig. 19A). À medida que as bactérias se aproximavam da fase estacionária a atividade começou a diminuir, confirmando os resultados de Puente *et al.* (1996).

Tanto Δpst como *phoB*⁻ apresentaram uma atividade de β -galactosidase ligeiramente menor quando comparados à cepa selvagem. A linhagem selvagem apresentou uma atividade de 6675 unidades Miller, enquanto os mutantes Δpst e *phoB* apresentaram atividade de 4948 e 5425, respectivamente, no pico de 5 horas de ensaio. Porém, o mutante Δpst contendo o plasmídio pGM2 (*ppstSCAB-phoU*⁺) apresentou atividade muito superior às demais cepas, superando em mais de 6 vezes a atividade apresentada pela cepa selvagem (Fig. 19A). Esse resultado indica um forte efeito positivo de *pst* sobre a atividade do promotor de *bfpA*, e está de acordo com os resultados dos ensaios de adesão e *northern-blot*, nos quais a presença de pGM2 também resultou em uma maior expressão de *bfpA* e aumento de adesão, mesmo não sendo tão espetacular como o apresentado neste ensaio.

O efeito negativo de Δpst observado aqui foi menor do que nos ensaios de *northern-blot*, possivelmente devido a diferenças na estabilidade do transcrito de *bfpA* medido diretamente (como nos ensaios de *northern-blot*) ou em fusão com *lacZ*.

As curvas de crescimento das diferentes culturas mostraram que todas as cepas cresceram de modo similar, exceto o controle negativo JPN15 que cresceu mais lentamente (Fig. 19B). Isso é provavelmente devido ao fato de JPN15 ser derivada de E2348/69, ao contrário das demais cepas que são derivadas de LRT9.

Esses resultados indicam que o operon *pst* tem efeito positivo sobre a expressão de *bfpA*.

Figura 19. Efeito de *pst* sobre a expressão de *bfp-lacZ*. O plasmídeo pGM14 (*bfp-lacZ*) foi inserido nas cepas JPN15 (♦), LRT9 (▲), GMF195 (LRT9 Δ pst) (*), GMF201 (pGM2 transformado em GMF195) (■), JC1 (LRT9 *phoB*::Tn5) (●) e LRT9 transformada com pRKlacZ290 (-). Células foram crescidas em meio DMEM por 9 horas e amostras foram colhidas a cada hora. A. ensaio de β -galactosidase da fusão *bfp-lacZ*. B. Curva de crescimento. Os ensaios foram repetidos três vezes e um experimento típico é mostrado na figura.

Resultados similares foram encontrados em relação à expressão de *eae*, que codifica para intimina. A hibridização do RNA com a sonda *eae* detectou a presença de 3 bandas. A principal possui 3,5 kb, como previamente descrita por Gómez-Duarte e Kaper (1995). Esta banda deve corresponder ao transcrito *cesT-eae*. Uma banda menor de cerca de 2,8 kb foi detectada e provavelmente corresponde ao transcrito de *eae* sozinho. A banda maior de cerca 5,2 kb corresponde ao operon inteiro (*tir-cesT-eae*) (Fig. 20A). Esses resultados indicam que o transcrito deste operon, conhecido também como LEE5, sofre processamento gerando mRNAs de

tamanho diferentes. As membranas foram re-hibridizadas com a sonda *rpoD* como descrito acima e a análise densitométrica da intensidade das bandas mostrou que houve uma diminuição de cerca de 2,5 vezes no nível de mRNA de *eae* no mutante Δpst . Efeito semelhante foi observado no mutante *pstS*::Tn5 polar. A complementação com pGM2 restaurou os níveis originais do mRNA de *eae* (Fig. 20A). De forma semelhante os níveis de intimina medidos por *western-blot* também foram afetados pela deleção de *pst*. O mutante Δpst mostrou uma diminuição na expressão de intimina de cerca de uma vez e meia. A inserção de pGM2 restaurou o fenótipo selvagem no mutante GMF195 (Fig. 20B).

Figura 20. Efeito de *pst* sobre a expressão de *eae*. A. Análises de *northern-blot* do mRNA de *eae*. O RNA foi extraído de culturas de LRT9 selvagem, GMF195 (LRT9 Δpst), GMF201 (pGM2 transformado em LRT9 Δpst), GMF211 (*pstS*::Tn5) crescidas até a metade da fase exponencial. Os transcritos de LEE5 (*tir-cesT-eae*) geraram bandas de 2,8, 3,5 e 5,2 kb. Análises densitométricas das bandas normalizadas com o mRNA de *rpoD* são mostradas nos gráficos B. *Western-blot* de intimina das cepas LRT9, GMF195 (LRT9 Δpst) GMF201 (pGM2 transformado em LRT9 Δpst) e GMF247 (Δpst *phoB*). Células foram crescidas como descrito acima e os extratos de proteína total foram ensaiados para intimina utilizando soro monoclonal anti-intimina. As barras correspondem a análises densitométricas das bandas de três experimentos independentes. Cada barra corresponde a médias $\pm$ desvio padrão. As figuras representam *blots* de experimentos típicos. *, significativamente diferente em relação a linhagem parental LRT9 pelo teste *t* ($p < 0,05$).

Embora os níveis de mRNA de *eae* e de intimina tenham sido menores no mutante Δpst quando comparados a linhagem selvagem, a atividade da região promotora do operon *tir-cesT-eae* (LEE5) medida pelo nível de β -galactosidase foi similar no mutante Δpst e na linhagem selvagem. Por outro lado, a presença do plasmídeo pGM2 no mutante Δpst elevou o nível de expressão de *eae* em cerca de

três vezes em relação à cepa selvagem (Fig. 21A). Esse aumento elevado também foi observado na fusão *bfp-lacZ* (descrito acima). Uma explicação possível para esta aparente contradição é que a mutação *pst* pode ter afetado a estabilidade do mRNA e isto seria mais difícil de ser detectado com fusões transcricionais. Por outro lado, a transformação com pGM2 em Δpst aumentou o nível de atividade da fusão, confirmando o efeito positivo de *pst* sobre a expressão de *bfp* e *eae* (Fig. 19A e 21A). O crescimento das linhagens foi similar (Fig. 21B).

Figura 21. Efeito de *pst* sobre a expressão de LEE5-*lacZ*. O plasmídio pGM18 (LEE5-*lacZ*) foi transformado nas cepas JPN15 (♦), LRT9 (▲), GMF195 (LRT9 Δpst) (·) e GMF201 (GMF195 contendo pGM2) (■). Células foram crescidas em meio DMEM por 9 horas e amostras foram colhidas a cada hora. A. ensaio de β -galactosidase da fusão LEE5-*lacZ*. B. Curva de crescimento. Os ensaios foram repetidos três vezes e um experimento típico é mostrado na figura.

O operon *per* codifica para proteínas envolvidas na regulação global da virulência em EPEC. PerA se liga à região promotora de *bfpA* promovendo a transcrição do operon *bfp*. Junto com PerC, PerA ativa a transcrição de LEE1, que contém *ler*, que codifica para o ativador transcricional dos operons de LEE, incluindo *eae* (MELLIES *et al.*, 1999; TOBE *et al.*, 1996). O operon *perABC* está localizado no plasmídio EAF. A tentativa de medir os níveis de mRNA de *perA* via hibridização *northern-blot*, que é uma técnica moderadamente sensível, não foi bem sucedida, sugerindo que este gene é pouco expresso ou que seu mRNA é muito instável. Para contornar esse problema, foi construída uma fusão transcricional entre o promotor de *per* e *lacZ* (pGM17) e transformada em LRT9, GMF195 (LRT9 Δpst), GMF201 [(LRT9 Δpst (pGM2))] e JPN15.

Devido a GMF247 (Δpst *phoB*) ser resistente a tetraciclina, foi inserido um cassete de resistência à espectinomicina em pGM17, originando o plasmídio pGM29. Este plasmídio, que se comportou de maneira similar a pGM17, foi transformado em GMF247. Após 6 horas de ensaio, a atividade de β -galactosidase alcançou seu nível máximo. Neste momento, a expressão de *per* na linhagem selvagem é quase duas vezes maior que no mutante Δpst e cerca de 2,5 vezes maior que o duplo mutante Δpst *phoB* (Fig. 22A). Isso mostra novamente que o efeito negativo da mutação *pst* não pôde ser aliviado pela extinção da constitutividade de PHO. Já o transformante Δpst contendo pGM2 produziu três vezes mais β -galactosidase que o mutante Δpst e 70% mais que a cepa selvagem (Fig. 22A). A cepa JPN15 foi utilizada como controle negativo para ambos os ensaios. A Figura 22B mostra que as cepas apresentaram crescimento similar principalmente nas fases iniciais de crescimento, atingindo a fase estacionária após 9 horas de ensaio. Da mesma forma como nos testes com as outras fusões, JPN15 apresentou uma taxa de crescimento ligeiramente diferente da de LRT9.

Esses resultados mostram que o operon *pst* tem um efeito positivo sobre a expressão de *per*. Como *perA* é um regulador positivo de *bfp*, *pst* provavelmente afeta a expressão de *bfp* via *perA*. De modo análogo um aumento em *perC* afetaria positivamente a expressão de *ler*, e por consequência a transcrição de *eae*. Portanto, o efeito positivo de *pst* sobre a expressão de *eae* é provavelmente devido ao aumento da expressão de *perC*.

Figura 22. Efeito de *pst* sobre a expressão de *per-lacZ*. O plasmídio pGM17 (*per-lacZ*) foi transformado nas cepas JPN15 (◆), LRT9 (▲), GMF195 (LRT9 Δpst) (*) e GMF201 (pGM2 transformado em GMF195) (■). Como GMF247 ($\Delta pst phoB23$) é resistente a tetraciclina, esta foi transformada com pGM29 (○). Células foram crescidas em meio DMEM por 9 horas e amostras foram colhidas a cada hora. A. ensaio de β -galactosidase da fusão *per-lacZ*. B. Curva de crescimento. Os ensaios foram repetidos três vezes e um experimento típico é mostrado na figura.

4.1.4 O operon *pst* é parcialmente induzido em meio DMEM

A indução do operon *pst*, bem como os demais genes do regulon PHO, ocorre devido a limitação de Pi no meio externo. Em um meio rico em Pi, a bactéria expressa somente níveis basais desses genes (WANNER, 1996). Por outro lado, a

indução dos genes envolvidos na virulência de EPEC ocorre na presença de meio DMEM, conforme relatado acima. DMEM contém cerca de 0,9 mM de Pi, ou seja, é um meio com uma concentração de Pi suficientemente alta para reprimir a expressão dos genes do regulon PHO. Portanto, como o operon *pst*, cujos níveis de expressão são apenas basais nas condições do ensaio de adesão (abundância de Pi) consegue regular a transcrição de outros genes? Para tentar elucidar esta questão, testamos os níveis de expressão de *pst* em meio DMEM. Para avaliar a atividade do promotor do operon *pst* localizado acima de *pstS*, utilizamos uma fusão transcricional *pstS-cat* presente no plasmídio pBS11. O plasmídio foi transformado na linhagem selvagem LRT9 e a atividade do promotor de *pst* foi medida em ensaios de CAT (cloranfenicol acetil transferase). Bactérias foram crescidas em meio DMEM suplementado ou não com Pi e SFB, LB, meio A -Pi e meio A +Pi até atingir a metade da fase exponencial, quando as amostras foram colhidas e testadas em relação a atividade de CAT e FA. Em meio A carente de Pi (-Pi) houve uma indução de cerca de 11 vezes em relação a células crescidas em LB ou meio A +Pi (meios ricos em Pi), mostrando claramente a indução de *pst* sob carência de Pi (Tabela 5).

Por outro lado, em meio DMEM com 2% SFB (a mesma concentração utilizada nos ensaios de adesão), a expressão de *pst* foi duas vezes maior quando comparada a dos meios LB e meio A +Pi, e apenas 5 vezes menor que a atividade de CAT em carência de Pi. A adição de 1 mM Pi ao meio DMEM não alterou significativamente a expressão de *pst*, indicando que a concentração original de Pi no meio DMEM já é suficientemente alta para reprimir a indução de *pst*. Da mesma forma, a adição de 10% SFB também não afetou significativamente a expressão de *pst*, sugerindo que nenhum fator presente no soro fetal bovino é responsável pelo aumento da expressão de *pst* em meio DMEM (Tabela 5).

Esses resultados indicam que DMEM possui algum fator que causa a elevação na expressão de *pst* e esse efeito parece ser específico, pois quando comparamos o nível de expressão de FA nas mesmas condições não observamos um aumento de FA basal em DMEM. O aumento da expressão de *pst* deve estar contribuindo para o efeito regulador de *pst* sobre os genes envolvidos na virulência de EPEC.

Tabela 5 - Ensaio de atividade de FA (fosfatase alcalina) e de CAT (cloranfenicol acetil transferase) da fusão *pstS-cat*.

Meio de cultura	Atividade CAT ^a	Atividade FA ^a
LB	2,32 ± 0,88	0,01 ± 0,01
Meio A +Pi	1,98 ± 0,5	0,02 ± 0,01
Meio A -Pi	22,1 ± 9,05*	2,29 ± 0,71
DMEM	8,06 ± 3,46*	0,001 ± 0,001
DMEM + 2% SFB	4,3 ± 0,3*	0,01 ± 0,01
DMEM + 2% SFB + Pi	5,58 ± 2,08*	0,001 ± 0,001
DMEM + 10% SFB	4,38 ± 1,29*	0,01 ± 0,001

^a - Valores representam a média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

* - Valores que são significativamente diferentes em relação ao meio A +Pi ou LB de acordo com o teste *t*, com *p* < 0,05.

4.1.5 Análise de mutantes no regulon PHO de EPEC E2348/69

Devido ao fato da linhagem E2348/69 se mostrar bastante refratária a manipulações genéticas, tais como transduções e transformações, decidimos utilizar a cepa LRT9 para quase todos os experimentos. Conforme descrito acima, LRT9 comportou-se como uma EPEC típica, aderindo de maneira localizada e expressando todos os fatores de virulência testados nesse trabalho.

Após muitas tentativas, as mutações $\Delta pst::Km^R$ (GMF195) e *pstS1::Tn5* (GMF46) de E2348/69 foram transduzidas com sucesso, embora o rendimento das transduções, se comparado com cepas K-12 de *E. coli* e mesmo em relação a LRT9 tenha sido muito inferior. Já a mutação *phoB519::Tn5* não pôde ser transduzida apesar de muitas tentativas neste sentido. Para tentar aumentar a chance de recombinação foram introduzidas diversas modificações no protocolo original de transdução, mas nenhum destes procedimentos resultou em sucesso. O mutante *phoB* de E2348/69 foi obtido pela recombinação do plasmídeo suicida pGM4, com o cromossomo de E2348/69. pGM4 contém um fragmento truncado de *phoB* de 400 pb clonado no vetor pKNOCK-Cm (vide “Materiais e Métodos”) que é capaz de replicar-se somente em bactérias que expressam a proteína Pir (ALEXEYEV, 1999). Devido a esta característica, pKNOCK-Cm comporta-se como um vetor suicida na

maioria das cepas de *E. coli*.

Para confirmar a inserção, uma reação de PCR foi realizada, utilizando os iniciadores externos ao gene *phoB* (phoB-4610 e phoB-5430). No mutante o tamanho do fragmento amplificado foi de aproximadamente 3 kb, devido a inserção de pKNOCK-Cm. Na linhagem selvagem o fragmento do gene *phoB* amplificado foi de apenas 800 pb. O mutante *phoB*::pKNOCK-Cm (GMF199) não apresentou indução de FA durante a carência de Pi, conforme esperado para um mutante *phoB* nulo (Tabela 6). A complementação da mutação *phoB* foi realizada pela transformação do plasmídio pBS1 (Tabela 6), que restaurou a capacidade de indução de FA em carência de Pi. No caso de mutantes *pst*, somente ensaios em meio rico em Pi foram realizados, pois essas condições são suficientes para avaliar a expressão constitutiva de PHO. Mutantes Δpst (GMF175) e *pstS* (GMF46) apresentaram expressão constitutiva de FA em meio rico em Pi. As mutações foram complementadas com a introdução de pGM2 (Tabela 6). Esses resultados confirmaram as mutações nos loci *phoB* e *pst* de E2348/69.

Tabela 6 - Ensaio de fosfatase alcalina (FA) de E2348/69.

Linhagem	Genótipo	Plasmídio	+ Pi ^a	- Pi ^a
E2348/69	selvagem	-	0,011 ± 0,011	2,509 ± 0,482
GMF46	<i>pstS1</i> ::Tn5	-	2,079 ± 0,104	-
GMF49	<i>pstS1</i> ::Tn5	pGM2	0,028 ± 0,023	-
GMF175	Δpst	-	1,301 ± 0,188	-
GMF202	Δpst	pGM2	0,018 ± 0,003	-
GMF199	<i>phoB</i> ::Cm ^R	-	0,023 ± 0,026	0,065 ± 0,061
GMF200	<i>phoB</i> ::Cm ^R	pBS1	0,178 ± 0,99	2,183 ± 0,499

^a - Valores representam a média ± desvio padrão de pelo menos três experimentos independentes.

- Pi - meio A sem adição de fosfato

+ Pi - meio A enriquecido com fosfato (1 mM KH₂PO₄)

O mutante GMF175 apresentou um nível de adesão 30% menor em relação a cepa selvagem (E2348/69). A presença de pGM2 restaurou quase que

completamente o nível de adesão do mutante GMF175. Já E2348/69 transformada com pGM2 não apresentou diferença estatística significativa em relação à cepa selvagem, (Fig. 23). Esses resultados mostram que embora exista um efeito de *pst* sobre a adesão de E2348/69, este foi menor do que o observado em LRT9.

Figura 23. Ensaio de adesão quantitativo por atividade endógena de β -galactosidase de mutantes *pst* de E2348/69. As cepas foram transformadas com pGM2, que carrega o operon *pst* selvagem. Barras correspondem a média $\pm$ desvio padrão de ao menos 3 ensaios independentes. *, significativamente diferente em relação a linhagem parental E2348/69 pelo teste *t* ($p < 0,05$).

4.2 O papel de (p)ppGpp na virulência de EPEC

4.2.1 Obtenção de mutantes para a síntese de (p)ppGpp

O nucleotídeo guanosina tetrafosfato é um regulador global em bactérias. Os genes envolvidos na síntese de (p)ppGpp em *E. coli* são *relA*, que codifica para a sintetase RelA, e *spoT* que codifica para SpoT, que além de ser uma sintetase também é responsável pela hidrólise (p)ppGpp. A partir de um lisado da cepa NP52 ($\Delta relA::Km^R \Delta spoT::Cm^R$), mutações nos genes *relA* e *spoT* foram transferidas para a linhagem de EPEC LRT9. O mutante $\Delta relA$ de LRT9 (GMF204) foi selecionado em placas de ágar LB contendo canamicina.

Para confirmar o fenótipo do mutante *relA*, bactérias foram semeadas em meio mínimo T-salts suplementado com todos os 20 aminoácidos, exceto histidina e contendo aminotriazol (AT), conforme descrito em “Materiais e Métodos”. Nessas

condições somente bactérias que produzem (p)ppGpp via RelA são capazes de crescer. O principal efeito de AT é o bloqueio da biossíntese de histidina devido à inibição da enzima HisB, que por sua vez induz a carência deste aminoácido. O mutante não cresceu no meio contendo AT, de acordo com o esperado.

Para a obtenção do duplo mutante de LRT9 $\Delta relA::Km^R \Delta spoT::Cm^R$, a linhagem GMF204 foi transduzida com o mesmo lisado utilizado anteriormente. Desta vez a seleção foi feita em placas de ágar LB contendo cloranfenicol. O mutante resultante desta transdução (GMF205) não sintetiza (p)ppGpp, ou seja, é (p)ppGpp⁰. Mutantes nulos para *relA* e *spoT* possuem diversas auxotrofias e não crescem, portanto, em meio mínimo não suplementado com aminoácidos. Para confirmar este fenótipo, GMF205 foi semeado em meio mínimo T-salts e, conforme o esperado, não cresceu, ao contrário da linhagem selvagem e de GMF204, que cresceram normalmente. Vale lembrar que mutações nulas em *spoT* não acompanhadas de uma mutação nula em *relA* são inviáveis, pois a ausência da hidrolase SpoT leva ao acúmulo contínuo de grandes quantidades de (p)ppGpp, inibindo completamente o crescimento da bactéria.

4.2.2 Complementação das mutações *relA* e *spoT*

Devido ao fato de LRT9 ser naturalmente resistente à ampicilina, antes de clonar *relA* e *spoT* no vetor pUC19, que possui o gene *bla* responsável pela resistência à ampicilina, foi inserido um cassete de resistência à espectinomicina neste vetor. O novo plasmídio (pUC19-Sp^R) foi chamado de pGM21. O genes *relA* e *spoT* foram clonados em pGM21, originando respectivamente pGM24 e pGM22. A inserção dos genes foi confirmada pela digestão com EcoRI (dados não apresentados).

Para confirmar o fenótipo dos mutantes, bem como a complementação por pGM22 e pGM24, os níveis de (p)ppGpp produzidos nestas cepas durante o crescimento exponencial (tempo 0) e durante a resposta severa induzida pela adição de hidroxamato de serina (HS) (tempo 30 minutos) foram avaliados. É possível observar que tanto a cepa selvagem LRT9 bem como seu mutante $\Delta relA$ (GMF204) apresentaram níveis similares de ppGpp na fase exponencial (Fig. 24). Isto era

esperado, uma vez que o nível basal de ppGpp depende fundamentalmente de SpoT (SARUBBI *et al.*, 1988). Já o duplo mutante $\Delta relA \Delta spoT$ (GMF205) não apresentou nem traços de ppGpp. Quando a cepa selvagem LRT9 foi submetida à carência de aminoácidos pela adição de HS, ocorreu um aumento notável nos níveis de ppGpp (Fig. 24A). Já no mutante GMF204 ($\Delta relA$), sob carência de aminoácidos, houve uma diminuição no nível de ppGpp. Este fenótipo, conhecido como “relaxado” deve-se ao fato de que durante a carência de aminoácidos, tanto RelA quanto SpoT são ativados, mas estando *relA* mutado, não há síntese de (p)ppGpp por esta via e a ativação de SpoT resulta em maior hidrólise deste nucleotídeo (MAGNUSSON *et al.*, 2005). O duplo mutante $\Delta relA::Km^R \Delta spoT::Cm^R$ (GMF205) também não produziu ppGpp sob carência de aminoácidos (Fig. 24A).

A transformação de pGM22 (*spoT*⁺) no mutante (p)ppGpp⁰ restaurou os níveis basais de ppGpp. A presença do plasmídio pGM24 (*relA*⁺) em GMF204 restaurou parcialmente o acúmulo de ppGpp sob carência de serina (Fig. 24B). Era de se esperar que a presença de um plasmídio de múltiplas cópias contendo *relA* produzisse altos níveis de (p)ppGpp sob carência de serina. Uma possível explicação para esta complementação parcial seria a de que nem todas as sequências reguladoras de *relA* tenham sido clonadas no plasmídio.

Em suma, esses resultados confirmam que os mutantes apresentam o fenótipo esperado em relação a síntese de (p)ppGpp, e que os plasmídios contendo os genes *relA* ou *spoT* complementaram total ou parcialmente as mutações.

Devido à complementação apenas parcial da mutação *relA* e também devido ao fato dos plasmídios pGM22 e pGM24 possuírem centenas de cópias, foi adotada uma estratégia diferente para complementar as mutações *relA* e *spoT*. Os alelos selvagens foram restaurados *in cis* via transdução por fago P1. Um lisado da cepa CF12489 que carrega Tn10 inserido no gene *argA* que fica relativamente próximo de *relA* (38 kb de distância, ~ 60% de co-transdução) foi utilizado para transduzir o gene *relA*⁺ para GMF204 (LRT9 $\Delta relA$). Os transductantes foram selecionados em placas contendo tetraciclina. Para avaliar se o gene *relA*⁺ foi co-transduzido com *argA::Tn10*, transductantes foram isolados e semeados em placas de meio T-salts contendo AT, conforme descrito acima. Um transductante *relA*⁺ *arg::Tn10* (GMF302)

que cresceu normalmente em meio contendo AT foi isolado.

Figura 24. Análise dos níveis de ppGpp em mutantes *reIA* e *spoT*. A. Níveis de ppGpp na cepa selvagem LRT9 e nos seus mutantes GMF204 ($\Delta reIA$) e GMF205 ($\Delta reIA \Delta spoT$) crescidos exponencialmente em meio mínimo (tempo 0) e 30 minutos após a adição de HS. B. Níveis de ppGpp da linhagem selvagem e dos mutantes GMF205 e GMF204 transformados com plasmídios contendo o gene *spoT* (pGM22) ou o gene *reIA* (pGM24), respectivamente medidos nos tempos 0 e 30 minutos após a adição de HS.

De maneira similar o gene *spoT* selvagem foi transferido para o duplo mutante GMF205. Um lisado da cepa MC4100TF *spoT*1655 (*zib563::Tn10 spoT⁺*, 80% de co-transdução) foi utilizado para co-transduzir os alelos *zib563::Tn10* e *spoT⁺*. Os transductantes foram selecionados em meio com tetraciclina e testados em relação ao crescimento em meio mínimo. Um transductante que cresceu normalmente em meio mínimo foi isolado (GMF296). Além disso, foi realizado um teste indireto do acúmulo de glicogênio nas células para confirmar o fenótipo *spoT⁺* de GMF296. O acúmulo de glicogênio ocorre na fase estacionária e depende de RpoS (HENGGE-ARONIS; FISCHER, 1992). Como a expressão de RpoS é positivamente regulada por (p)ppGpp (vide “Introdução”), a medição qualitativa de glicogênio avalia indiretamente o nível de (p)ppGpp. Na linhagem selvagem a coloração do *patch* de bactérias com iodo é mais escura quando comparada a do mutante $\Delta reIA \Delta spoT$, indicando que na ausência de (p)ppGpp houve redução no acúmulo de glicogênio. A inserção do alelo *spoT⁺* restaurou os níveis de glicogênio, confirmando que a

mutação *spoT* foi complementada (Fig. 25).

Figura 25. Acúmulo de glicogênio medido pela coloração com solução de iodo. A coloração mais escura indica maior acúmulo de glicogênio. *ΔrelA ΔspoT* (GMF205). *ΔrelA spoT⁺* (GMF296)

4.2.3 O efeito de (p)ppGpp sobre a adesão de EPEC

Devido ao fato de (p)ppGpp ter um papel regulador geral, afetando inclusive a expressão de genes do regulon PHO, foi testado o efeito de mutações nos genes *relA* e *spoT* sobre a adesão de EPEC (Fig. 26). O mutante GMF204 (*ΔrelA*) mostrou uma redução de cerca de 5 vezes no nível de adesão em relação à cepa selvagem LRT9. Quando complementado *in cis* com *relA⁺* (GMF302), o nível de adesão foi restaurado parcialmente, chegando em média a 64% do valor de LRT9, mas não há diferença estatisticamente significativa entre a cepa selvagem e o mutante *relA* complementado ($p > 0,05$).

O duplo mutante GMF205 (*ΔrelA ΔspoT*) apresentou níveis de adesão ainda menores, com uma redução de aproximadamente 10 vezes em relação à cepa selvagem (Fig. 26A). A inserção *in cis* do gene *spoT⁺* selvagem em GMF205, transformou o duplo mutante em uma cepa *relA⁻ spoT⁺*, que apresentou comportamento similar ao do mutante *relA*. As curvas de crescimento das bactérias mostram que, com exceção do mutante (p)ppGpp⁰, que apresentou uma diminuição na taxa crescimento a partir de 3 horas em meio DMEM, as demais bactérias cresceram de forma similar (Fig. 26B). Uma vez que para o ensaio de adesão as bactérias foram cultivadas por 3 horas somente, esta redução na taxa de crescimento de GMF205 não deve haver influenciado os resultados dos ensaios de adesão.

Figura 26. Ensaio quantitativo de adesão. A. Bactérias foram crescidas durante a noite em meio LB e aplicadas sobre uma monocamada de células HEp-2. Após 3 horas as células foram lavadas e ressuspensas em PBS-Triton 0,1%, diluídas e semeadas em meio LB para a contagem de UFC. * valores significativamente diferentes da linhagem selvagem de acordo com o teste *t*. B. Curva de crescimento das linhagens utilizadas nos ensaios de adesão. Células foram crescidas durante a noite em meio LB, ressuspensas em meio DMEM contendo 2% SFB e cultivadas sem agitação por 7 horas. (♦) LRT9; (■) $\Delta relA$ (GMF204); (▲) $relA^+ arg^-$ (GMF302); (●) $\Delta relA \Delta spoT$ (GMF205).

Podemos concluir, portanto, que a produção de (p)ppGpp é essencial para a adesão *in vitro* de EPEC. A inativação do gene *relA* levou a uma diminuição significativa no nível de adesão, apesar desta cepa produzir níveis basais de (p)ppGpp. Já a deleção conjunta de *relA* e *spoT* reduziu ainda mais a capacidade de adesão.

4.2.4 O efeito de (p)ppGpp sobre a expressão de BFP

O meio LB é rico em aminoácidos. Nos ensaios de adesão descritos acima, bactérias foram crescidas durante a noite em meio LB, mas para a realização do ensaio elas tiveram que ser ressuspensas em meio DMEM. O meio DMEM não contém todos os aminoácidos e é menos rico que LB. A passagem de LB para DMEM poderia estar gerando uma carência momentânea de aminoácidos que, por sua vez estimularia a síntese de (p)ppGpp via RelA. Para testar esta hipótese foi analisada a expressão de *bfp* em bactérias previamente crescidas em LB ou DMEM durante a noite, diluídas para uma absorbância de 0,025 em DMEM e crescidas até atingirem aproximadamente a metade da fase exponencial.

Confirmando os ensaios de adesão, na ausência de *relA* houve redução na expressão da proteína BfpA em comparação com a linhagem selvagem (Fig. 27). A transdução de *relA*⁺ (GMF302) complementou parcialmente a mutação.

O efeito de *relA* sobre a expressão de BfpA é mais evidente quando bactérias são transferidas do meio LB para o meio DMEM. Quando foi realizado o mesmo ensaio, porém com bactérias previamente crescidas em meio DMEM durante a noite ao invés de LB, o efeito da mutação *relA* foi mais moderado (Fig. 27).

No caso do mutante (p)ppGpp⁰, o efeito é mais drástico ainda, pois não foram detectadas bandas de BfpA em GMF205. Quando GMF205 foi crescida previamente em DMEM ao invés de LB, o efeito deletério da ausência de (p)ppGpp não ocorreu (Fig. 27). Isso sugere que (p)ppGpp é importante para a expressão de adesinas em EPEC, principalmente quando ocorre uma mudança de meio de cultura rico para um meio de cultura mais pobre.

Para afastar a hipótese de que a inibição observada nos mutantes *relA* e *spoT* seria devido a uma redução no padrão de expressão geral de proteínas, foi utilizado um anti-corpo contra a proteína constitutiva RpoA. Os resultados destes *blots* mostram que a expressão de RpoA foi apenas um pouco mais alto na cepa selvagem (Fig. 27).

Figura 27. Efeito de (p)ppGpp sobre a expressão de BfpA. Células foram crescidas durante a noite em meio LB e diluídas no dia seguinte em meio DMEM com 2% SFB (LB para DMEM) ou crescidas durante a noite em meio DMEM com 2% SFB e no dia seguinte diluídas no mesmo meio (DMEM para DMEM). Após a diluição, ambas as culturas foram crescidas até a metade da fase exponencial e as proteínas foram extraídas e ensaiadas com o anticorpo policlonal anti-BFP. Para a normalização das proteínas foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-RpoA (Neoclone). Os experimentos foram repetidos três vezes e um ensaio representativo é mostrado na figura.

4.2.5 O efeito de (p)ppGpp sobre a expressão de *per*

Para verificar se o efeito de (p)ppGpp sobre a expressão de BFP é via Per, foi analisada a expressão da fusão transcricional *per-lacZ* (pGM29). Bactérias foram crescidas durante a noite em meio LB e no dia seguinte diluídas em meio DMEM contendo 2% SFB. Quando as bactérias foram transferidas de LB para DMEM houve uma indução na atividade de β -galactosidase cujo pico ocorreu 5 horas após o início do ensaio (Fig. 28). A linhagem selvagem apresentou uma atividade claramente maior em comparação a dos mutantes $\Delta relA$ e $\Delta relA \Delta spoT$. Assim como ocorreu com a expressão de *bfpA*, a complementação com *relA⁺ arg::Tn10* (GMF302) foi apenas parcial (Fig. 28A).

Apesar disso, o efeito da mutação *relA* é claro, e surpreendentemente maior que aquele observado para o duplo mutante $\Delta relA \Delta spoT$. Esses resultados sugerem que a inibição da expressão de BfpA é devida a diminuição nos níveis de seu regulador PerA nos mutantes que apresentam deficiência na síntese de (p)ppGpp. As curvas de crescimento mostram que as cepas apresentaram crescimento semelhante em meio DMEM exceto o duplo mutante $\Delta relA \Delta spoT$ que apresentou crescimento mais lento, embora tenham sido acrescentados todos os aminoácidos

necessários (Fig. 28B).

Figura 28. Efeito de (p)ppGpp sobre a expressão de *per-lacZ*. O plasmídio pGM29 contendo a fusão *per-lacZ* foi transformado nas cepas contendo mutações nos genes envolvidos na síntese de (p)ppGpp. Bactérias foram crescidas em meio DMEM e amostras foram colhidas a cada hora. A. Ensaio de β-galactosidase da fusão *per-lacZ*. B. Curva de crescimento. Os ensaios foram repetidos três vezes e as curvas ilustram um experimento típico. ♦. LRT9; ■. GMF204 ($\Delta relA$); ▲. GMF302 ($relA^+ arg$); ●. GMF205 ($\Delta relA \Delta spoT$).

4.3 O papel de *rpoS* na virulência de EPEC

4.3.1 Obtenção de mutantes *rpoS* de EPEC

A mutação *rpoS*::Tn10 foi transferida para as linhagem de EPEC LRT9 via transdução por fago P1. Os transductantes que cresceram em placas contendo tetraciclina foram isolados e testados em relação à expressão de *rpoS*. A expressão de *rpoS* foi medida indiretamente pelo nível de atividade de catalase codificada por *katE*, cuja transcrição depende do fator RpoS (SCHELLHORN *et al.*, 1998). A linhagem LRT9 apresentou forte efervescência quando H₂O₂ foi aplicado sobre as colônias, indicando forte atividade de catalase. Já o mutante LRT9 *rpoS*::Tn10 (GMF290) apresentou uma efervescência muito mais fraca, que foi complementada com o plasmídio pNP5. pNP5 carrega o gene *rpoS* selvagem da cepa K-12 MG1655.

A sequência de *rpoS* de E2348/69 (IGUCHI *et al.*, 2008) mostra que há inserção de uma guanina na posição 390 quando comparada com a sequência de uma *E. coli* K-12. Essa inserção geraria um códon de parada na posição 399-401, levando provavelmente à síntese de uma proteína truncada (de apenas 132 aminoácidos) ou causando uma terminação de tradução prematura e inviabilizando a produção de RpoS. Para esclarecer a dúvida em relação a funcionalidade de *rpoS* de E2348/69, bem como seu efeito sobre a adesão, um mutante *rpoS* nesta cepa foi obtido (CFP1) através de transdução com a variante lisogênica do fago P1, pois com P1 *vir* não obtivemos sucesso. Este mutante apresentou uma efervescência ligeiramente menor em relação à linhagem selvagem e a transformação com pNP5 restaurou o fenótipo selvagem. Ensaio de *western-blot* com anticorpos anti-RpoS, descritos detalhadamente abaixo confirmaram o fenótipo das cepas.

4.3.2 Ensaio de competição entre bactérias *rpoS*⁺ e *rpoS*⁻

Como a análise da expressão de BFP e intimina, por meio de ensaios *northern-blot* e *western-blot* não mostraram efeito significativo da mutação no gene *rpoS* (descrito abaixo), uma forma de analisar se a ausência de *rpoS* confere alguma vantagem sobre a adesão de EPEC é através de ensaios de adesão nos quais o

mutante *rpoS* compete com a cepa selvagem pela adesão à células epiteliais. Foi também testada a competição entre as linhagens selvagens E2348/69 e LRT9. Neste ensaio são inoculadas quantidades iguais das duas cepas sobre uma monocamada de células HEp-2, utilizando a mesma metodologia dos ensaios de adesão realizados anteriormente. Para diferenciar entre as duas cepas, a suspensão contendo as células aderidas foi semeada em placas contendo antibiótico para qual uma das cepas possui resistência e placas contendo somente LB. De maneira semelhante quando foi realizado o ensaio de competição entre a cepa selvagem e o mutante *rpoS::Tn10*, a seleção foi feita pela resistência do mutante ao antibiótico tetraciclina.

Os mutantes *rpoS* de E2348/69 e LRT9 apresentaram uma ligeira vantagem competitiva em relação às suas respectivas cepas selvagens. E2348/69 representou cerca de 42% das bactérias aderidas, enquanto a porcentagem de E2348/69 *rpoS::Tn10* (CFP1) aderidas foi de 58%. Porém essa vantagem da cepa mutante não foi estatisticamente significativa (Fig. 29). Já o mutante *rpoS* de LRT9 (GMF290) apresentou uma vantagem significativa sobre a linhagem selvagem (63% contra 37% de bactérias aderidas, respectivamente). Para verificar se a vantagem obtida pelo mutante *rpoS* é devida a diferenças na taxa de crescimento das cepas, E2348/69, LRT9 e seus respectivos mutantes *rpoS* tiveram suas taxas de crescimento analisadas. Curvas de crescimento mostraram que todas as 4 cepas apresentaram crescimento muito similar (dados não mostrados).

Já em relação à competição entre as duas linhagens selvagens de EPEC, a vantagem de E2348/69 foi muito clara. 74% das bactérias aderidas eram de E2348/69 enquanto que somente 26% eram de LRT9 (Fig. 30).

Quando a competição ocorreu entre as duas linhagens de EPEC mutantes (LRT9 *rpoS* x E2348/69 *rpoS*) a vantagem de E2348/69 ficou ainda mais evidente. A cepa E2348/69 *rpoS* representou cerca de 91% das bactérias aderidas, enquanto LRT9 *rpoS* apenas 9% (Fig. 30).

Figura 29. Ensaio de adesão com competição entre as linhagens selvagens e mutantes *rpoS* de LRT9 e E2348/69. Sobre uma monocamada de células HEp-2 foram adicionadas quantidades iguais de bactérias selvagens e do seu respectivo mutante. O número de UFC de cada uma das cepas foi contado e os resultados transformados em porcentagem do número de cada uma das cepas em relação ao número total de bactérias. Barras representam média e desvio padrão de ao menos três experimentos independentes.

Figura 30. Ensaio de adesão com competição entre as linhagens EPEC E2348/69 e LRT9. Foram adicionadas quantidades iguais de bactérias das linhagens LRT9 e E2348/69 e de seus respectivos mutantes *rpoS* sobre uma monocamada de células HEp-2. A competição foi realizada com as linhagens selvagens entre si e respectivos mutantes *rpoS* entre si. O número de UFC foi contado e os resultados transformados em porcentagem do número de cada uma das cepas em relação ao número total de bactérias. Barras representam média e desvio padrão de ao menos três experimentos independentes.

Podemos concluir que os mutantes *rpoS* aderiram com um pouco mais de eficiência do que as cepas selvagens. A ausência de *rpoS* foi significativamente mais vantajosa na cepa LRT9. E2348/69 é competitivamente melhor em termos de adesão, porém esse efeito não pode ser atribuído a diferenças no alelo ou na expressão de *rpoS*, pois os mutantes *rpoS* destas cepas também mostraram o mesmo padrão de adesão.

4.3.3 O efeito diferencial de RpoS em duas linhagens de EPEC

Para testar o efeito de RpoS sobre a expressão de *bfp* e intimina, bactérias foram crescidas até a metade da fase exponencial ou até o início da fase estacionária em meio DMEM. Os níveis de mRNA de *bfpA* e das proteínas BfpA e intimina foram ensaiados. Foram testados mutantes *rpoS* de E2348/69 e LRT9 e a super-expressão de *rpoS* nestas cepas.

Como os genes *bfp* e *eae* são expressos predominantemente durante a fase exponencial, sendo transcritos pela RNA polimerase associada ao fator σ^{70} , formulamos a hipótese de que a competição entre RpoS (σ^s) e o fator σ^{70} pela ligação ao cerne da RNA polimerase estaria inibindo a expressão de *bfp* e *eae* na fase estacionária, assim como acontece com outros genes dependentes de σ^{70} (TASCHNER *et al.*, 2004; SPIRA *et al.*, 2008).

A Figura 31 mostra que em todos os casos, a expressão de *bfpA* foi observada somente durante a fase exponencial de crescimento e não foi detectada durante a fase estacionária em ambas as cepas de EPEC. Em E2348/69 não foi observada diferença significativa nos níveis de mRNA de *bfpA* entre a linhagem selvagem e seu respectivo mutante *rpoS*. Se durante a fase exponencial o mutante *rpoS* expressou níveis normais de *bfpA*, na fase estacionária não foi observado sinal de seu transcrito, sugerindo que a eliminação de *rpoS* não contribuiu para a expressão de *bfpA* durante a fase estacionária.

Quando transformada com o plasmídio pNP5 (*rpoS*⁺), E2348/69 não apresentou sinal de mRNA de *bfpA* mesmo durante a fase exponencial. Essa inibição, causada pela super-expressão de *rpoS*, ocorreu tanto na cepa selvagem quanto no mutante *rpoS*::Tn10 (CFP1) transformado com pNP5 (Fig. 31). Este efeito

ocorreu também na ausência de IPTG, sugerindo que a expressão de *rpoS* via pNP5, mesmo sem IPTG, é suficientemente alta. A normalização das amostras com as bandas correspondentes ao rRNA 23S mostrou que não houve diferenças significativas entre as quantidades de RNA das diferentes cepas aplicadas no gel (Fig. 31).

No caso de LRT9, o efeito de pNP5, ou seja, da super-expressão de *rpoS*, foi mais modesto do que em E2348/69, mas na presença de IPTG ficou claro que houve uma diminuição no nível de *bfpA* durante a fase exponencial. Conforme mostrado na Figura 31, os níveis do mRNA de *bfpA* foram bem similares na linhagem selvagem e no mutante *rpoS*, mas sofreram uma redução nas linhagens transformadas com pNP5.

Portanto, existe um efeito negativo relacionado à super-expressão de *rpoS* sobre a transcrição de *bfp*. Este efeito foi mais forte em E2348/69. Em ambas as cepas, mutações em *rpoS* não alteraram os níveis de *bfp*, sugerindo que a competição entre σ^{70} e RpoS (expresso a partir de uma única cópia cromossomal) não afeta negativamente a transcrição de *bfp*, mas a super-expressão de RpoS deve haver exacerbado a competição entre os fatores sigma e, conseqüentemente, inibido a transcrição de *bfpA*. Uma explicação alternativa será debatida na Discussão. Foram realizados também ensaios de *northern-blot* com uma sonda *eae* para detectar a expressão deste gene, porém os sinais de hibridização ficaram muito fracos e não puderam ser analisados (dados não apresentados).

4.3.4 A super-expressão de *rpoS* afeta a expressão de adesinas em EPEC

Para confirmar os resultados obtidos por *northern-blot* e avaliar a expressão de intimina cujo nível de mRNA não pôde ser testado por este método, ensaios de *immuno-blotting* com anticorpos específicos contra BfpA, intimina e RpoS foram realizados. Bactérias foram crescidas até a metade da fase exponencial em meio DMEM, e para super-expressar RpoS também foi adicionado 1 mM de IPTG, como nos ensaios descritos acima.

Figura 31. Efeito de *rpoS* sobre o mRNA de *bfpA* em E2348/69 (acima) e LRT9 (abaixo). Bactérias foram crescidas em meio DMEM enriquecido com 2% SFB até a metade da fase exponencial (log) ou até o início da fase estacionária (st) e amostras de RNA foram extraídas. O RNA total foi hibridizado com a sonda *bfp*, sendo que as bandas observadas correspondem ao gene *bfpA* (0,6 kb). Bactérias foram transformadas com o plasmídeo pNP5 que possui o promotor *Ptac* à montante de *rpoS*. A super-expressão do gene foi induzida pela adição de 1 mM de IPTG (+ IPTG). - IPTG indica que não foi adicionado IPTG às culturas. *rpoS*: mutante *rpoS*::Tn10. Os blots foram repetidos duas vezes e normalizados em relação ao rRNA 23S.

Embora RpoS seja expresso predominantemente na fase estacionária, foi detectada uma banda correspondente a RpoS em culturas exponenciais de todas as linhagens citadas, exceto no mutante *rpoS*. Esse fato não é estranho, pois Dong *et al.* (2008) detectaram a presença de RpoS basal na fase exponencial e também constataram que a expressão de diversos genes é influenciada por RpoS durante a

fase logarítmica. A adição de IPTG causou um grande aumento nos níveis de RpoS nas cepas transformadas com pNP5 (Fig. 32 e 33). Na ausência de IPTG, os níveis de RpoS dos transformantes foram semelhantes aos níveis basais observados nas cepas selvagens não transformadas com pNP5, indicando que ocorre um “vazamento” significativo do promotor *P_{tac}* na ausência de IPTG (Fig. 32 e 34).

Conforme mencionado acima, o sequenciamento do genoma de E2348/69 publicado recentemente (IGUCHI *et al.*, 2008) mostrou que há a inserção de uma guanina na posição 390 do ORF de *rpoS*. Essa inserção levaria a uma alteração no quadro leitura e possivelmente inviabilizaria a produção de proteínas RpoS. No entanto, os resultados das análises de *western-blot* mostram que E2348/69 expressa uma proteína RpoS de mesmo tamanho que a da cepa MG1655. Por outro lado, ensaios qualitativos de catalase e de acúmulo de glicogênio mostraram que a RpoS de E2348/69 é menos ativa que a de LRT9 (dados não mostrados).

Os ensaios de *western-blot* mostraram que o efeito deletério da super-expressão de RpoS sobre BfpA em E2348/69 só ocorreu na linhagem mutante *rpoS* (CFP1) transformada com pNP5. A linhagem selvagem transformada com pNP5 mostrou níveis de BfpA normais (Fig. 32). Esses resultados contradizem parcialmente as análises de *northern-blot* do gene *bfpA*, nas quais a presença de pNP5 inibiu fortemente a transcrição do gene também na cepa selvagem (Fig. 31). No caso de intimina, o efeito negativo de RpoS ocorreu somente quando *rpoS* foi super-expresso com a indução por IPTG e da mesma forma que BfpA, somente na linhagem *rpoS* mutante transformada com pNP5 (Fig. 32).

Por outro lado, a expressão de BfpA não foi afetada pela presença de pNP5 em LRT9. Mesmo quando RpoS foi induzido na presença de IPTG, os níveis de BfpA se mantiveram normais em LRT9 e no seu respectivo mutante *rpoS* (GMF290) (Fig. 33). Em relação à expressão de intimina, não obtivemos resultados conclusivos para a cepa LRT9, pois as bandas correspondentes a intimina apareceram de maneira muito fraca e não foi possível analisar esses resultados (dados não apresentados).

Em resumo, a mutação *rpoS* não causou um aumento nos níveis de *bfpA* e *eae*, como poderia se esperar se a expressão destes genes fosse afetada pela competição entre os fatores σ pelo cerne da polimerase. No entanto, a super-

expressão de RpoS tem um efeito negativo sobre a expressão destes genes. O efeito de *rpoS* não foi igual nas duas cepas de EPEC, sendo que de uma forma geral, a cepa E2348/69 mostrou-se mais sensível a super-produção de RpoS.

Figura 32. Efeito de RpoS sobre a expressão de BfpA e intimina em E2348/69. Células foram crescidas até a metade da fase exponencial e as proteínas foram extraídas e ensaiadas com anticorpos anti-BFP, anti-intimina e anti-RpoS. O plasmídio pNP5 possui o gene *rpoS* clonado sob a regulação do promotor *Ptac*. NT – linhagem não transformada com pNP5. Para induzir a expressão de *rpoS* foi adicionado de 1 mM de IPTG (pNP5 + IPTG).

Figura 33. Efeito de RpoS sobre a expressão de BfpA em LRT9. Células foram crescidas até a metade da fase exponencial e as proteínas foram extraídas e ensaiadas com anticorpos anti-BFP e anti-RpoS. O plasmídio pNP5 possui o gene *rpoS* clonado sob regulação do promotor *P_{tac}*. NT - linhagem não transformada com pNP5. Para induzir a expressão de *rpoS* foi adicionado de 1 mM de IPTG (pNP5 + IPTG).

4.3.5 Análise da resistência ao estresse nas cepas E2348/69 e LRT9

O efeito diferencial de *rpoS* nas duas linhagens de EPEC em relação a expressão de adesinas, bem como os ensaios qualitativos de acúmulo de glicogênio e catalase (dados não mostrados) sugerem que os alelos *rpoS* das duas cepas são diferentes ou que o efeito de RpoS nas duas cepas é sentido de maneira diferente. Para testar essas hipóteses, foram realizados testes para avaliar a resposta geral ao estresse que é regulada por RpoS.

O estresse oxidativo foi induzido pela adição de 6 mM H₂O₂ à uma suspensão de bactérias. Amostras foram colhidas em diferentes tempos e semeadas em meio LB. Os resultados são mostrados em porcentagem do número de UFC, sendo que ao tempo 0 foi atribuído o valor de 100%. Tanto E2348/69 quanto LRT9 apresentaram maior resistência ao estresse em comparação com seus respectivos mutantes *rpoS*. A linhagem LRT9 praticamente não foi afetada pelo estresse já que a porcentagem de UFC se manteve constante durante os vários tempos medidos. O mutante *rpoS* de LRT9 (GMF290) foi muito mais sensível, pois após 20 minutos de exposição a H₂O₂ restaram apenas 28% das bactérias. E2348/69 selvagem mostrou

ser mais sensível ao estresse oxidativo do que LRT9. Após 20 minutos houve uma redução de 35% na quantidade de bactérias viáveis. O seu mutante *rpoS* (CFP1) foi mais sensível ainda, pois após 20 minutos todas as bactérias haviam morrido (Fig. 34).

Para analisar o estresse causado pelo frio, bactérias foram semeadas em meio LB e incubadas na geladeira por 2, 4, 6 e 8 dias. Em seguida, as placas foram transferidas para 37 °C por uma noite para permitir o crescimento das colônias. De forma semelhante, os mutantes *rpoS* foram mais sensíveis ao estresse pelo frio em comparação às linhagens selvagens (Fig. 34). A cepa E2348/69 apresentou maior sensibilidade ao frio que LRT9, inclusive a linhagem selvagem de E2348/69 foi mais sensível ao frio do que o mutante LRT9 *rpoS*::Tn10.

Bactérias submetidas ao estresse osmótico foram mantidas durante 0, 2, 4 ou 6 horas em uma solução de 2 M NaCl. Ambas as linhagens selvagens apresentaram resistência ao estresse osmótico mostrando uma diminuição de apenas 20% no número de bactérias viáveis após 6 horas de ensaio. Os seus respectivos mutantes *rpoS* apresentaram uma resistência muito menor, pois após 6 horas em solução de 2 M NaCl somente cerca de 30% das bactérias ainda se mantiveram vivas (Fig. 34). Neste caso, ambas as cepas de EPEC se comportaram de maneira semelhante.

Os resultados dos ensaios de estresse confirmaram que a expressão de *rpoS* é fundamental para a resistência a diversos estresses em ambas as linhagens. Os mutantes *rpoS* claramente apresentaram maior mortalidade quando comparados às cepas selvagens. Quando comparadas as duas cepas de EPEC, verificamos que de uma forma geral E2348/69 se mostrou menos resistente do que LRT9. Porém, a maior sensibilidade ao estresse observada no mutante *rpoS* indica que E2348/69 expressa uma proteína RpoS funcional, ainda que menos eficiente que a de LRT9.

Figura 34. Análise da taxa de sobrevivência das cepas EPEC LRT9 e E2348/69 e seus respectivos mutantes *rpoS* submetidos a diferentes estresses. As bactérias foram crescidas em meio LB e diluições das culturas em solução salina foram submetidas as seguintes condições: 6 mM H₂O₂ (estresse oxidativo), temperatura de 4 °C (estresse frio) e 2 M NaCl (estresse osmótico). ♦. LRT9; ■. LRT9 *rpoS*::Tn10; ▲. E2348/69; ●. E2348/69 *rpoS*::Tn10.

5 DISCUSSÃO

EPEC é uma das principais causadoras de diarreia em crianças nos países em desenvolvimento, sendo portanto, um sério problema de saúde pública. Ela é caracterizada pelo padrão de adesão localizada (presente somente em linhagens de EPEC típica) e pela adesão íntima, além da ausência de toxinas Shiga. EPEC adere à superfície epitelial em dois estágios bem caracterizados. O primeiro é dependente de BFP, seguido pela adesão íntima que é dependente de intimina. Fatores ambientais contribuem para a regulação de genes relacionados a virulência em EPEC. Por exemplo, temperatura de 37 °C, cultivo em meio DMEM, presença de íons de cálcio e baixas concentrações de amônia são essências para o desenvolvimento da adesão localizada e a transcrição de *bfp*. Além disso, a transcrição de *bfp* é influenciada pela fase de crescimento da bactéria, ocorrendo predominantemente durante a fase exponencial (PUENTE *et al.*, 1996). De modo semelhante, a lesão A/E também ocorre na fase crescimento exponencial, a 37 °C e em meio DMEM (ROSENSHINE *et al.*, 1996; KENNY *et al.*, 1997b; IDE *et al.*, 2003).

O fato da adesão localizada e da lesão A/E serem induzidas pelos mesmos fatores ambientais, sugere que estes fenótipos são ao menos em parte controlados por um sistema de regulação comum. De fato, as proteínas codificadas pelo operon *perABC* controlam a expressão dos genes responsáveis por estes fenótipos de virulência. PerA é um ativador transcricional tanto de *bfp* como do próprio operon *per*. PerC é ativado por PerA, e age diretamente sobre a ativação do gene *ler*, que codifica para Ler, o ativador principal da ilha dos genes de patogenicidade LEE (GÓMEZ-DUARTE; KAPER, 1995; TOBE *et al.*, 1996; MELLIES *et al.*, 1999).

5.1 O operon *pst* aumenta o nível de adesão de EPEC

Os genes do regulon PHO, particularmente o operon *pst* e *phoB* estão envolvidos em diferentes aspectos da virulência tanto em *E. coli* como em outras bactérias.

Entre as *E. coli* patogênicas, mutações em *pst* reduziram a virulência de linhagens extraintestinais de origem suína (DAIGLE *et al.*, 1995), urinária (UPEC)

(BAHRANI-MOUGEOT *et al.*, 2002; BUCKLES *et al.*, 2006) e aviária (APEC) (LAMARCHE *et al.*, 2005; LAMARCHE *et al.*, 2008). Porém, em uma linhagem de EIEC a ausência de *pst* causou um aumento no nível de invasão, ou seja aumentou o grau de virulência da bactéria (SINAI; BAVOIL, 1993).

Esse efeito de genes do regulon PHO sobre a virulência é mais abrangente, não restringindo-se apenas a *E. coli*. Várias espécies de bactérias possuem genes do regulon PHO ou homólogos envolvidos na virulência. Mutações em genes de *pst* atenuaram a virulência do patógeno extra-intestinal *Proteus mirabilis* (BURALL *et al.*, 2004; JACOBSEN *et al.*, 2007) e de *Edwardsiella tarda*, que causa infecção intestinal em humanos e septicemia em peixes (SRINIVASSA RAO *et al.*, 2003, 2004). No fitopatógeno *Agrobacterium tumefaciens*, a indução de tumores na planta depende de *virG*, que possui sequências PHO-boxes, e é regulado por carência de Pi. Além disso o gene *chvI*, similar a *phoB* de *E. coli*, regula positivamente a expressão de *virG* (MANTIS; WINANS, 1993).

Nesta tese foi mostrado que a deleção completa do operon *pst* causou uma redução na capacidade de EPEC em aderir *in vitro* à células epiteliais humanas. Além disso, *pst* mostrou ser importante para a expressão normal das duas principais adesinas de EPEC, BFP e intimina, e dos reguladores codificados pelo operon *per*. Foi demonstrado também que a expressão do operon *pst* é ligeiramente aumentada nas condições do ensaio de adesão. Em *S. flexneri* (RUNYEN-JANECKY *et al.*, 2005), EPEC atípica e *C. rodentium* (CHENG *et al.*, 2009), o efeito deletério de mutações *pst* sobre a virulência foi demonstrado, mas ao contrário dos resultados aqui apresentados, isso se deveu à expressão constitutiva de PHO. *C. rodentium* é um patógeno de ratos, utilizado como modelo animal, e que também produz lesões A/E. Cheng *et al.* (2009) testaram a adesão *in vitro* de mutantes *pst* de uma linhagem de EPEC atípica (O114:H2) e de *C. rodentium*. Os genes *pstC* e *pstA* foram deletados e foi observada uma significativa redução nos níveis de adesão desses mutantes, bem como no nível de diarreia causada pela bactéria no hospedeiro, em comparação a linhagem selvagem. Apesar destes resultados estarem em concordância com os nossos, algumas diferenças foram observadas. A inserção de uma mutação *phoB* nos mutantes *pstCA* restaurou o fenótipo selvagem de ambas as bactérias, indicando que neste caso não é *pst* que regula a virulência

de *C. rodentium*, mas sim um ou mais genes de PHO que foram constitutivamente expressos devido a mutação em *pst*. Por outro lado, eles verificaram que os genes *ler* e *eae*, pertencentes a LEE, não foram afetados pela mutação *pst*, ao contrário dos dados que foram apresentados neste trabalho, que mostraram claramente o efeito de *pst* sobre a expressão de *eae*. Vale lembrar que *C. rodentium* e EPECs atípicas não possuem o plasmídeo EAF e, portanto, não expressam nem *bfp*, nem *per*. Provavelmente o efeito de *pst* descrito por Cheng *et al.* (2009) envolve um mecanismo regulatório diferente do descrito nesta tese, pois aqui foram testadas apenas EPEC típicas nas quais *Per*, o ponto central da regulação da virulência está presente. Já *C. rodentium* assemelha-se mais a EPECs atípicas, que não possuem plasmídeo EAF.

No patógeno intracelular *Shigella flexneri*, a mutação *pst* causou uma significativa redução na formação de placa sobre a superfície de células epiteliais humanas. A inserção de uma mutação no gene *phoB* aboliu a expressão constitutiva do regulon PHO e suprimiu o efeito da mutação *pst* sobre a adesão da bactéria. Assim como ocorreu em *C. rodentium* e EPEC atípica, a restauração da formação de placas pela mutação *phoB* indica mais uma vez que nestes casos outros genes do regulon PHO, e não *pst*, estão envolvidos na virulência (RUNYEN-JANECKY *et al.*, 2005). De modo semelhante, Sinai e Bavoil (1993) sugeriram a existência de um possível gene de PHO induzido pela mutação *pst* como responsável pela regulação positiva de uma via de invasão em EIEC.

Ao contrário dos exemplos citados acima com linhagens de *S. Flexneri*, *C. Rodentium*, EIEC e EPEC atípica, a expressão constitutiva do regulon PHO no mutante Δpst não foi responsável pelo efeito deletério da virulência da EPEC típica testada neste trabalho, pois a introdução de uma mutação *phoB* em LRT9 Δpst (GMF195) eliminou a constitutividade de PHO, mas não restaurou seus níveis de adesão originais. Além disso, um mutante *phoR* que também expressa constitutivamente os genes do regulon PHO, não teve sua adesão afetada. A mutação polar *pstS::Tn5* inibiu a expressão de *bfp* de maneira similar a Δpst , mas o mutante *pstS::Km^R* que não é polar, mas também expressa de maneira constitutiva os genes do regulon PHO não apresentou o mesmo efeito, confirmando que a inibição da virulência causada pelas mutações *pst* não é devida a constitutividade do

regulon PHO, mas está provavelmente associada a um efeito direto de um ou mais genes distais do operon (*pstC*, *pstA*, *pstB* ou *phoU*). Em concordância com nossos resultados, ou seja, de que o efeito de *pst* independe da expressão constitutiva de PHO, Daigle *et al.* (1995) mostraram que a resistência ao soro de uma linhagem selvagem de *E. coli* extraintestinal é igual quando a bactéria é crescida em meio limitado ou abundante em Pi. No meio limitado, a cepa selvagem expressa o regulon PHO. Isto indica que a expressão dos demais genes de PHO, além de *pst*, não afetou a virulência.

Em ensaios de competição, mutantes *phoB* de *V. cholerae* mostraram menor capacidade em colonizar o intestino delgado de coelhos em comparação a linhagem selvagem. Este fenótipo foi parcialmente complementado quando foi adicionado ao inóculo administrado aos coelhos uma alta concentração de Pi, o que sugere que *in vitro* o regulon PHO de *V. cholerae* não é regulado apenas pela concentração de Pi (VON KRÜGER *et al.*, 1999). No caso de EPEC LRT9, a limitação de Pi não foi a causa da redução de adesão de mutantes *pst*, pois o meio DMEM utilizado nos ensaios contém 0,9 mM de Pi, uma concentração suficientemente alta para permitir o crescimento das bactérias durante as 3 horas do ensaio e reprimir o regulon PHO. Em condições de excesso de Pi, o papel de Pst como transportador de Pi é secundário, pois o transportador de baixa afinidade Pit se encarrega de captar todo o Pi necessário (HOFFER *et al.*, 2001). Portanto, em nenhum momento do ensaio de adesão os mutantes *pst* sofreram qualquer prejuízo em relação à captação de Pi. Além disso, amostras de culturas da linhagem selvagem coletadas logo após o ensaio de adesão e submetidas a ensaios de FA mostraram que o regulon PHO não foi induzido, indicando que Pi não era limitante (dados não apresentados).

A cepa LRT9 e seu mutante Δpst (GMF195) apresentaram taxas de crescimento similares em meio DMEM, o que confirma que a deficiência de adesão do mutante não está relacionada a uma desvantagem em seu crescimento. Além disso, medidas de atividade endógena de β -galactosidase da cepa selvagem e do mutante Δpst apontam que eles expressam a enzima de maneira similar. Este experimento foi importante para mostrar que a atividade de β -galactosidase endógena empregada para determinar o nível de adesão das bactérias não foi influenciada por alguma variação na expressão da enzima causada pela mutação

pst. Embora menos comum do que a contagem de UFC, o uso do ensaio de β -galactosidase como um repórter para a adesão de EPEC mostrou ser confiável e reproduzível (MINAMI *et al.*, 1987). Os resultados obtidos nesta tese confirmaram a confiabilidade desta metodologia, pois quando foram comparados com os dados obtidos por microscopia (ver “4.1.2” na seção “Resultados”) e contagem de UFC (dados não apresentados), os três tipos de ensaio apontaram para um efeito negativo de Δpst sobre a adesão de EPEC.

Os resultados de *northern-blot* de *bfpA* e *eae*, *western-blot* de BfpA e intimina, bem como ensaios enzimáticos da fusão *per-lacZ* mostraram que *pst* tem um efeito positivo sobre a expressão dos operons *bfp*, *tir-cesT-eae* (LEE5) e *per*. O mutante *pst* mostrou significativa redução na expressão desses fatores de virulência. Uma vez que PerA e PerC regulam *bfp* e *eae*, respectivamente (TOBE *et al.*, 1996; MELLIES *et al.*, 1999), é provável que o mecanismo pelo qual *pst* intensifica a transcrição desses genes é via indução de *per*, cujos produtos por sua vez aumentam a transcrição de *bfp* e *eae*.

Poderia ser argumentado que pelo fato dos ensaios de adesão serem realizados sob condições de abundância de Pi, os níveis de expressão de *pst* seriam muito baixos para exercerem algum efeito significativo. Somado a isso, o intestino delgado, onde EPEC adere é descrito como um ambiente rico em fosfato, principalmente na sua parte proximal (GUILLEMET; MOREAU, 2008). Portanto, assim como ocorre com o meio DMEM, a expressão de *pst* no intestino delgado seria muito baixa. Porém, ensaios com fusões transcricionais mostraram que em meio DMEM há um aumento de cerca de duas vezes no nível de expressão de *pst* em comparação aos meios ricos em Pi. Isso significa que em DMEM a expressão de *pst* é relativamente alta e que possivelmente tem um efeito mais amplo, como por exemplo intensificar a adesão da bactéria. A possibilidade de que alguns dos elementos adicionados ao meio DMEM como SFB ou Pi seriam responsáveis pelo aumento da expressão de *pst* foi descartada, porque em DMEM não suplementado, os níveis de *pst* foram os mais altos registrados. Ainda não podemos indicar qual componente do meio DMEM é responsável pela elevação nos níveis de *pst*. A passagem de LB para DMEM poderia ter causado aumento do nível de (p)ppGpp que poderia, por sua vez, elevar o nível de expressão de *pst*, conforme discutido

abaixo. Até o momento não é possível afirmar se da mesma forma como no meio DMEM, no interior do intestino delgado também ocorre um aumento semelhante nos níveis de *pst*. Tampouco é possível determinar se moléculas de fosfato têm um efeito específico sobre a adesão, uma vez que sendo este um nutriente essencial, seria difícil diferenciar o efeito geral do fosfato sobre a bactéria de um efeito particular sobre a adesão ou sobre demais fatores de virulência.

Ao contrário do que ocorre com *E. coli* K-12, tanto E2348/69 quanto LRT9 não sofrem lise quando infectadas com P1 *vir*, possivelmente porque nessas linhagens o fago não consegue completar o ciclo lítico. Isto não significa que P1 não tenha capacidade de ligar-se ao receptor na membrana externa e inserir seu DNA na bactéria, que é o requisito principal para que ocorra transdução. É comum que cepas isoladas do meio-ambiente sejam resistentes à infecção com P1 e outros fagos de *E. coli* K-12.

Inicialmente testamos a cepa padrão de EPEC E2348/69, porém ela se mostrou bastante refratária tanto à transdução como à transformação, mesmo utilizando protocolos diferenciados de transdução e uma técnica de transformação eficiente como a eletrotransformação. Não há uma explicação clara para estas dificuldades. E2348/69 deve possuir os receptores necessários para interagir com P1 (uma glicose terminal ligada ao LPS na membrana externa da bactéria), pois do contrário, não teríamos obtido os transductantes $\Delta pst::Km^R$ e *pstS::Tn5*. Possivelmente, a dificuldade em transduzir esta cepa deve estar relacionada à ação de nucleases celulares que estariam degradando o DNA transferido pelo fago. Esta hipótese foi reforçada pelo fato de ter sido descrito um sistema de restrição presente em E2348/69 que impede a inserção de moléculas de DNA exógenas (HOBSON *et al.*, 2008).

Em ensaios de adesão e análise de expressão de *eae* e *bfp* por *northern* e *western-blot*, foi observado que E2348/69 expressa mais adesinas e adere melhor que LRT9. Por exemplo, quando membranas contendo RNA ou proteínas são expostas a filmes de raios-X, as bandas correspondentes aparecem sempre mais fortes nas amostras de E2348/69 do que em LRT9, embora a quantidade de proteínas e RNA total seja a mesma em todas as amostras. Em E2348/69, o efeito

da deleção de *pst* sobre adesão foi mais discreto. Talvez pelo fato de E2348/69 expressar adesinas com mais intensidade do que LRT9, o efeito modulador de *pst* nessa linhagem seja menos relevante, de forma que mesmo estando *per* prejudicado pela ausência de *pst*, ainda assim outros reguladores não afetados por *pst* poderiam compensar a ausência deste. Uma explicação alternativa seria a presença de diferenças na região promotora de *per* ou de genes sob o seu controle, que tornariam a transcrição destes genes mais eficiente em E2348/69 do que em LRT9 e menos suscetíveis ao efeito da deleção de *pst*.

Pelo presente trabalho, bem como pelas publicações de outros grupos, está se tornando evidente que Pst tem um amplo papel como regulador global da patogenicidade em diferentes espécies de bactérias e muito embora não seja o principal regulador destes mecanismos, fica claro que sua função se estende muito além do metabolismo de Pi. A Figura 35 esquematiza o modelo proposto de regulação de virulência de EPEC via Pst.

Figura 35. Modelo esquematizando os principais elementos envolvidos na regulação de virulência em EPEC e o possível mecanismo de ação de *pst*. As proteínas Pst atuam sobre um elemento desconhecido, que por sua vez ativaria o operon *per*, desencadeando a cascata regulatória que resulta na transcrição de genes presentes em EAF e na ilha de patogenicidade LEE. Linhas cheias com setas indicam regulação positiva. Linhas pontilhadas com setas indicam o produto do gene.

5.2 (p)ppGpp é essencial para expressão de *bfp* e *per*

O nucleotídeo (p)ppGpp é uma pequena molécula que tem um papel fundamental na regulação global de expressão gênica em bactérias, inclusive na regulação de fatores de virulência (MAGNUSSON *et al.*, 2005). Neste estudo demonstramos que (p)ppGpp é necessário para que haja adesão máxima de EPEC à células epiteliais. Para estudar o efeito de *pst* sobre a adesão de EPEC utilizamos a atividade endógena de β -galactosidase como repórter. Já para analisar o efeito dos reguladores globais (p)ppGpp e RpoS optamos por contabilizar os níveis de adesão através da contagem de UFC, uma vez que mutações nos genes que sintetizam e degradam estes sinalizadores afetam a expressão de β -galactosidase (SHAND *et al.*, 1989).

Durante os ensaios de adesão normalmente ocorre a passagem de um meio rico (LB) para um meio mais pobre (DMEM), pois as bactérias sempre são primeiro inoculadas em LB para permitir o crescimento máximo, antes de infectar a cultura celular. Essa mudança de meio parece ser fundamental para que o efeito de (p)ppGpp sobre a expressão de BFP possa ser observado, e estaria mimetizando o ocorrido durante a passagem de EPEC pelo intestino. Na parte anterior do intestino delgado, a concentração de nutrientes é relativamente alta permitindo um rápido crescimento das bactérias sem haver necessariamente colonização das mucosas. Já nas partes mais posteriores, a disponibilidade de nutrientes diminui, e neste caso a expressão de adesinas é crucial para a colonização que permitirá um aumento da população mesmo com menos nutrientes disponíveis.

A inativação do gene *relA* reduziu claramente o nível de adesão, bem como a expressão de *bfpA* em EPEC. Os resultados indicam que a passagem de LB para DMEM (que não é suplementado com todos os aminoácidos), induziria uma carência momentânea de aminoácidos que por sua vez resultaria na síntese de (p)ppGpp via RelA. Não é fácil medir os níveis de (p)ppGpp durante essa passagem para confirmar essa hipótese. Nakanishi *et al.* (2006) mostraram que tanto a adesão quanto a expressão de genes de LEE de EHEC foram aumentadas quando bactérias sofreram uma mudança de meio semelhante, e eles também sugeriram que isto foi devido a um aumento na síntese de (p)ppGpp via RelA. Os genes que tiveram seu

nível de transcrição elevado foram *ler*, *pchA* e *pchB*. Os dois últimos genes são similares a *perC* de EPEC e regulam a virulência em EHEC.

Ao contrário de EPEC, em EHEC a expressão dos genes de LEE ocorre de maneira mais atrasada, ou seja, na transição da fase exponencial para a fase estacionária (SPERANDIO *et al.*, 1999), no momento em que os níveis de (p)ppGpp são mais altos. Esse fato é devido provavelmente à diferença na regulação de EHEC e EPEC, sendo que na primeira os reguladores globais dos genes de virulência são proteínas codificadas por genes *pch* (IYODA; WATANABE, 2004), enquanto em EPEC a regulação ocorre via *per* (TOBE *et al.*, 1996; BUSTAMANTE *et al.*, 1998; MARTÍNEZ-LAGUNA *et al.*, 1999).

A presença de *relA* mostrou-se importante para induzir de forma completa a expressão de *bfp*. Nas condições em que os ensaios de adesão foram realizados, o efeito de (p)ppGpp foi principalmente via RelA, pois embora o mutante (p)ppGpp⁰ ($\Delta relA \Delta spoT$) tenha apresentado um nível de adesão inferior ao do mutante $\Delta relA$, a mutação no gene *relA* foi suficiente para causar uma redução de 80% no nível de adesão de LRT9.

Em concordância com o efeito de (p)ppGpp sobre a expressão de *bfpA* e adesão, a expressão de *per* medida por meio da fusão *per-lacZ* foi menor no mutante *relA* do que na cepa selvagem. Isto sugere que (p)ppGpp tem um efeito positivo sobre a transcrição de *per*. Além do efeito de (p)ppGpp ser indireto via PerA, a transcrição de *bfpA* poderia também estar sendo diretamente regulada pelos níveis de (p)ppGpp. Para testar essa hipótese, poderia ser utilizado um mutante nulo *per* ou uma cepa carregando o gene *per* sob regulação de um promotor constitutivo e avaliar o nível de transcrição de *bfpA* independentemente de *per*. Muitos promotores regulados positivamente por (p)ppGpp são dependentes de fatores σ alternativos como por exemplo σ^S (RpoS) (KVINT *et al.*, 2000; JISHAGE *et al.*, 2002). Porém, (p)ppGpp também influencia a atividade de promotores reconhecidos por σ^{70} . De uma forma geral, promotores relacionados ao crescimento e proliferação celular são negativamente regulados por (p)ppGpp, enquanto que àqueles relacionados a manutenção e estresse são regulados positivamente (NYSTRÖM, 2000). As sequências promotoras de *per* são reconhecidas por σ^{70} e embora a maioria dos

promotores dependentes de σ^{70} sofra influência negativa, neste caso (p)ppGpp parece ter efeito positivo. Há outros exemplos de efeitos positivos de (p)ppGpp sobre promotores dependentes de σ^{70} . (p)ppGpp tem efeito positivo sobre a transcrição de operons relacionados a síntese de aminoácidos, como *his*, *trp* e *arg* e também sobre *lac* (REINESS *et al.*, 1975; WINKLER *et al.*, 1979; SHAND *et al.*, 1989; CHANG *et al.*, 2002). Até mesmo entre os genes do regulon PHO foi mostrado que (p)ppGpp regula positivamente *phoA* e *pstS* (SPIRA; YAGIL, 1998).

Foram feitas tentativas no sentido de complementar as mutações *relA* e *spoT* com os genes clonados em plasmídios de múltiplas cópias. Porém, a clonagem de *relA* não foi satisfatória, possivelmente porque foi construída com alguma região regulatória ausente. Por exemplo, *spoT* possui 3 promotores, sendo que um deles está a 800 pb do início de *rpoZ*, que é o gene que está à montante de *spoT* no operon (SARUBBI *et al.*, 1988). Mas no caso de *relA*, não foi possível determinar se outras regiões reguladoras além do promotor principal, são essenciais ou não para a expressão de RelA. Para contornar os problemas de complementação, os genes *relA*⁺ e *spoT*⁺ foram inseridos *in cis* por transdução. Além de complementar pelo menos parcialmente as mutações, essa estratégia evitou efeitos secundários da super-expressão dos genes por plasmídios de múltiplas cópias.

O acúmulo de (p)ppGpp resulta em alterações fisiológicas na célula causadas pela reprogramação da expressão gênica para se adaptar a condições de estresse. Sendo um regulador global, (p)ppGpp tem um efeito pleiotrópico bastante grande, influenciando a transcrição de vários genes (MAGNUSSON *et al.*, 2005). Os níveis da proteína RpoA, que é a subunidade α da RNA polimerase, entretanto, não foram afetados pelas mutações *relA* e *spoT* e serviram para normalizar os níveis de expressão de BfpA.

É bem conhecido que a indução de genes de virulência em EPEC ocorre predominantemente em DMEM durante a fase exponencial (PUENTE *et al.*, 1996; ROSENSHINE *et al.*, 1996). Ainda não está claro quais os componentes do meio DMEM ausentes em outros meios que estão diretamente relacionados a esse efeito. Enquanto que em EHEC a expressão de LEE é fortemente induzida por bicarbonato (NAKANISHI *et al.*, 2006), em EPEC este não parece ser o principal fator de indução

(GIRÓN *et al.*, 1991; PUENTE *et al.*, 1996; ROSENSHINE *et al.*, 1996; MARTÍNEZ-LAGUNA *et al.*, 1999). Em meio rico como LB ou semi-rico como meio A, a expressão de *bfpA* e *eae* é muito baixa (dados não mostrados), confirmando que os fatores de adesão em EPEC não são expressos em meios enriquecidos (PUENTE *et al.*, 1996; KENNY *et al.*, 1997b). Conforme descrito acima, isso pode auxiliar *E. coli* a não expressar fatores de virulência em ambientes ricos em nutrientes. O fato de EPEC expressar esses genes em meios mais pobres como DMEM pode estar relacionado ao aumento dos níveis de (p)ppGpp quando a bactéria sofre uma momentânea carência nutricional.

Da mesma forma, a detecção de bandas da proteína RpoS em bactérias crescidas em meio DMEM em fase exponencial (ver item 4.3.4 em “Resultados”), que também foram previamente crescidas em LB, pode ter sido influenciada pelo aumento no nível de (p)ppGpp, já que este nucleotídeo tem influência positiva sobre a expressão de RpoS (GENTRY *et al.*, 1993; LANGE *et al.*, 1995).

A carência de Pi induz a síntese de (p)ppGpp via SpoT (SPIRA *et al.*, 1995). Mutantes (p)ppGpp⁰ expressam menos *phoA* e *pst* e a presença do regulador PhoB afeta positivamente o acúmulo de (p)ppGpp (SPIRA; YAGIL, 1998). O operon *pst* contribuiu para a adesão e a expressão de genes relacionados à síntese de adesinas. Além disso, no meio DMEM houve maior expressão de *pst*. Como ocorreu a passagem de meio LB para DMEM em todos os ensaios realizados com *pst*, a síntese de (p)ppGpp decorrente desta mudança de meio poderia contribuir para o aumento na expressão de *pst* em meio DMEM. Dessa forma, tanto *pst* como (p)ppGpp agiriam aditivamente ou sinergicamente para aumentar a adesão de EPEC.

5.3 O papel de RpoS (σ^S) na patogenicidade de EPEC

RpoS é o segundo fator σ principal em *E. coli* e participa da transcrição de genes expressos na fase estacionária e também na resposta geral ao estresse (HENGE-ARONIS, 2002). Os níveis de RpoS aumentam drasticamente durante a entrada na fase estacionária de crescimento. Mesmo sendo expresso majoritariamente na fase estacionária, foi possível detectar a presença de RpoS em

cepas de EPEC crescidas em meio DMEM durante a fase exponencial, indicando claramente que existem níveis basais expressivos de RpoS durante a fase logarítmica. De acordo com Dong *et al.* (2008), RpoS é fundamental para expressão de vários genes envolvidos no transporte de fontes de carbono durante a fase exponencial de crescimento, como exemplo o operon *mal* da maltose; *dnaK* e *mopAB* envolvidos no dobramento de proteínas; *fepBD*, *entCBA*, *fecI* e *exbBD* relacionados ao transporte de ferro. Além de demonstrar o papel regulatório de RpoS, Dong *et al.* (2008) mostraram que os genes que são regulados por RpoS durante a fase estacionária e a fase exponencial não são os mesmos.

Nesta tese foram analisados os efeitos de RpoS sobre a expressão de fatores de adesão tanto na fase exponencial quanto na fase estacionária nas cepas de EPEC E2348/69 e LRT9. Foi também testada a super-expressão de RpoS através do plasmídio pNP5, que carrega o gene *rpoS* sob regulação do promotor *P_{tac}*, induzido na presença de IPTG.

Genes envolvidos na expressão de BFP são fortemente induzidos na fase exponencial de crescimento e sua transcrição depende do fator σ^{70} (PUENTE *et al.*, 1996) que é o fator σ vegetativo envolvido na expressão da maioria dos genes de *E. coli* (TANAKA *et al.*, 1993). Análises de *northern-blot* mostraram claramente que na fase exponencial tardia e início da fase estacionária ($DO_{540} = 0,8-1$), o mRNA de *bfpA* já não pôde ser detectado, corroborando os resultados de Puente *et al.* (1996). Isto foi observado tanto na cepa selvagem como no mutante *rpoS*.

Dado que a quantidade de cernes de RNA polimerase disponíveis na célula é limitada, os fatores σ têm que competir entre si pela ligação ao cerne. Sendo assim, alguns genes são preferencialmente expressos em detrimento de outros, variando de acordo com as condições ambientais (ZHOU *et al.*, 1992; JISHAGE; ISHIHAMA, 1999; MAEDA *et al.*, 2000). A competição entre fatores σ levou-nos a postular que a ausência de expressão de *bfpA* durante a fase estacionária poderia estar relacionada ao aumento do nível de RpoS nesta fase de crescimento. No entanto, não foram observadas diferenças significativas entre o mutante *rpoS* e as linhagens selvagens quanto a expressão de *bfpA* na fase estacionária. Por outro lado, foi demonstrado um efeito diferencial que a super-expressão de RpoS teve sobre as

duas cepas de EPEC testadas. A super-expressão de RpoS reduziu fortemente a transcrição de *bfpA* em E2348/69 mesmo durante a fase exponencial, e em menor grau a de LRT9.

Os ensaios de *western-blot* mostraram que o efeito inibitório da super-expressão de *rpoS* sobre BFP somente foi observado em CFP1 (E2348/69 *rpoS*::Tn10) transformado com pNP5, mas não na cepa selvagem transformada com o mesmo plasmídio. Estes resultados contradizem parcialmente os ensaios de *northern-blot* nos quais os níveis de mRNA de *bfpA* foram afetados pela super-expressão de *rpoS* em ambas as cepas. Isto pode indicar algum tipo de regulação pós-transcricional, mas não parece ser muito provável, já que não foi descrita nenhum tipo de regulação pós-transcricional deste tipo para *bfpA*. Uma análise por PCR com iniciadores específicos para *bfpA* e para a sonda EAF (dados não mostrados) descartaram a hipótese de perda do plasmídio EAF nas cepas transformadas com pNP5.

A sequência *rpoS* de E2348/69 (IGUCHI *et al.*, 2009) contém a inserção de uma guanina na posição 390 quando comparada com a sequência *rpoS* de MG1655 (*E. coli* K-12 protótipo). Essa inserção geraria um códon de parada na posição 399-401, resultando em uma proteína truncada de apenas 132 aminoácidos, provavelmente inviável. Porém, foram detectadas bandas de RpoS de tamanho praticamente idêntico ao do RpoS de MG1655, mostrando claramente que E2348/69 expressa uma proteína RpoS normal. Embora ensaios bioquímicos qualitativos mostrassem que E2348/69 produz níveis de catalase similares a de seu mutante *rpoS*, e significativamente menores do que de MG1655 ou LRT9 (dados não mostrados), os ensaios de estresses osmótico, frio e oxidativo mostraram que o RpoS de E2348/69 é funcional, pois esta cepa foi em todos os casos mais resistente que seu mutante *rpoS*, porém, mais sensível do que LRT9.

Esse efeito diferencial de RpoS em duas cepas de EPEC é intrigante, pois ambas as cepas apresentam expressão de RpoS funcional e de mesmo tamanho. Além disso, quando foram comparados os níveis de RpoS de ambas as cepas crescidas em meio DMEM, elas apresentaram níveis semelhantes de RpoS (dados não mostrados). Embora E2348/69 expresse menos catalase (que depende de

RpoS) e seja ligeiramente menos resistente ao estresse do que LRT9, isso não é suficiente para explicar o efeito tão drástico de RpoS em E2348/69. A provável diferença entre os alelos de RpoS das cepas poderia explicar esses resultados. Para investigar essa hipótese, os alelos *rpoS* de ambas as cepas serão sequenciados e comparados. Dessa maneira, também será possível verificar se a sequência de *rpoS* de E2348/69 é a mesma da descrita por Iguchi *et al.* (2009). O gene de *rpoS* de E2348/69 também será clonado no vetor pACT3 para também super-expressar este alelo em E2348/69.

Embora não existam ainda trabalhos associando diretamente os níveis de BFP e a expressão de RpoS, existe uma conhecida via que relaciona indiretamente RpoS ao reguladores transcricionais codificados pelo operon *per*. RpoS ativa a transcrição de *gadX*, que por sua vez tem efeito negativo sobre a expressão de *per* (CASTANIE-CORNET *et al.*, 2001; SHIN *et al.*, 2001). Conforme discutido acima, PerC induz a expressão do regulador Ler, que por consequência alivia o efeito inibitório de H-NS sobre os operons de LEE (CASTANIE-CORNET *et al.*, 1999; DE BIASE *et al.*, 1999; SHIN *et al.*, 2001). É possível, portanto, que o efeito negativo da super-expressão de RpoS seja intermediado também por um aumento nos níveis de expressão de *gadX*. Como o efeito positivo de RpoS sobre *gadX* ocorre mais fortemente em meio rico do que em meio mínimo (CASTANIE-CORNET *et al.*, 2001), é possível que a expressão de RpoS a partir de uma única cópia cromossomal não tenha efeito em bactérias crescidas em DMEM, que mais se assemelha a um meio mínimo definido. Porém, a super-expressão de RpoS via pNP5 exacerbaria este efeito.

Em EHEC foi demonstrado que o operon LEE3 e possivelmente LEE5 (que codifica para intimina) são regulados positivamente por RpoS, enquanto LEE1 e LEE2 são regulados por σ^{70} (SPERANDIO *et al.*, 1999). Análises da expressão das proteínas Esp, bem como da região promotora do operon LEE4 (também conhecido como *esp*) em EHEC O157:H7 mostraram que a transcrição desses genes é positivamente regulada por RpoS e que as sequências promotoras de LEE4 (*esp*) compartilham um alto grau de homologia com a região promotora de *osmE*, um gene dependente de RpoS (BELTRAMETTI *et al.*, 1999). Já o efeito positivo de RpoS sobre a expressão de intimina (codificada por LEE5) foi proposto baseado na homologia da sequência promotora de LEE5 com outros promotores conhecidos

regulados por σ^S . Laaberki *et al.* (2006) descreveram um efeito positivo de RpoS sobre a regulação de *ler* em EHEC, que ocorre via DsrA. Esses resultados indicam que não somente LEE5 e LEE3, mas que LEE2 e LEE4 podem também ser ativados indiretamente por RpoS via *ler*. De maneira semelhante, em *C. rodentium* a expressão de LEE e a virulência são positivamente afetados por *rpoS* (DONG *et al.*, 2009).

Os resultados de ensaios de adesão por competição revelaram uma ligeira vantagem dos mutantes *rpoS* de EPEC em relação as respectivas linhagens selvagens. Os mutantes *rpoS* aderiram mais, principalmente no caso da cepa LRT9. Em um modelo de competição, um mutante *rpoS* de uma linhagem de *E. coli* intestinal de rato colonizou o intestino grosso em um nível significativamente mais alto do que a linhagem selvagem (KROGFELT *et al.*, 2000). Da mesma forma, Dong *et al.* (2009) relataram que mutantes *rpoS* de *C. rodentium* apresentaram vantagem competitiva em relação a linhagem selvagem tanto *in vivo* como *in vitro*, embora quando inoculado isoladamente o mutante foi menos virulento. Isto sugere que a vantagem dos mutantes *rpoS* é independente do seu nível de virulência. Esses resultados estão de acordo com os ensaios de adesão por competição entre a linhagem selvagem e o mutante *rpoS* obtidos aqui, nos quais o mutante apresentou uma capacidade competitiva aumentada. De acordo com o modelo GASP (*growth advantage in stationary phase*), a sobrevivência a longo prazo depende de uma atenuação nos níveis de RpoS ou no alelo de *rpoS*, já que após longos períodos de cultivo, mutantes *rpoS* tendem a dominar a cultura (ZAMBRANO *et al.*, 1993; ZAMBRANO; KOLTER, 1996). É provável que se nossos ensaios de competição fossem realizados até atingir a fase estacionária ou por períodos ainda mais prolongados, os mutantes *rpoS* poderiam apresentar uma vantagem competitiva ainda maior.

6 CONCLUSÕES

- Mutações nos genes *pst*, *phoB* e *phoR* em EPEC mostraram que a regulação dos genes do regulon PHO é idêntica a de *E. coli* K-12. Mutantes *pst* e *phoR* expressaram constitutivamente a fosfatase alcalina e os demais genes do regulon PHO.
- A deleção de *pst* reduziu em cerca de duas vezes e meia a adesão de EPEC. Mutantes *pst* apresentaram menor expressão dos genes *bfpA*, que codifica para a principal subunidade da fímbria BFP e *eae* que codifica para a adesina intimina.
- A expressão constitutiva de PHO causada pela mutação *pst* não afetou a adesão de EPEC. Um mutante *phoR* e um mutante *pstS* não-polar, ambos constitutivos aderiram e expressaram normalmente *bfpA*. Assim também, a introdução da mutação *phoB* no mutante Δpst , que aboliu a constitutividade de PHO, não restaurou a adesão de EPEC.
- A síntese de (p)ppGpp via RelA é fundamental para expressão de BfpA durante a transferência do meio LB para o meio DMEM nos ensaios de adesão. Isto evidencia a importância de (p)ppGpp na virulência de EPEC durante a passagem de um meio rico (LB) para um meio menos rico (DMEM), assim como durante a passagem da bactéria pelo trato intestinal superior (rico em nutrientes) para sua porção inferior (menos rico em nutrientes).
- Pst e (p)ppGpp regulam positivamente a expressão de fatores de virulência de EPEC via *per*, que por sua vez desencadeia a cascata regulatória que leva ao aumento da expressão de *bfp* e dos operons LEE2, LEE3, LEE4 e LEE5.
- A super-expressão de RpoS tem efeito deletério sobre a expressão de BfpA e intimina. A linhagem padrão de EPEC E2348/69 sofre muito mais o efeito de RpoS do que a linhagem LRT9. E2348/69 também é mais susceptível a estresses. Embora o sequenciamento de E2348/69 mostre uma inserção de um códon de adenina no gene *rpoS*, esta linhagem expressa uma proteína RpoS funcional e com o tamanho esperado. Uma explicação para o efeito deletério de RpoS sobre a expressão das adesinas seria sua competição com o fator σ principal (σ^{70}), inibindo a transcrição dos genes de virulência, ou através da ativação do regulador GadX, que tem efeito negativo sobre *per*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABERG, A.; SHINGLER, V.; BALSALOBRE, C. (p)ppGpp regulates type 1 fimbriation of *Escherichia coli* by modulating the expression of the site-specific recombinase FimB. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 1520-1533, 2006.

ABERG, A.; SHINGLER, V.; BALSALOBRE, C. Regulation of the *fimB* promoter: a case of differential regulation by ppGpp and DksA *in vivo*. **Molecular Microbiology**, v. 67, n. 6, p. 1223-1241, 2008.

ABRANCHES, J.; MARTINEZ, A. R.; KAJFASZ, J. K.; CHÁVEZ, V.; GARSIN, D. A.; LEMOS, J. A. The molecular alarmone (p)ppGpp mediates stress responses, vancomycin tolerance, and virulence in *Enterococcus faecalis*. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 7, p. 2248-2256, 2009.

ADAMS, J. L.; MCLEAN, R. J. Impact of *rpoS* deletion on *Escherichia coli* biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 9, p. 4285-4287, 1999.

AGUENA, M.; FERREIRA, G. M.; SPIRA, B. Stability of the *pstS* transcript of *Escherichia coli*. **Archives of Microbiology**, v. 191, n. 2, p. 105-112, 2009.

AGUENA, M.; YAGIL, E.; SPIRA, B. Transcriptional analysis of the *pst* operon of *Escherichia coli*. **Molecular Genetics and Genomics: MGG**, v. 268, n. 4, p. 518-524, 2002.

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, n. 5, p. 824-826, 828, 1999.

AMEMURA, M.; MAKINO, K.; SHINAGAWA, H.; NAKATA, A. Cross talk to the phosphate regulon of *Escherichia coli* by PhoM protein: PhoM is a histidine protein kinase and catalyzes phosphorylation of PhoB and PhoM-open reading frame 2. **Journal of Bacteriology**, v. 172, n. 11, p. 6300-6307, 1990.

ANANTHA, R. P.; STONE, K. D.; DONNENBERG, M. S. Role of BfpF, a member of the PilT family of putative nucleotide-binding proteins, in type IV pilus biogenesis and in interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host cells. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 1, p. 122-131, 1998.

ARTSIMOVITCH, I.; PATLAN, V.; SEKINE, S. I.; VASSYLYEVA, M. N.; HOSAKA, T.; OCHI, K.; YOKOYAMA, S.; VASSYLYEV, D. G. Structural basis for transcription regulation by alarmone ppGpp. **Cell**, v. 117, n. 3, p. 299-310, 2004.

BAEK, J. H.; LEE, S. Y. Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 264, n. 1, p. 104-109, 2006.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS: **NBR 6023**: Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002

BAHRANI-MOUGEOT, F. K.; BUCKLES, E. L.; LOCKATELL, C. V.; HEBEL, J. R.; JOHNSON, D. E.; TANG, C. M.; DONNENBERG, M. S. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1079-1093, 2002.

BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; LEVINE, M. M.; CANDY, D. C.; MOON, H. W. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 2, n. 3, p. 534-538, 1983.

BALZER, G. J.; MCLEAN, R. J. C. The stringent response genes *relA* and *spoT* are important for *Escherichia coli* biofilms under slow-growth conditions. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 48, n. 7, p. 675-680, 2002.

BATISSON, I.; GUIMOND, M.-P.; GIRARD, F.; AN, H.; ZHU, C.; OSWALD, E.; FAIRBROTHER, J. M.; JACQUES, M.; HAREL, J. Characterization of the novel factor *paa* involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 8, p. 4516-4525, 2003.

BATTESTI, A.; BOUVERET, E. Acyl carrier protein/SpoT interaction, the switch linking SpoT-dependent stress response to fatty acid metabolism. **Molecular Microbiology**, v. 62, n. 4, p. 1048-1063, 2006.

BELTRAMETTI, F.; KRESSE, A. U.; GUZMÁN, C. A. Transcriptional regulation of the *esp* genes of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 11, p. 3409-3418, 1999.

BHAGWAT, A. A.; TAN, J.; SHARMA, M.; KOTHARY, M.; LOW, S.; TALL, B. D.; BHAGWAT, M. Functional heterogeneity of RpoS in stress tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 7, p. 4978-4986, 2006.

BIEBER, D.; RAMER, S. W.; WU, C. Y.; MURRAY, W. J.; TOBE, T.; FERNANDEZ, R.; SCHOOLNIK, G. K. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 280, n. 5372, p. 2114-2118, 1998.

BRACHA, M.; YAGIL, E. Genetic mapping of the *phoR* regulator gene of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. **Journal of General Microbiology**, v. 59, n. 1, p. 77-81, 1969.

BROWN, L.; GENTRY, D.; ELLIOTT, T.; CASHEL, M. DksA affects ppGpp induction of RpoS at a translational level. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 16, p. 4455-4465, 2002.

BROWNING, D. F.; BUSBY, S. J. The regulation of bacterial transcription initiation. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 1, p. 57-65, 2004.

BUCKLES, E. L.; WANG, X.; LOCKATELL, C. V.; JOHNSON, D. E.; DONNENBERG, M. S. PhoU enhances the ability of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 to colonize the murine urinary tract. **Microbiology**, v. 152, n. 1, p. 153-160,

2006.

BURALL, L. S.; HARRO, J. M.; LI, X.; LOCKATELL, C. V.; HIMPSL, S. D.; HEBEL, J. R.; JOHNSON, D. E.; MOBLEY, H. L. T. *Proteus mirabilis* genes that contribute to pathogenesis of urinary tract infection: identification of 25 signature-tagged mutants attenuated at least 100-fold. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 5, p. 2922-2938, 2004.

BUSTAMANTE, V. H.; CALVA, E.; PUENTE, J. L. Analysis of cis-acting elements required for *bfpA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 11, p. 3013-3016, 1998.

CAMPELLONE, K. G.; RANKIN, S.; PAWSON, T.; KIRSCHNER, M. W.; TIPPER, D. J.; LEONG, J. M. Clustering of Nck by a 12-residue Tir phosphopeptide is sufficient to trigger localized actin assembly. **The Journal of Cell Biology**, v. 164, n. 3, p. 407-416, 2004.

CARMANY, D. O.; HOLLINGSWORTH, K.; MCCLEARY, W. R. Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 3, p. 1112-1115, 2003.

CASHEL, M.; GENTRY, D. R.; HERNANDEZ, V. J.; VINELLA, D. **The Stringent Response**. Washington, DC: American Society for Microbiology Press, 1996

CASTANIE-CORNET, M. P.; FOSTER, J. W. *Escherichia coli* acid resistance: cAMP receptor protein and a 20 bp cis-acting sequence control pH and stationary phase expression of the *gadA* and *gadBC* glutamate decarboxylase genes. **Microbiology**, v. 147, n. 3, p. 709-715, 2001.

CASTANIE-CORNET, M. P.; PENFOUND, T. A.; SMITH, D.; ELLIOTT, J. F.; FOSTER, J. W. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 11, p. 3525-3535, 1999.

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.

CHANG, D.-E.; SMALLEY, D. J.; CONWAY, T. Gene expression profiling of *Escherichia coli* growth transitions: an expanded stringent response model. **Molecular Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 289-306, 2002.

CHEN, H. D.; FRANKEL, G. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 83-98, 2005.

CHENG, C.; TENNANT, S. M.; AZZOPARDI, K. I.; BENNETT-WOOD, V.; HARTLAND, E. L.; ROBINS-BROWNE, R. M.; TAUSCHEK, M. Contribution of the *pst-phoU* operon to cell adherence by atypical enteropathogenic *Escherichia coli* and virulence of *Citrobacter rodentium*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 5, p. 1936-1944, 2009.

CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, n. 1, p. 156-159, 1987.

CHURCHWARD, G.; BELIN, D.; NAGAMINE, Y. A pSC101-derived plasmid which shows no sequence homology to other commonly used cloning vectors. **Gene**, v. 31, n. 1-3, p. 165-171, 1984.

CLEARY, J.; LAI, L. C.; SHAW, R. K.; STRAATMAN-IWANOWSKA, A.; DONNENBERG, M. S.; FRANKEL, G.; KNUTTON, S. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. **Microbiology**, v. 150, n. 3, p. 527-538, 2004.

COX, G. B.; WEBB, D.; GODOVAC-ZIMMERMANN, J.; ROSENBERG, H. Arg-220 of the PstA protein is required for phosphate transport through the phosphate-specific transport system in *Escherichia coli* but not for alkaline phosphatase repression. **Journal of Bacteriology**, v. 170, n. 5, p. 2283-2286, 1988.

COX, G. B.; WEBB, D.; ROSENBERG, H. Specific amino acid residues in both the PstB and PstC proteins are required for phosphate transport by the *Escherichia coli* Pst system. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 3, p. 1531-1534, 1989.

CRAVIOTO, A.; GROSS, R. J.; SCOTLAND, S. M.; ROWE, B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. **Current Microbiology**, v. 3, p. 95-99, 1979.

CROWTHER, L. J.; YAMAGATA, A.; CRAIG, L.; TAINER, J. A.; DONNENBERG, M. S. The ATPase activity of BfpD is greatly enhanced by zinc and allosteric interactions with other Bfp proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 26, p. 24839-24848, 2005.

DAIGLE, F.; FAIRBROTHER, J. M.; HAREL, J. Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 12, p. 4924-4927, 1995.

DALEBROUX, Z. D.; EDWARDS, R. L.; SWANSON, M. S. SpoT governs *Legionella pneumophila* differentiation in host macrophages. **Molecular Microbiology**, v. 71, n. 3, p. 640-658, 2009.

DANHORN, T.; HENTZER, M.; GIVSKOV, M.; PARSEK, M. R.; FUQUA, C. Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR-PhoB regulatory system. **Journal of Bacteriology**, v. 186, n. 14, p. 4492-4501, 2004.

DE BIASE, D.; TRAMONTI, A.; BOSSA, F.; VISCA, P. The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. **Molecular Microbiology**, v. 32, n. 6, p. 1198-1211, 1999.

DONG, T.; COOMBES, B. K.; SCHELLHORN, H. E. Role of RpoS in the virulence of *Citrobacter rodentium*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 1, p. 501-507, 2009.

DONG, T.; KIRCHHOF, M. G.; SCHELLHORN, H. E. RpoS regulation of gene expression during exponential growth of *Escherichia coli* K12. **Molecular Genetics and Genomics: MGG**, v. 279, n. 3, p. 267-277, 2008.

DONNENBERG, M. S.; GIRÓN, J. A.; NATARO, J. P.; KAPER, J. B. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 22, p. 3427-3437, 1992.

DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 12, p. 4310-4317, 1991.

DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B.; FINLAY, B. B. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. **Trends in Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 109-114, 1997.

DOZOT, M.; BOIGEGRAIN, R. A.; DELRUE, R.-M.; HALLEZ, R.; OUAHRANI-BETTACHE, S.; DANESE, I.; LETESSON, J.-J.; DE BOLLE, X.; KÖHLER, S. The stringent response mediator Rsh is required for *Brucella melitensis* and *Brucella suis* virulence, and for expression of the type IV secretion system virB. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 11, p. 1791-1802, 2006.

ECHOLS, H.; GAREN, A.; GAREN, S.; TORRIANI, A. Genetic control of repression of alkaline phosphatase in *E. coli*. **Journal of Molecular Biology**, v. 3, p. 425-438, 1961.

ELLIOTT, S. J.; SPERANDIO, V.; GIRÓN, J. A.; SHIN, S.; MELLIES, J. L.; WAINWRIGHT, L.; HUTCHESON, S. W.; MCDANIEL, T. K.; KAPER, J. B. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 11, p. 6115-6126, 2000.

ELLIOTT, S. J.; WAINWRIGHT, L. A.; MCDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DENG, Y. K.; LAI, L. C.; MCNAMARA, B. P.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 1-4, 1998.

ELLIOTT, S. J.; YU, J.; KAPER, J. B. The cloned locus of enterocyte effacement from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is unable to confer the attaching and effacing phenotype upon *E. coli* K-12. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 8, p. 4260-4263, 1999.

FANG, F. C.; LIBBY, S. J.; BUCHMEIER, N. A.; LOEWEN, P. C.; SWITALA, J.; HARWOOD, J.; GUINEY, D. G. The alternative sigma factor katF (*rpoS*) regulates *Salmonella* virulence. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 24, p. 11978-11982, 1992.

FARRIS, M.; GRANT, A.; RICHARDSON, T. B.; O'CONNOR, C. D. BipA: a tyrosine-phosphorylated GTPase that mediates interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells. **Molecular Microbiology**, v. 28, n. 2, p.

265-279, 1998.

FINLAY, B. B.; FALKOW, S. Common themes in microbial pathogenicity. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 2, p. 210-230, 1989.

FINLAY, B. B.; ROSENSHINE, I.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. **Infection and Immunity**, v. 60, n. 6, p. 2541-2543, 1992.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D. Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. **Cellular Microbiology**, v. 10, n. 3, p. 549-556, 2008.

FRANKEL, G.; PHILLIPS, A. D.; ROSENSHINE, I.; DOUGAN, G.; KAPER, J. B.; KNUSTON, S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. **Molecular Microbiology**, v. 30, n. 5, p. 911-921, 1998.

FRIEDBERG, D.; UMANSKI, T.; FANG, Y.; ROSENSHINE, I. Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 941-952, 1999.

GARMENDIA, J.; FRANKEL, G.; CREPIN, V. F. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 5, p. 2573-2585, 2005.

GAYNOR, E. C.; WELLS, D. H.; MACKICHAN, J. K.; FALKOW, S. The *Campylobacter jejuni* stringent response controls specific stress survival and virulence-associated phenotypes. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 8-27, 2005.

GENTRY, D. R.; HERNANDEZ, V. J.; NGUYEN, L. H.; JENSEN, D. B.; CASHEL, M. Synthesis of the stationary-phase sigma factor σ^s is positively regulated by ppGpp. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 24, p. 7982-7989, 1993.

GIRÓN, J. A.; HO, A. S.; SCHOOLNIK, G. K. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Science**, v. 254, n. 5032, p. 710-713, 1991.

GIRÓN, J. A.; HO, A. S.; SCHOOLNIK, G. K. Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 22, p. 7391-7403, 1993.

GIRÓN, J. A.; TORRES, A. G.; FREER, E.; KAPER, J. B. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. **Molecular Microbiology**, v. 44, n. 2, p. 361-379, 2002.

GOBER, J. W.; SHAPIRO, L. A developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3' enhancer and IHF binding elements. **Molecular Biology of the Cell**, v. 3, n. 8, p. 913-926, 1992.

GOLDBERG, M. D.; JOHNSON, M.; HINTON, J. C.; WILLIAMS, P. H. Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 549-559, 2001.

GÓMEZ-DUARTE, O. G.; KAPER, J. B. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 5, p. 1767-1776, 1995.

GUILLEMET, M. L.; MOREAU, P. L. Fur-dependent detoxification of organic acids by *rpoS* mutants during prolonged incubation under aerobic, phosphate starvation conditions. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 16, p. 5567-75, 2008.

HAACK, K. R.; ROBINSON, C. L.; MILLER, K. J.; FOWLKES, J. W.; MELLIES, J. L. Interaction of Ler at the LEE5 (*tir*) operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 1, p. 384-392, 2003.

HANAHAN, D. Techniques for transformation of *E. Coli*. In: GLOVER, D. M. (Ed). **DNA cloning techniques: a practical approach**. Oxford: IRL Press, 1985. vol. 1, p. 109-135.

HARALALKA, S.; NANDI, S.; BHADRA, R. K. Mutation in the *relA* gene of *Vibrio cholerae* affects *in vitro* and *in vivo* expression of virulence factors. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 16, p. 4672-4682, 2003.

HASELTINE, W. A.; BLOCK, R. Synthesis of guanosine tetra- and pentaphosphate requires the presence of a codon-specific, uncharged transfer ribonucleic acid in the acceptor site of ribosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 5, p. 1564-1568, 1973.

HASELTINE, W. A.; BLOCK, R.; GILBERT, W.; WEBER, K. MSI and MSII made on ribosome in idling step of protein synthesis. **Nature**, v. 238, n. 5364, p. 381-384, 1972.

HENGGE-ARONIS, R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, v. 66, n. 3, p. 373-395, 2002.

HENGGE-ARONIS, R.; FISCHER, D. Identification and molecular analysis of *glgS*, a novel growth-phase-regulated and *rpoS*-dependent gene involved in glycogen synthesis in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 6, n. 14, p. 1877-1886, 1992.

HICKS, S.; FRANKEL, G.; KAPER, J. B.; DOUGAN, G.; PHILLIPS, A. D. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue *in vitro*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 4, p. 1570-1578, 1998.

HILTON, J. L.; KEARNEY, P. C.; AMES, B. N. Mode of action of the herbicide, 3-amino-1,2,4-triazole(amitrole): inhibition of an enzyme of histidine biosynthesis.

Archives of Biochemistry and Biophysics, v. 112, n. 3, p. 544-547, 1965.

HIRATSU, K.; NAKATA, A.; SHINAGAWA, H.; MAKINO, K. Autophosphorylation and activation of transcriptional activator PhoB of *Escherichia coli* by acetyl phosphate *in vitro*. **Gene**, v. 161, n. 1, p. 7-10, 1995.

HOBSON, N.; PRICE, N. L.; WARD, J. D.; RAIVIO, T. L. Generation of a restriction minus enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69 strain that is efficiently transformed with large, low copy plasmids. **BMC Microbiology**, v. 8, p. 134-134, 2008.

HOFFER, S. M.; SCHOONDERMARK, P.; VAN VEEN, H. W.; TOMMASSEN, J. Activation by gene amplification of pitB, encoding a third phosphate transporter of *Escherichia coli* K-12. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 15, p. 4659-4663, 2001.

HUECK, C. J. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, v. 62, n. 2, p. 379-433, 1998.

IBARRA, J. A.; VILLALBA, M. I.; PUENTE, J. L. Identification of the DNA Binding Sites of PerA, the Transcriptional Activator of the *bfp* and *per* operons in Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 9, p. 2835-2847-2835-2847, 2003.

IDE, T.; MICHGEHL, S.; KNAPPSTEIN, S.; HEUSIPP, G.; SCHMIDT, M. A. Differential modulation by Ca^{2+} of type III secretion of diffusely adhering enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 4, p. 1725-1732, 2003.

IGUCHI, A.; THOMSON, N. R.; OGURA, Y.; SAUNDERS, D.; OOKA, T.; HENDERSON, I. R.; HARRIS, D.; ASADULGHANI, M.; KUROKAWA, K.; DEAN, P.; KENNY, B.; QUAIL, M. A.; THURSTON, S.; DOUGAN, G.; HAYASHI, T.; PARKHILL, J.; FRANKEL, G. Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. **Journal of Bacteriology**, v. 191, n. 1, p. 347-354, 2009.

IRIARTE, M.; STAINIER, I.; CORNELIS, G. R. The *rpoS* gene from *Yersinia enterocolitica* and its influence on expression of virulence factors. **Infection and Immunity**, v. 63, n. 5, p. 1840-1847, 1995.

ISHIHAMA, A. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. **Annual Review of Microbiology**, v. 54, p. 499-518, 2000.

IYODA, S.; WATANABE, H. Positive effects of multiple pch genes on expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 to HEP-2 cells. **Microbiology**, v. 150, n. 7, p. 2357-2571, 2004.

JACOBSEN, S. M.; LANE, M. C.; HARRO, J. M.; SHIRTLIFF, M. E.; MOBLEY, H. L. T. The high-affinity phosphate transporter Pst is a virulence factor for *Proteus*

mirabilis during complicated urinary tract infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 52, n. 2, p. 180-193, 2008.

JERSE, A. E.; KAPER, J. B. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 12, p. 4302-4309, 1991.

JERSE, A. E.; YU, J.; TALL, B. D.; KAPER, J. B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 20, p. 7839-7843, 1990.

JISHAGE, M.; ISHIHAMA, A. Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of σ^S and σ^{38} . **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 23, p. 6832-6835, 1995.

JISHAGE, M.; ISHIHAMA, A. Transcriptional organization and *in vivo* role of the *Escherichia coli* *rsd* gene, encoding the regulator of RNA polymerase σ^D . **Journal of Bacteriology**, v. 181, n. 12, p. 3768-3776, 1999.

JISHAGE, M.; KVINT, K.; SHINGLER, V.; NYSTRÖM, T. Regulation of σ factor competition by the alarmone ppGpp. **Genes & Development**, v. 16, n. 10, p. 1260-1270, 2002.

KAPANIDIS, A. N.; MARGEAT, E.; LAURENCE, T. A.; DOOSE, S.; HO, S. O.; MUKHOPADHYAY, J.; KORTKHONJIA, E.; MEKLER, V.; EBRIGHT, R. H.; WEISS, S. Retention of transcription initiation factor σ^{70} in transcription elongation: single-molecule analysis. **Molecular Cell**, v. 20, n. 3, p. 347-356, 2005.

KAPER, J. B. Defining EPEC. **Revista de Microbiologia**, v. 27, p. 130-133, 1996

KAZMIERCZAK, M. J.; WIEDMANN, M.; BOOR, K. J. Alternative σ factors and their roles in bacterial virulence. **Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR**, v. 69, n. 4, p. 527-543, 2005.

KENNY, B.; ABE, A.; STEIN, M.; FINLAY, B. B. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 7, p. 2606-2612, 1997b.

KENNY, B.; DEVINNEY, R.; STEIN, M.; REINSCHIED, D. J.; FREY, E. A.; FINLAY, B. B. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. **Cell**, v. 91, n. 4, p. 511-520, 1997a.

KENNY, B.; FINLAY, B. B. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 17, p. 7991-7995, 1995.

KIMURA, S.; MAKINO, K.; SHINAGAWA, H.; AMEMURA, M.; NAKATA, A. Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: characterization of the promoter of the

pstS gene. **Molecular & General Genetics: MGG**, v. 215, n. 3, p. 374-380, 1989.

KNUTTON, S.; BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; MCNEISH, A. S. Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Infection and Immunity**, v. 55, n. 1, p. 78-85, 1987.

KNUTTON, S.; BALDWIN, T.; WILLIAMS, P. H.; MCNEISH, A. S. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 4, p. 1290-1298, 1989.

KNUTTON, S.; ROSENSHINE, I.; PALLAN, M. J.; NISAN, I.; NEVES, B. C.; BAIN, C.; WOLFF, C.; DOUGAN, G.; FRANKEL, G. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 8, p. 2166-2176, 1998.

KNUTTON, S.; SHAW, R. K.; ANANTHA, R. P.; DONNENBERG, M. S.; ZORGANI, A. A. The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. **Molecular Microbiology**, v. 33, n. 3, p. 499-509, 1999.

KOWARZ, L.; COYNAULT, C.; ROBBE-SAULE, V.; NOREL, F. The *Salmonella typhimurium katF (rpoS)* gene: cloning, nucleotide sequence, and regulation of *spvR* and *spvABCD* virulence plasmid genes. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 22, p. 6852-6860, 1994.

KREUZER, K.; PRATT, C.; TORRIANI, A. Genetic analysis of regulatory mutants of alkaline phosphatase of *E. coli*. **Genetics**, v. 81, n. 3, p. 459-468, 1975.

KROGFELT, K. A.; HJULGAARD, M.; SØRENSEN, K.; COHEN, P. S.; GIVSKOV, M. *rpoS* gene function is a disadvantage for *Escherichia coli* BJ4 during competitive colonization of the mouse large intestine. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 5, p. 2518-2524, 2000.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 24, n. 1, p. 107-117, 2000.

KVINT, K.; FAREWELL, A.; NYSTRÖM, T. RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate for induction even in the presence of high levels of σ^S . **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 20, p. 14795-14798, 2000.

LAABERKI, M. H.; JANABI, N.; OSWALD, E.; REPOILA, F. Concert of regulators to switch on LEE expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: interplay between Ler, GrlA, HNS and RpoS. **International Journal of Medical Microbiology: IJMM**, v. 296, n. 4-5, p. 197-210, 2006.

LAMARCHE, M. G.; DOZOIS, C. M.; DAIGLE, F.; CAZA, M.; CURTISS, R.; DUBREUIL, J. D.; HAREL, J. Inactivation of the *pst* system reduces the virulence of

an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 7, p. 4138-4145, 2005.

LAMARCHE, M. G.; KIM, S.-H.; CRÉPIN, S.; MOUREZ, M.; BERTRAND, N.; BISHOP, R. E.; DUBREUIL, J. D.; HAREL, J. Modulation of hexa-acyl pyrophosphate lipid A population under *Escherichia coli* phosphate (Pho) regulon activation. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 15, p. 5256-5264, 2008.

LANGE, R.; FISCHER, D.; HENGGE-ARONIS, R. Identification of transcriptional start σ^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 16, p. 4676-4680, 1995.

LANGE, R.; HENGGE-ARONIS, R. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 5, n. 1, p. 49-59, 1991.

LANGE, R.; HENGGE-ARONIS, R. The *nlpD* gene is located in an operon with *rpoS* on the *Escherichia coli* chromosome and encodes a novel lipoprotein with a potential function in cell wall formation. **Molecular Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 733-743, 1994a.

LANGE, R.; HENGGE-ARONIS, R. The cellular concentration of the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. **Genes & Development**, v. 8, n. 13, p. 1600-1612, 1994b.

LAW, D. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 7, n. 2, p. 152-173, 1994.

LEDEAUX, J. R.; GROSSMAN, A. D. Isolation and characterization of *kinC*, a gene that encodes a sensor kinase homologous to the sporulation sensor kinases KinA and KinB in *Bacillus subtilis*. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 1, p. 166-175, 1995.

LEVINE, M. M. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 155, n. 3, p. 377-389, 1987.

LEVINE, M. M.; NATARO, J. P.; KARCH, H.; BALDINI, M. M.; KAPER, J. B.; BLACK, R. E.; CLEMENTS, M. L.; O'BRIEN, A. D. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 152, n. 3, p. 550-559, 1985.

LEVINTHAL, C.; SIGNER, E. R.; FETHEROLF, K. Reactivation and hybridization of reduced alkaline phosphatase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 48, p. 1230-1237, 1962.

LI, H.; GRANAT, A.; STEWART, V.; GILLESPIE, J. R. RpoS, H-NS, and DsrA

influence EHEC hemolysin operon (ehxCABD) transcription in *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL933. **FEMS Microbiology Letters**, v. 285, n. 2, p. 257-262, 2008.

MAEDA, H.; FUJITA, N.; ISHIHAMA, A. Competition among seven *Escherichia coli* sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 18, p. 3497-3503, 2000.

MAGNUSSON, L. U.; FAREWELL, A.; NYSTRÖM, T. ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 236-242, 2005.

MAGNUSSON, L. U.; GUMMESSON, B.; JOKSIMOVIĆ, P.; FAREWELL, A.; NYSTRÖM, T. Identical, independent, and opposing roles of ppGpp and DksA in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 14, p. 5193-5202, 2007.

MAKINO, K.; AMEMURA, M.; KAWAMOTO, T.; KIMURA, S.; SHINAGAWA, H.; NAKATA, A.; SUZUKI, M. DNA binding of PhoB and its interaction with RNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, v. 259, n. 1, p. 15-26, 1996.

MAKINO, K.; AMEMURA, M.; KIM, S. K.; NAKATA, A.; SHINAGAWA, H. Role of the σ^{70} subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*. **Genes & Development**, v. 7, n. 1, p. 149-160, 1993.

MAKINO, K.; AMEMURA, M.; KIM, S.; NAKATA, A.; SHINGAWA, H. Mechanism of transcriptional activation of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. In: TORRIANI-GORINI, A.; YAGIL, E.; SILVER, S. (Ed.). **Phosphate in Microorganisms**. Washington, D.C.: ASM Press, 1994. p. 5-12,.

MAKINO, K.; SHINAGAWA, H.; AMEMURA, M.; KAWAMOTO, T.; YAMADA, M.; NAKATA, A. 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.

MAKINO, K.; SHINAGAWA, H.; AMEMURA, M.; NAKATA, A. Nucleotide sequence of the *phoB* gene, the positive regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12. **Journal of Molecular Biology**, v. 190, n. 1, p. 37-44, 1986.

MALLIK, P.; PAUL, B. J.; RUTHERFORD, S. T.; GOURSE, R. L.; OSUNA, R. DksA is required for growth phase-dependent regulation, growth rate-dependent control, and stringent control of *fis* expression in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 16, p. 5775-5782, 2006.

MANTIS, N. J.; WINANS, S. C. The chromosomal response regulatory gene *chvI* of *Agrobacterium tumefaciens* complements an *Escherichia coli phoB* mutation and is required for virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 20, p. 6626-6636, 1993.

MARTÍNEZ-LAGUNA, Y.; CALVA, E.; PUENTE, J. L. Autoactivation and environmental regulation of *bfpT* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v.

33, n. 1, p. 153-166, 1999.

MCCONNELL, M. M.; CHART, H.; SCOTLAND, S. M.; SMITH, H. R.; WILLSHAW, G. A.; ROWE, B. Properties of adherence factor plasmids of enteropathogenic *Escherichia coli* and the effect of host strain on expression of adherence to HEp-2 cells. **Journal of General Microbiology**, v. 135, n. 5, p. 1123-1134, 1989.

MCDANIEL, T. K.; JARVIS, K. G.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 5, p. 1664-1668, 1995.

MCDANIEL, T. K.; KAPER, J. B. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. **Molecular Microbiology**, v. 23, n. 2, p. 399-407, 1997.

MELLIES, J. L.; ELLIOTT, S. J.; SPERANDIO, V.; DONNENBERG, M. S.; KAPER, J. B. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). **Molecular Microbiology**, v. 33, n. 2, p. 296-306, 1999.

MELLIES, J. L.; NAVARRO-GARCIA, F.; OKEKE, I.; FREDERICKSON, J.; NATARO, J. P.; KAPER, J. B. *espC* pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 315-324, 2001.

MERRELL, D. S.; TISCHLER, A. D.; LEE, S. H.; CAMILLI, A. *Vibrio cholerae* requires *rpoS* for efficient intestinal colonization. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 12, p. 6691-6696, 2000.

METZGER, S.; DROR, I. B.; AIZENMAN, E.; SCHREIBER, G.; TOONE, M.; FRIESEN, J. D.; CASHEL, M.; GLASER, G. The nucleotide sequence and characterization of the *relA* gene of *Escherichia coli*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 263, n. 30, p. 15699-15704, 1988.

METZGER, W.; SCHICKOR, P.; MEIER, T.; WEREL, W.; HEUMANN, H. Nucleation of RNA chain formation by *Escherichia coli* DNA-dependent RNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, v. 232, n. 1, p. 35-49, 1993.

MILLER, J. H. **A short course in bacterial genetics**: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Nova York: Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory, 1992.

MINAMI, J.; OKABE, A.; HAYASHI, H. Enzymic detection of adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. **Microbiology and Immunology**, v. 31, n. 9, p. 851-858, 1987.

MONDS, R. D.; SILBY, M. W.; MAHANTY, H. K. Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2. **Molecular Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 415-426, 2001.

MOON, H. W.; WHIPP, S. C.; ARGENZIO, R. A.; LEVINE, M. M.; GIANNELLA, R. A. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. **Infection and Immunity**, v. 41, n. 3, p. 1340-1351, 1983.

MUKHOPADHYAY, J.; KAPANIDIS, A. N.; MEKLER, V.; KORTKHONJIA, E.; EBRIGHT, Y. W.; EBRIGHT, R. H. Translocation of σ^{70} with RNA polymerase during transcription: fluorescence resonance energy transfer assay for movement relative to DNA. **Cell**, v. 106, n. 4, p. 453-463, 2001.

MURPHY, K. C.; CAMPELLONE, K. G. Lambda Red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. **BMC Molecular Biology**, v. 4, p. 11-11, 2003.

MURRAY, K. D.; BREMER, H. Control of *spoT*-dependent ppGpp synthesis and degradation in *Escherichia coli*. **Journal of Molecular Biology**, v. 259, n. 1, p. 41-57, 1996.

NAKANISHI, N.; ABE, H.; OGURA, Y.; HAYASHI, T.; TASHIRO, K.; KUHARA, S.; SUGIMOTO, N.; TOBE, T. ppGpp with DksA controls gene expression in the locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* through activation of two virulence regulatory genes. **Molecular Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 194-205, 2006.

NATARO, J. P.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 1, p. 142-201, 1998.

NICKERSON, C. A.; CURTISS, R. Role of σ factor RpoS in initial stages of *Salmonella typhimurium* infection. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 5, p. 1814-1823, 1997.

NOREL, F.; ROBBE-SAULE, V.; POPOFF, M. Y.; COYNAULT, C. The putative σ factor KatF (RpoS) is required for the transcription of the *Salmonella typhimurium* virulence gene *spvB* in *Escherichia coli*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 78, n. 2-3, p. 271-276, 1992.

NYSTRÖM, T. Growth versus maintenance: a trade-off dictated by RNA polymerase availability and sigma factor competition? **Molecular Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 855-862, 2004.

OGINO, T.; OHNO, R.; SEKIYA, K.; KUWAE, A.; MATSUZAWA, T.; NONAKA, T.; FUKUDA, H.; IMAJOH-OHMI, S.; ABE, A. Assembly of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 188, n. 8, p. 2801-2811, 2006.

ORSKOV, I.; ORSKOV, F. *Escherichia coli* in extra-intestinal infections. **The Journal of Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 551-575, 1985.

PAGET, M. S. B.; HELMANN, J. D. The σ^{70} family of sigma factors. **Genome Biology**, v. 4, n. 1, p. 203-203, 2003.

PAUL, B. J.; BARKER, M. M.; ROSS, W.; SCHNEIDER, D. A.; WEBB, C.; FOSTER, J. W.; GOURSE, R. L. DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. **Cell**, v. 118, n. 3, p. 311-322, 2004.

PHILIPPE, V. A.; MÉNDEZ, M. B.; HUANG, I. H.; ORSARIA, L. M.; SARKER, M. R.; GRAU, R. R. Inorganic phosphate induces spore morphogenesis and enterotoxin production in the intestinal pathogen *Clostridium perfringens*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 6, p. 3651-3656, 2006.

PIZARRO-CERDÁ, J.; TEDIN, K. The bacterial signal molecule, ppGpp, regulates *Salmonella* virulence gene expression. **Molecular Microbiology**, v. 52, n. 6, p. 1827-1844, 2004.

PORTER, M. E.; MITCHELL, P.; ROE, A. J.; FREE, A.; SMITH, D. G. E.; GALLY, D. L. Direct and indirect transcriptional activation of virulence genes by an AraC-like protein, PerA from enteropathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 1117-1133, 2004.

POTRYKUS, K.; CASHEL, M. (p)ppGpp: still magical? **Annual Review of Microbiology**, v. 62, p. 35-51, 2008.

PUENTE, J. L.; BIEBER, D.; RAMER, S. W.; MURRAY, W.; SCHOOLNIK, G. K. The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. **Molecular Microbiology**, v. 20, n. 1, p. 87-100, 1996.

QI, Y.; KOBAYASHI, Y.; HULETT, F. M. The *pst* operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate-regulated promoter and is involved in phosphate transport but not in regulation of the *pho* regulon. **Journal of Bacteriology**, v. 179, n. 8, p. 2534-2539, 1997.

RAMER, S. W.; BIEBER, D.; SCHOOLNIK, G. K. BfpB, an outer membrane lipoprotein required for the biogenesis of bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 22, p. 6555-6563, 1996.

RAMER, S. W.; SCHOOLNIK, G. K.; WU, C.-Y.; HWANG, J.; SCHMIDT, S. A.; BIEBER, D. The type IV pilus assembly complex: biogenic interactions among the bundle-forming pilus proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 13, p. 3457-3465, 2002.

RAO, N. N.; TORRIANI, A. Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 4, n. 7, p. 1083-1090, 1990.

REID, S. D.; HERBELIN, C. J.; BUMBAUGH, A. C.; SELANDER, R. K.; WHITTAM, T. S. Parallel evolution of virulence in pathogenic *Escherichia coli*. **Nature**, v. 406, n. 6791, p. 64-67, 2000.

REINESS, G.; YANG, H. L.; ZUBAY, G.; CASHEL, M. Effects of guanosine tetraphosphate on cell-free synthesis of *Escherichia coli* ribosomal RNA and other gene products. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United**

States of America, v. 72, n. 8, p. 2881-2885, 1975.

RICE, C. D.; POLLARD, J. E.; LEWIS, Z. T.; MCCLEARY, W. R. 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.

ROSENBERG, H.; GERDES, R. G.; CHEGWIDDEN, K. Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 131, n. 2, p. 505-511, 1977.

ROSENSHINE, I.; RUSCHKOWSKI, S.; FINLAY, B. B. Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth phase, temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells. **Infection and Immunity**, v. 64, n. 3, p. 966-973, 1996.

RUDD, K. E.; BOCHNER, B. R.; CASHEL, M.; ROTH, J. R. Mutations in the *spoT* gene of *Salmonella typhimurium*: effects on his operon expression. **Journal of Bacteriology**, v. 163, n. 2, p. 534-542, 1985.

RUIZ, N.; SILHAVY, T. J. Constitutive activation of the *Escherichia coli* Pho regulon upregulates *rpoS* translation in an Hfq-dependent fashion. **Journal of Bacteriology**, v. 185, n. 20, p. 5984-5992, 2003.

RUNYEN-JANECKY, L. J.; BOYLE, A. M.; KIZZEE, A.; LIEFER, L.; PAYNE, S. M. Role of the Pst system in plaque formation by the intracellular pathogen *Shigella flexneri*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 3, p. 1404-1410, 2005.

SÁNCHEZ-SANMARTÍN, C.; BUSTAMANTE, V. H.; CALVA, E.; PUENTE, J. L. Transcriptional regulation of the *orf19* gene and the *tir-cesT-eae* operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 9, p. 2823-2833, 2001.

SARUBBI, E.; RUDD, K. E.; CASHEL, M. Basal ppGpp level adjustment shown by new *spoT* mutants affect steady state growth rates and *rrnA* ribosomal promoter regulation in *Escherichia coli*. **Molecular & General Genetics: MGG**, v. 213, n. 2-3, p. 214-222, 1988.

SCALETISKY, I. C.; SILVA, M. L.; TRABULSI, L. R. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. **Infection and Immunity**, v. 45, n. 2, p. 534-536, 1984.

SCHELLHORN, H. E.; AUDIA, J. P.; WEI, L. I.; CHANG, L. Identification of conserved, RpoS-dependent stationary-phase genes of *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 23, p. 6283-6291, 1998.

SCHMIDT, S. A.; BIEBER, D.; RAMER, S. W.; HWANG, J.; WU, C. Y.; SCHOOLNIK, G. Structure-function analysis of BfpB, a secretin-like protein encoded by the bundle-forming-pilus operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 16, p. 4848-4859, 2001.

SCHURDELL, M. S.; WOODBURY, G. M.; MCCLEARY, W. R. Genetic evidence suggests that the intergenic region between *pstA* and *pstB* plays a role in the regulation of *rpoS* translation during phosphate limitation. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 3, p. 1150-1153, 2007.

SEKIYA, K.; OHISHI, M.; OGINO, T.; TAMANO, K.; SASAKAWA, C.; ABE, A. Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 20, p. 11638-11643, 2001.

SHAND, R. F.; BLUM, P. H.; MUELLER, R. D.; RIGGS, D. L.; ARTZ, S. W. Correlation between histidine operon expression and guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate levels during amino acid downshift in stringent and relaxed strains of *Salmonella typhimurium*. **Journal of Bacteriology**, v. 171, n. 2, p. 737-743, 1989.

SHAW, W. V. Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. **Methods in Enzymology**, v. 43, p. 737-755, 1975.

SHIBA, T.; TSUTSUMI, K.; YANO, H.; IHARA, Y.; KAMEDA, A.; TANAKA, K.; TAKAHASHI, H.; MUNEKATA, M.; RAO, N. N.; KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate and the induction of *rpoS* expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 21, p. 11210-11215, 1997.

SHIN, S.; CASTANIE-CORNET, M. P.; FOSTER, J. W.; CRAWFORD, J. A.; BRINKLEY, C.; KAPER, J. B. An activator of glutamate decarboxylase genes regulates the expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes through control of the plasmid-encoded regulator, Per. **Molecular Microbiology**, v. 41, n. 5, p. 1133-1150, 2001.

SHINAGAWA, H.; MAKINO, K.; YAMADA, M.; AMEMURA, M.; SATO, T.; ANDNAKATA, A. Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli*: dual functions of PhoR as a protein kinase and a protein phosphatase. In: Torriani-Gorini, A.; Yagil, E.; Silver, S. (Ed.). **Phosphate in Microorganisms: Cellular and Molecular Biology**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1994. p. 285-289.

SINAI, A. P.; BAVOIL, P. M. Hyper-invasive mutants define a novel Pho-regulated invasion pathway in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 1125-1137, 1993.

SOHEL, I.; PUENTE, J. L.; RAMER, S. W.; BIEBER, D.; WU, C. Y.; SCHOOLNIK, G. K. Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 9, p. 2613-2628, 1996.

SONG, M.; KIM, H.-J.; KIM, E. Y.; SHIN, M.; LEE, H. C.; HONG, Y.; RHEE, J. H.; YOON, H.; RYU, S.; LIM, S.; CHOY, H. E. ppGpp-dependent stationary phase

induction of genes on *Salmonella* pathogenicity island 1. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 33, p. 34183-34190, 2004.

SPERANDIO, V.; MELLIES, J. L.; NGUYEN, W.; SHIN, S.; KAPER, J. B. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 26, p. 15196-15201, 1999.

SPIRA, B.; HU, X.; FERENCI, T. Strain variation in ppGpp concentration and RpoS levels in laboratory strains of *Escherichia coli* K-12. **Microbiology**, v. 154, n. 9, p. 2887-2895, 2008.

SPIRA, B.; SILBERSTEIN, N.; YAGIL, E. Guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi. **Journal of Bacteriology**, v. 177, n. 14, p. 4053-4058, 1995.

SPIRA, B.; YAGIL, E. The relation between ppGpp and the PHO regulon in *Escherichia coli*. **Molecular & General Genetics: MGG**, v. 257, n. 4, p. 469-477, 1998.

SRINIVASA RAO, P. S.; LIM, T. M.; LEUNG, K. Y. Functional genomics approach to the identification of virulence genes involved in *Edwardsiella tarda* pathogenesis. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1343-1351, 2003.

SRINIVASA RAO, P. S.; YAMADA, Y.; TAN, Y. P.; LEUNG, K. Y. Use of proteomics to identify novel virulence determinants that are required for *Edwardsiella tarda* pathogenesis. **Molecular Microbiology**, v. 53, n. 2, p. 573-586, 2004.

SRIVATSAN, A.; WANG, J. D. Control of bacterial transcription, translation and replication by (p)ppGpp. **Current Opinion in Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 100-105, 2008.

STALEY, T. E.; JONES, E. W.; CORLEY, L. D. Attachment and penetration of *Escherichia coli* into intestinal epithelium of the ileum in newborn pigs. **The American Journal of Pathology**, v. 56, n. 3, p. 371-392, 1969.

STEED, P. M.; WANNER, B. L. 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.

STOCK, J. B.; NINFA, A. J.; STOCK, A. M. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. **Microbiological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 450-490, 1989.

STONE, K. D.; ZHANG, H. Z.; CARLSON, L. K.; DONNENBERG, M. S. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. **Molecular Microbiology**, v. 20, n. 2, p. 325-337, 1996.

TANAKA, K.; TAKAYANAGI, Y.; FUJITA, N.; ISHIHAMA, A.; TAKAHASHI, H. Heterogeneity of the principal σ factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product, σ^{38} is a second principal σ factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 17, p. 8303-8303, 1993.

TASCHNER, N. P.; YAGIL, E.; SPIRA, B. A differential effect of σ^S on the expression of the PHO regulon genes of *Escherichia coli*. **Microbiology**, v. 150, n. 9, p. 2985-2992, 2004.

TAYLOR, C. M.; BERESFORD, M.; EPTON, H. A. S.; SIGEE, D. C.; SHAMA, G.; ANDREW, P. W.; ROBERTS, I. S. *Listeria monocytogenes relA* and *hpt* mutants are impaired in surface-attached growth and virulence. **Journal of Bacteriology**, v. 184, n. 3, p. 621-628, 2002.

THOMPSON, A.; ROLFE, M. D.; LUCCHINI, S.; SCHWERK, P.; HINTON, J. C. D.; TEDIN, K. The bacterial signal molecule, ppGpp, mediates the environmental regulation of both the invasion and intracellular virulence gene programs of *Salmonella*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 40, p. 30112-30121, 2006.

TOBE, T.; SCHOOLNIK, G. K.; SOHEL, I.; BUSTAMANTE, V. H.; PUENTE, J. L. Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 21, n. 5, p. 963-975, 1996.

TORRIANI, A. Alkaline phosphatase from *E. Coli*. In: CANTONI, G. L.; DAVIS, D. R. (Ed.). **Procedures in Nucleic Acid Research**. Nova York: Harper & Row, 1966. p. 224-235.

TRABULSI, L. R.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T. A. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 5, p. 508-513, 2002.

TUNG, W. L.; CHOW, K. C. A modified medium for efficient electrotransformation of *E. coli*. **Trends in Genetics: TIG**, v. 11, n. 4, p. 128-129, 1995.

VANBOGELEN, R. A.; OLSON, E. R.; WANNER, B. L.; NEIDHARDT, F. C. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 15, p. 4344-4366, 1996.

VANMAELE, R. P.; ARMSTRONG, G. D. Effect of carbon source on localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 4, p. 1408-1413, 1997.

VINELLA, D.; ALBRECHT, C.; CASHEL, M.; D'ARI, R. Iron limitation induces SpoT-dependent accumulation of ppGpp in *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 958-970, 2005.

VON KRÜGER, W. M.; HUMPHREYS, S.; KETLEY, J. M. A role for the PhoBR regulatory system homologue in the *Vibrio cholerae* phosphate-limitation response and intestinal colonization. **Microbiology**, v. 145, n. 9, p. 2463-2475, 1999.

VUOPIO-VARKILA, J.; SCHOOLNIK, G. K. Localized adherence by enteropathogenic *Escherichia coli* is an inducible phenotype associated with the expression of new outer membrane proteins. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 174, n. 5, p. 1167-1177, 1991.

WANG, Y.; KIM, K. S. Effect of *rpoS* mutations on stress-resistance and invasion of brain microvascular endothelial cells in *Escherichia coli* K1. **FEMS Microbiology Letters**, v. 182, n. 2, p. 241-247, 2000.

WANNER, B. L. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. In: NEIDHARDT, F. C.; CURTISS, R. III.; INGRAHAM, J. L.; LIN, E. C. C.; LOW, K. B.; MAGASANIK, B.; REZNIKOFF, W. F.; RILEY, M.; SHAECHTER, M.; UMBARGER, H. E. (Ed.). ***Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology**. Washington D.C.: ASM Press, 1996. p. 1357-1381.

WANNER, B. L.; WILMES-RIESENBERG, M. R. Involvement of phosphotransacetylase, acetate kinase, and acetyl phosphate synthesis in control of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 7, p. 2124-2130, 1992.

WEBB, D. C.; ROSENBERG, H.; COX, G. B. Mutational analysis of the *Escherichia coli* phosphate-specific transport system, a member of the traffic ATPase (or ABC) family of membrane transporters. A role for proline residues in transmembrane helices. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 34, p. 24661-24668, 1992.

WILMES-RIESENBERG, M. R.; FOSTER, J. W.; CURTISS, R. An altered *rpoS* allele contributes to the avirulence of *Salmonella typhimurium* LT2. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 1, p. 203-210, 1997.

WILSON, R. K.; SHAW, R. K.; DANIELL, S.; KNUTTON, S.; FRANKEL, G. Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Cellular Microbiology**, v. 3, n. 11, p. 753-762, 2001.

WINKLER, M. E.; ZAWODNY, R. V.; HARTMAN, P. E. Mutation *spoT* of *Escherichia coli* increases expression of the histidine operon deleted for the attenuator. **Journal of Bacteriology**, v. 139, n. 3, p. 993-1000, 1979.

WÖSTEN, M. M. Eubacterial sigma-factors. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 22, n. 3, p. 127-150, 1998.

XIAO, H.; KALMAN, M.; IKEHARA, K.; ZEMEL, S.; GLASER, G.; CASHEL, M. Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 9, p. 5980-5990, 1991.

YANISCH-PERRON, C.; VIEIRA, J.; MESSING, J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. **Gene**, v. 33, n. 1, p. 103-119, 1985.

YILDIZ, F. H.; SCHOOLNIK, G. K. Role of *rpoS* in stress survival and virulence of *Vibrio cholerae*. **Journal of Bacteriology**, v. 180, n. 4, p. 773-784, 1998.

ZAMBRANO, M. M.; KOLTER, R. GASPing for life in stationary phase. **Cell**, v. 86, n. 2, p. 181-184, 1996.

ZAMBRANO, M. M.; SIEGELE, D. A.; ALMIRÓN, M.; TORMO, A.; KOLTER, R. Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures. **Science**, v. 259, n. 5102, p. 1757-1760, 1993.

ZHANG, H. Z.; DONNENBERG, M. S. DsbA is required for stability of the type IV pilin of enteropathogenic *Escherichia coli*. **Molecular Microbiology**, v. 21, n. 4, p. 787-797, 1996.

ZHANG, H. Z.; LORY, S.; DONNENBERG, M. S. A plasmid-encoded prepilin peptidase gene from enteropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Bacteriology**, v. 176, n. 22, p. 6885-6891, 1994.

ZHOU, Y. N.; COLEMAN, W. G.; YANG, Z.; YANG, Y.; HODGSON, N.; CHEN, F.; JIN, D. J. Regulation of cell growth during serum starvation and bacterial survival in macrophages by the bifunctional enzyme SpoT in *Helicobacter pylori*. **Journal of Bacteriology**, v. 190, n. 24, p. 8025-8032, 2008.

ZHOU, Y. N.; WALTER, W. A.; GROSS, C. A. A mutant σ^{32} with a small deletion in conserved region 3 of σ has reduced affinity for core RNA polymerase. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 15, p. 5005-5012, 1992.

ANEXOS

Artigo publicado sobre este trabalho:

- Artigo 1** FERREIRA, G. M.; SPIRA, B. The *pst* operon of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances bacterial adherence to epithelial cells. **Microbiology**, v. 154, n. 7, p. 2025-2036, 2008.
- Artigo 2** AGUENA, M.; FERREIRA, G. M.; SPIRA, B. Stability of the *pstS* transcript of *Escherichia coli*. **Archives of Microbiology**, v. 191, n. 2, p. 105-112, 2009.

The *pst* operon of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances bacterial adherence to epithelial cells

Gerson Moura Ferreira and Beny Spira

Correspondence

Beny Spira
benys@usp.br

Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, São Paulo-SP CEP:05508-900, Brazil

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adheres *in vivo* and *in vitro* to epithelial cells. Two main adhesins, the bundle-forming pilus and intimin, encoded by the *bfp* operon and *eae*, respectively, are responsible for the localized and the intimate adherence phenotypes. Deletion of the *pst* operon of EPEC abolishes the transport of inorganic phosphate through the phosphate-specific transport system and causes the constitutive expression of the PHO regulon genes. In the absence of *pst* there is a decrease in the expression of the main EPEC adhesins and a reduction in bacterial adherence to epithelial cells *in vitro*. This effect is not related to PHO constitutivity, because a Δpst *phoB* double mutant that is defective in the transcription of the PHO genes also displayed low levels of adherence and expression of adhesins. Likewise, a PHO-constitutive *phoR* mutation did not affect bacterial adherence. The expression of the *per* operon, which encodes the *bfp* and *ler* regulators PerA and PerC, is also negatively affected by the *pst* deletion. Overall, the data presented here demonstrate that the *pst* operon of EPEC plays a positive role in the bacterial adherence mechanism by increasing the expression of *perA* and *perC* and consequently the transcription of *bfp* and *eae*.

Received 14 January 2008

Revised 28 March 2008

Accepted 8 April 2008

INTRODUCTION

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is one of the most important bacterial causes of infant diarrhoea in developing countries. EPEC is known for its ability to cause attaching-effacing (A/E) lesions, which is histopathologically characterized by an intimate adherence of the bacteria to the brush-border microvilli, and the formation of pedestal-like structures on the epithelial tissue beneath the bacterial adherence sites (Nataro & Kaper, 1998). In the A/E lesions, bacteria adhere intimately through the adhesin intimin that binds to the intimin receptor (Tir) previously exported to the host cell (Kenny *et al.*, 1997). Another EPEC characteristic is the formation of microcolonies on cell monolayers *in vitro*, a pattern known as localized adherence (LA) (Scaletsky *et al.*, 1984).

Most genes implicated in the A/E lesions are situated in a 35 kb pathogenicity island known as the locus of enterocyte effacement (LEE). This region harbours five operons containing 41 genes divided into three functional regions. LEE1, 2 and 3 encode proteins involved in the biogenesis of a type III secretion system (TTSS), which is a multi-protein complex that spans both bacterial membranes and is used to transfer effector proteins into the host

cell. LEE5 contains the *eae* and *tir* loci that encode, respectively, the adhesin intimin and Tir. LEE4 encodes the Esp proteins, which are secreted by a TTSS (Mellies *et al.*, 1999).

Typical EPEC strains carry a large plasmid known as pEAF (plasmid of EPEC adherence factor). At least two operons (*bfp* and *per*) present in pEAF are needed to confer on EPEC the LA phenotype. The *bfp* operon contains 14 genes related to the biogenesis of the bundle-forming pilus (BFP), a type IV fimbria found in typical EPEC strains (Stone *et al.*, 1996). The first gene of the operon, *bfpA*, encodes the main subunit of the fimbria (Donnenberg *et al.*, 1992). PerA, encoded by the *perABC* operon, is responsible for the positive regulation of *bfp* expression (Tobe *et al.*, 1996). PerC activates the transcription of *ler*, a gene present in LEE1 that encodes the main transcriptional activator of LEE (Mellies *et al.*, 1999). In addition, expression of *bfp* and A/E activity is dependent on several environmental factors. Maximum transcription levels of *bfp* and of A/E activity occur at 37 °C and during the exponential growth phase (Puentes *et al.*, 1996; Rosenshine *et al.*, 1996). Expression of *bfp* is also dependent on the presence of calcium ions and is inhibited by ammonium (Puentes *et al.*, 1996).

The PHO regulon of *E. coli* constitutes a group of more than 30 genes and operons whose expression is induced by phosphate limitation and that are related to the transport and assimilation of phosphorylated compounds. Some of

Abbreviations: A/E, attaching-effacing; AP, alkaline phosphatase; BFP, bundle-forming pilus; CAT, chloramphenicol acetyltransferase; EPEC, enteropathogenic *Escherichia coli*; FCS, fetal calf serum; LA, localized adherence; LEE, locus of enterocyte effacement; P_i, inorganic phosphate; TTSS, type III secretion system.

the most well-studied PHO genes are *phoA*, which encodes alkaline phosphatase, the *pst* operon that encodes the high-affinity inorganic phosphate (P_i)-transport system Pst, and the operon *phoB-phoR*, which codes for a two component system that controls the expression of the PHO regulon. When P_i concentration in the medium falls below 4 μ M, the histidine kinase PhoR, located in the inner membrane, auto-phosphorylates and transfers the phosphate group to the regulatory protein PhoB. Once phosphorylated, PhoB-P binds to consensus regions, known as PHO boxes, present in the promoters of all PHO genes thereby activating their transcription (Makino *et al.*, 1988). Under phosphate-excess conditions, PhoR, which also displays phosphatase activity, dephosphorylates PhoB-P and halts the transcription of the PHO regulon genes (Makino *et al.*, 1989).

The *pst* operon is induced under P_i shortage conditions and is composed of five genes, *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB* and *phoU*, which are transcribed counter-clockwise in that order. Four of these genes encode the Pst system formed by the proteins PstS, PstC, PstA and PstB. PstS is a periplasmic protein that binds P_i with high affinity and carries the P_i molecule to the channel formed by the transmembrane proteins PstC and PstA (Webb *et al.*, 1992). PstB is an ATP-binding protein that energizes Pst transport (Chan & Torriani, 1996). The function of PhoU is still unclear, but it does not participate in the transport of P_i (Steed & Wanner, 1993).

The Pst system also functions as a negative regulator of the PHO regulon, as most mutations in any gene of the *pst* operon lead to the constitutive expression of the PHO regulon (Wanner, 1996). The nature of this regulatory function is still unknown, and some point mutations in *pstC* and *pstA* abolish P_i transport through Pst, without disrupting the Pst regulatory function (Cox *et al.*, 1988, 1989). Mutations in *phoR* that affect the phosphatase activity of the protein also cause the constitutive expression of the PHO regulon (Carmany *et al.*, 2003; Kreuzer *et al.*, 1975). At the protein level, the Pst system of EPEC (strain E2348/69) is 99.2 % identical to that of *E. coli* K-12. At the DNA level, the *pst* ORFs are 97.5 % identical on average. The only significant difference is a 92 bp deletion in EPEC *pst* in the intergenic region between *pstA* and *pstB*.

Several studies have described a positive correlation between some PHO genes and the virulence of *E. coli* and of other bacterial species as well. Mutations in *pstC*, *phoU* and partial deletions of the *pst* operon reduced the virulence of extra-intestinal *E. coli* strains (Buckles *et al.*, 2006; Daigle *et al.*, 1995; Lamarche *et al.*, 2005). Likewise, insertions in the *pstS* gene of a porcine EPEC strain also negatively interfered with bacterial virulence by reducing attachment to the host cells (Batisson *et al.*, 2003) and in *Vibrio cholerae*, a mutation in *phoB* partially impaired the colonization of rabbit intestines (von Krüger *et al.*, 1999).

In the present study, we analysed the influence of the regulatory genes of the PHO regulon, namely the *pst*

operon, *phoB* and *phoR*, on the adherence of EPEC to epithelial cells *in vitro*. We show that *pst* is needed for the full expression of EPEC adhesins and that the lack of *pst* is detrimental to bacterial adherence.

METHODS

Bacterial strains, plasmids and oligonucleotides. These are listed in Table 1.

Media and growth conditions. Medium A is a semi-rich low-phosphate medium (Levinthal *et al.*, 1962) which was called medium A + P_i when supplemented with 1 mM KH_2PO_4 and medium A - P_i when not supplemented. LB medium was used as described by Miller (1992). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) for epithelial cells (Cultilab-Brazil) was supplemented with 40 μ g proline ml^{-1} when used for the Δ *pst* *phoB* mutant.

Transduction of PHO mutations. The mutations Δ *pst*::Km^R and *phoB519*::Tn5 were transferred to LRT9 by transduction with phage P1 and selection with kanamycin. *phoB23 proC*::Tn10 was transduced from strain BS1 into GMF195 (LRT9 Δ *pst*::Km^R) and selected for tetracycline resistance. The *phoR69* mutation was transduced into LRT9 by a two-step procedure. First, *proC*::Tn10 from strain BS8 was transduced into LRT9 and selected for tetracycline resistance and proline auxotrophy. Next, a P1 lysate of strain C3T (*phoR69 proC*⁺) was used to transduce LRT9 *proC*::Tn10, and the transductants were selected for growth on minimal medium. The Δ *pst* and *phoR* mutants were tested for alkaline phosphatase (AP) constitutivity and the *phoB* mutants were tested for the lack of AP induction under P_i limitation. All transductions were performed as described by Miller (1992).

Plasmid construction. Plasmid pGM2 was constructed by ligating a *Pst*I- and *Eco*RI-digested PCR product corresponding to the entire *pst* operon of E2348/69 to the low-copy vector pGB2 digested with the same restriction enzymes. The *pst* fragment of E2348/69 was amplified using the oligonucleotides *pst*1 and *pst*2, which adds *Pst*I and *Eco*RI restriction sites to the ends of the DNA molecule.

To construct a transcriptional fusion between the *perABC* promoter and *lacZ*, a fragment of 645 bp containing the promoter of *per* was amplified by PCR using plasmid pEAF as a template and the oligonucleotides Per-P1 and Per-P2. The PCR product was first cloned in pGEM T-easy (Promega) and the recombinant plasmid was digested with *Eco*RI. The digested fragment containing the *perABC* promoter region was ligated to the *Eco*RI-digested vector pRKLacZ290 (Gober & Shapiro, 1992) that harbours a promoterless *lacZ* gene, resulting in plasmid pGM17. The orientation of the cloned *per* promoter with respect to *lacZ* was checked by amplifying the region encompassing the fusion *per-lacZ* by PCR with the oligonucleotides Per-P1 and *lacZ*-1391 and sequencing.

Strain GMF247 (LRT9 Δ *pst* *phoB*) is resistant to tetracycline and could not be transformed with pGM17. A spectinomycin-resistance cassette was therefore inserted into pGM17, resulting in plasmid pGM29. Briefly, pGM17 was partially digested with 0.2 units of *Eco*RV (which digests inside the tetracycline-resistance gene and elsewhere) for 2 h. The spectinomycin-resistance cassette was obtained by digesting pJL74 (LeDeaux & Grossman, 1995) with *Pst*I and *Bam*HI, followed by treatment with Klenow to blunt the fragment ends. The fragments were then ligated and colonies were selected based on their resistance to spectinomycin and sensitivity to tetracycline.

Enzyme assays. AP activity was assayed as described by Spira *et al.* (1995). Bacteria were grown in medium A $\pm$ P_i . *p*-Nitrophenyl-

Table 1. Strains, plasmids and oligonucleotides used in this study

Strain, plasmid or oligonucleotide	Relevant features or sequence	Reference/source
Strains		
LRT9	EPEC O111:abH2	L. R. Trabulsi (Instituto Butantan, São Paulo)
GMF195	LRT9 $\Delta(pstSCAB-phoU)$ 560::Km ^R	P1 transduction from BS7 into LRT9
GMF201	pGM2 in GMF195	This study
GMF210	pBS1 in JC1	This study
GMF236	LRT9 <i>phoB23 proC</i> ::Tn10	P1 transduction from BS1 into LRT9
GMF247	LRT9 $\Delta(pstSCAB-phoU)$ 560::Km ^R <i>phoB23 proC</i> ::Tn10	P1 transduction from BS1 into GMF195
GMF257	LRT9 <i>phoR69</i>	P1 transduction from BS8 and C3T into LRT9
GMF264	pBS1 in GMF257	This study
GMF269	pGB2 in GMF195	This study
GMF285	pGM17 in LRT9	This study
GMF286	pGM17 in GMF195	This study
GMF287	pGM17 in GMF201	This study
JC1	LRT9 <i>phoB519</i> ::Tn5	P1 transduction from BW10200 into LRT9
E2348/69	EPEC O127:H6	Levine <i>et al.</i> (1985)
GMF284	pGM17 in JPN15	This study
JPN15	EPEC E2348/69 cured of pEAF	Levine <i>et al.</i> (1985)
MG1655	Wild-type <i>E. coli</i> K-12	Xiao <i>et al.</i> (1991)
BS1	MG1655 <i>phoB23 proC</i> ::Tn10	P1 transduction from RW3390 into LEP1 and then into MG1655
BS7	MG1655 $\Delta(pstSCAB-phoU)$ 560::Km ^R	Spira <i>et al.</i> (1995)
BS8	MG1655 <i>proC</i> ::Tn10	P1 transduction from RW3390 into MG1655
BW10200	Δlac -169 <i>phoB519</i> ::Tn5 <i>creB510 thi</i>	Steed & Wanner (1993)
C3T	Hfr <i>relA1 pit-10 spoT1 tonA22 phoR69</i>	Echols <i>et al.</i> (1961)
LEP1	F ⁻ <i>phoB lac proC thi trp purE tsx</i>	Bracha & Yagil (1973)
RW3390	$\Delta[lacU169] proC$::Tn10 <i>leu thi Str</i> ^R	R. Weisberg (NIH, Bethesda, USA)
Plasmids		
pBS1	<i>phoBR</i> from <i>E. coli</i> K-12 cloned in pBR322	Spira & Yagil (1999)
pBS11	<i>pstS</i> promoter cloned in pKK232-8	Taschner <i>et al.</i> (2004)
pGB2	Cloning vector	Churchward <i>et al.</i> (1984)
pGEM T-easy	Cloning vector	Promega
pGM2	<i>pstSCAB-phoU</i> from strain E2348/69 cloned in pGB2	This study
pGM17	<i>perABC</i> promoter cloned in pRKlacZ290	This study
pGM29	<i>perABC</i> promoter cloned in pRKlacZ290 containing a Sp ^R cassette	This study
pKK232-8	Cloning vector carrying a promoterless <i>cat</i> gene	Amersham Biosciences
pRKlacZ290	Low-copy vector carrying a promoterless <i>lacZ</i> gene	Gober & Shapiro (1992)
pJL74	Plasmid bearing a Sp ^R cassette	LeDeaux & Grossman (1995)
Oligonucleotides		
bfp-A	5'-AATGGTGCTTGCGCTTGCTGC-3'	
bfp-B	5'-GCCGCTTTATCCAACCTGGT-3'	
eae-A	5'-ACGTTGCAGCATGGGTAACCT-3'	
eae-B	5'-GATCGGCAACAGTTTCACCTG-3'	
Per-P1	5'-CTTAGCCGCGTGTCCTACTAT-3'	
Per-P2	5'-TTCGGTGAATTCCTTCTTGTTC-3'	
lacZ-1391	5'-CCTCTTCGCTATTACGCCAG-3'	
pst1	5'-TCCTGCGAATTCATGTGAC-3'	
pst2	5'-GACCATGCCTGCAGTTATTA-3'	
rpoD1	5'-GCCGAAGCAGTTTGACTACC-3'	
rpoD2	5'-GCCACGGTTGGTGTATTCT-3'	

phosphate (p-NPP) was used as a substrate and Na₂HPO₄ was used to terminate the reaction. AP specific activity was calculated according to the following formula: $A^{410}/\text{time (min)}/\text{cell density (OD}_{540})$.

β -Galactosidase was assayed as described by Miller (1992). Briefly, 800 μ l buffer Z (16.1 g Na₂HPO₄ l⁻¹, 5.5 g NaH₂PO₄ l⁻¹, 0.75 g KCl l⁻¹, 0.25 g MgSO₄·7H₂O l⁻¹ and 2.7 ml β -mercaptoethanol l⁻¹) was

added to 200 μ l of permeabilized cells and the reaction was started with the addition of 200 μ l 4 mg ONPG ml^{-1} . Samples were incubated at 32 °C until a yellow colour developed and 500 μ l 1 M Na_2CO_3 was added to terminate the reaction. The reaction product was read at 420 nm and Miller units were calculated.

Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) activity of the *pstS-cat* fusion was measured using a modification of the biochemical assay devised by Shaw (1975). Bacteria were grown overnight in LB and resuspended in LB, medium $\text{A} \pm \text{P}_i$, DMEM supplemented with 0%, 2% or 10% fetal calf serum (FCS), DMEM supplemented with 2% FCS and 1 mM KH_2PO_4 and DMEM medium without FCS. Cells were grown to the mid-exponential phase (OD_{540} 0.4–0.5), washed with 0.1 M Tris/HCl pH 8 and disrupted by incubation in lysis buffer (100 mM potassium phosphate buffer pH 8.0, 2.0 mM EDTA, 1% Triton X-100, 5.0 mg BSA ml^{-1} , 1.0 mM DTT, 5.0 mg lysozyme ml^{-1}) for 15 min at room temperature. The lysate was then centrifuged to remove cell debris and added to a cuvette containing 0.4 mg dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ml^{-1} and 0.1 mM acetyl-CoA, both diluted in 0.1 M Tris/HCl pH 7.8. The reaction was started by the addition of 0.1 mM chloramphenicol. The enzyme specific activity was calculated using the following formula: $(\Delta A^{412} \times \text{dilution factor}) / (13.6 \times \text{OD}_{540} \times \text{cell volume})$.

Qualitative adherence assay. The adherence of EPEC to Hep-2 cells (larynx carcinoma established culture) was essentially performed as described by Cravioto *et al.* (1979). A suspension containing 10^5 Hep-2 cells in 1 ml DMEM supplemented with 10% FCS was added to each well of a 24-well tissue plate and grown for 48 h at 37 °C with 5% CO_2 . The medium was then removed from the cell monolayer and replaced with 1 ml fresh DMEM supplemented with 2% FCS and 1% mannose. At this point, 5×10^7 bacteria previously grown for 18 h in LB medium at 37 °C were added to each well. After 3 h of incubation, the cell monolayer was washed six times with PBS to remove the non-adherent bacteria. Cells were fixed with methanol and stained with Giemsa and May–Grunwald stains. Adherent bacteria were observed under an optical microscope and photographed.

Quantitative adherence assay. To quantify the level of bacterial adherence, a modification of the method of Minami *et al.* (1987) was employed. This method makes use of the endogenous β -galactosidase produced by the bacteria as a reporter. Hep-2 and bacterial cells were grown as described for the qualitative adherence assay, except that 1 mM IPTG was added to the media to induce expression of the *lacZ* operon. After washing with PBS, the monolayer containing the adhered bacteria was treated with 200 μ l lysis buffer (0.1 M Tris/HCl pH 8, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 1 mM DTT and 5 mg lysozyme ml^{-1}) for 20 min at room temperature; β -galactosidase activity was assayed as described above.

RNA extraction and Northern-blot analysis. Bacteria were grown in DMEM supplemented with 2% FCS without agitation at 37 °C and harvested at an OD_{540} of 0.4–0.6. They were then homogenized with 4 ml acid phenol/guanidine thiocyanate and incubated at 60 °C for 5 min. Following the addition of 1.6 ml chloroform, samples were centrifuged and 1 vol. 2-propanol was added to the supernatant. The precipitated RNA was centrifuged, resuspended in formamide and quantified by spectrophotometry. Twenty micrograms total RNA were electrophoresed in a 1% agarose gel containing 7% formaldehyde and transferred to a nylon membrane by capillarity. Radioactively labelled DNA probes for *bfpA*, *eae* and *rpoD* were synthesized by random primer labelling using [^{32}P]-dCTP. The DNA templates were amplified by PCR using the oligonucleotide pairs *bfpA*/bfp-B, *eaeA*/eae-B and *rpoD*+/rpoD-. Membranes were hybridized with the labelled probes at 42 °C in hybridization solution (MRC-HS114F) for at least 16 h, washed and exposed to X-ray films.

To hybridize the RNA with *rpoD*, membranes were stripped of the labelled *bfpA* or *eae* probes and rehybridized with a radioactively labelled *rpoD* DNA probe.

Western-blot analysis. Cells grown overnight in LB were diluted in 10 ml DMEM containing 2% FCS to a final OD_{540} of 0.025 and incubated at 37 °C without agitation. After 4 h, the cultures were centrifuged and resuspended in 1 ml PBS. OD_{540} was measured, and 2×10^9 bacteria from each culture were resuspended in 100 μ l loading buffer (0.1 M Tris/HCl pH 6.8, 2% SDS, 5% β -mercaptoethanol, 10% glycerol, 0.002% bromophenol) and boiled for 3 min. Ten microlitres of each sample was resolved by SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (Hybond-ECL; Amersham Biosciences) by capillarity. The membrane was blocked for 1 h in PBS supplemented with 0.05% Tween-20 (PBS-T) and 5% skim milk, and incubated with the monoclonal antibody anti-intimin (diluted 1:500) and the polyclonal antibody anti-BFP (diluted 1:2000) for 1 h. Peroxidase conjugates of anti-mouse immunoglobulin G and anti-rabbit immunoglobulin G (Promega) were used as secondary antibodies. Detection was performed with the SuperSignal West Pico Chemiluminescent system (Pierce), as recommended by the manufacturer.

RESULTS

To test whether the PHO regulon affects EPEC adherence to epithelial cells, mutations in PHO genes that have regulatory functions were transferred to the wild-type EPEC strain LRT9 by P1 transduction. Unlike many natural *E. coli* isolates, LRT9 is relatively sensitive to P_i , which facilitates the transfer of gene markers or mutations from *E. coli* K-12 to EPEC strains, although with a considerably lower efficiency. Mutations in *phoB*, *phoR* and a deletion of the entire *pst* operon were transduced to LRT9. To check the phenotype of the transductants, bacteria were grown overnight in medium A under P_i excess (+ P_i) or P_i limitation (– P_i) and tested for AP activity (Table 2). As expected, mutations in *pst* and *phoR* resulted in the constitutive expression of AP. The level of AP under P_i -sufficiency was higher in LRT9 Δ *pst* than in LRT9 *phoR*, confirming that mutations in *phoR* result in less AP production than mutations in *pst* (Kreuzer *et al.*, 1975). Plasmids carrying the respective wild-type genes complemented the constitutive phenotype. Two different null mutations in *phoB* (alleles *phoB23* and *phoB519*) abolished the expression of AP even under P_i -limiting conditions and normal levels of AP expression were restored by complementing *in trans* with a wild-type *phoB* gene. In conclusion, mutations introduced into the PHO regulatory genes of LRT9 caused the expected phenotypes.

Effect of PHO mutations on *in vitro* EPEC adherence

To test the effect of the PHO mutations on EPEC adherence, qualitative and quantitative *in vitro* assays with an established epithelial culture (Hep-2 cells) were performed. As happens with typical wild-type EPEC

Table 2. AP level of overnight cultures

Values represent the mean $\pm$ SE of three independent experiments. +P_i, medium A supplemented with 1 mM KH₂PO₄; -P_i, non-supplemented medium A. See Methods for units.

Strain	Genotype	Plasmid	AP activity	
			+P _i	-P _i
LRT9	Wild-type	–	0.01 $\pm$ 0.01	1.76 $\pm$ 0.47
GMF195	Δ <i>pst</i>	–	2.97 $\pm$ 0.73	3.09 $\pm$ 0.39
GMF201	Δ <i>pst</i>	pGM2 (<i>ppst</i> ⁺)	0.09 $\pm$ 0.11	1.57 $\pm$ 0.32
JC1	<i>phoB519</i>	–	0	0
GMF210	<i>phoB519</i>	pBS1 (<i>pphoBR</i> ⁺)	0.04 $\pm$ 0.04	1.28 $\pm$ 0.35
GMF257	<i>phoR69</i>	–	1.93 $\pm$ 0.31	1.23 $\pm$ 0.30
GMF264	<i>phoR69</i>	pBS1 (<i>pphoBR</i> ⁺)	0.04 $\pm$ 0.04	1.63 $\pm$ 0.15
GMF247	Δ <i>pst phoB23</i>	–	0 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.11

strains, LRT9 adhered in a localized fashion and formed microcolonies on Hep-2 cell surfaces after 3 h of incubation (Fig. 1a). Deletion of the *pst* operon negatively

Fig. 1. Qualitative *in vitro* adherence assay of PHO mutants. Bacteria (5×10^7 c.f.u. ml⁻¹) were added to a monolayer of Hep-2 cells and incubated for 3 h. Following the incubation period, the cell monolayer was washed and stained. (a) EPEC wild-type strain LRT9; (b) GMF195 (LRT9 Δ *pst*); (c) JC1 (LRT9 *phoB519*); (d) GMF195 transformed with pGM2 (*ppst*⁺); (e) GMF247 (Δ *pst phoB23*); (f) GMF257 (LRT9 *phoR69*).

affected the adherence of LRT9, as the microcolonies formed by strain GMF195 (LRT9 Δ *pst*) were more scattered and with fewer bacteria adhered (Fig. 1b). For a quantitative assessment of bacterial adherence, the β -galactosidase activity of the adhered bacteria was used as a reporter (Minami *et al.*, 1987). The adherence level of strain GMF195 was more than twofold lower than that of the wild-type strain (Fig. 2, compare bars B and C). C.f.u. ml⁻¹ counting of adhered LRT9 and of its Δ *pst* mutant confirmed the deleterious effect of Δ *pst* on adherence (not shown). Complementation *in trans* of the Δ *pst* mutation with the low-copy plasmid pGM2 (*ppst*⁺) restored the normal adherence phenotype (Figs 1d and 2, D). pGB2 was used as a negative control and, as expected, did not improve the adherence level of GMF195 (Fig. 2, E). A *phoB* null mutation did not affect the adherence pattern of LRT9 (Fig. 1c), and a 20 % increase in the adherence level of the *phoB* mutant was observed, but it was not statistically significant (Fig. 2, F), indicating that the presence of PhoB is not necessary to obtain normal levels of adherence.

Since mutations in the *pst* operon lead to the constitutive transcription of all PHO genes, we next investigated whether the effect of Pst on EPEC adherence was related to the constitutive expression of the PHO genes. To test this, mutant strains LRT9 *phoR* and LRT9 Δ *pst phoB* were obtained. We reasoned that if PHO constitutivity elicited by *pst* deletion is responsible for the inhibition of adherence, inactivation of PhoB would alleviate the deleterious effect of PHO constitutivity on bacterial adherence. Likewise, we reasoned that a *phoR* mutation, which also causes the constitutive expression of the PHO genes, would also inhibit EPEC adherence. The double mutant Δ *pst phoB23* displayed an adherence level similar to that shown by the Δ *pst* mutant (Figs 1e and 2, G), indicating that although this strain ceased to express PHO constitutively, it still adhered less than the wild-type or the *phoB* mutant, suggesting that *pst* was epistatic to *phoB* in this case. Interestingly, the opposite occurs in the regulation of PHO, i.e. *phoB* is epistatic to *pst*. The *phoR*

Fig. 2. Quantitative adherence assay of PHO mutants. Bacteria (5×10^7 c.f.u. ml^{-1}) grown in the presence of 1 mM IPTG were added to a Hep-2 cell monolayer. After 3 h, the cells were washed to remove non-adherent bacteria, and the activity of β -galactosidase was measured. A value of 100% was assigned to the adherence level of the wild-type LRT9 strain. Bars represent the means $\pm$ SE of at least three independent experiments. **, Values significantly different ($P < 0.05$) from the parent strain LRT9 by Student's *t*-test. Bars: A, K-12 strain MG1655; B, LRT9; C, GMF195 (LRT9 Δ *pst*); D, GMF195 transformed with *pGM2* (*ppst*⁺); E, GMF195 transformed with *pGB2* (cloning vector); F, JC1 (LRT9 *phoB519*); G, GMF247 (Δ *pst phoB23*); H, GMF257 (LRT9 *phoR69*).

mutation did not significantly affect the adherence of LRT9 (Figs 1f and 2, H). Taken together, these results suggest that the deleterious effect of the Δ *pst* mutation on EPEC adherence is not due to the constitutive expression of PHO.

It might be argued that the negative effect of Δ *pst* on EPEC adherence is caused by an artefact due to a decrease in bacterial growth rate or by an unspecific inhibition of endogenous β -galactosidase expression. To address these concerns, the kinetics of β -galactosidase expression and the growth patterns of strains LRT9, GMF195 (LRT9 Δ *pst*) and GMF195 transformed with *pGM2* (*ppst*⁺) were determined (Fig. 3). Bacteria were suspended in DMEM supplemented with 2% FCS and 1 mM IPTG at an initial concentration of 5×10^7 cells ml^{-1} and grown without agitation for 9 h at 37 °C. Samples were harvested every hour and assayed for β -galactosidase activity and growth. All three strains grew exponentially with a very similar growth rate for the first 5–6 h (up to $\text{OD}_{540} \sim 0.7$), when they reached the stationary phase (Fig. 3b). It could also be argued that the presence of *pst* would be advantageous under these conditions because a *pst*⁺ strain would take up P_i more efficiently. However, DMEM is rich in P_i (0.9 mM), which enables maximal growth rate and yield even in the absence of the high-affinity P_i transport system Pst. The entry of the cells into the stationary phase after 5 h of growth ($\text{OD}_{540} \sim 0.8$) was probably caused by O_2 depletion and by the presence of 1 mM IPTG, which limited bacterial growth.

The β -galactosidase activity of all three strains reached a plateau at 3 h (Fig. 3a). At this point the strain bearing *pGM2* showed a slightly higher activity that slowly decreased from that point on. Overall, the growth pattern and β -galactosidase activity of all three strains was very similar and it can thus be concluded that the negative effect

of Δ *pst* on adherence is not due to a reduction in growth rate or in β -galactosidase expression.

Fig. 3. Endogenous β -galactosidase activity and growth curve of LRT9 and its *pst* mutant. Bacteria were grown in DMEM supplemented with 2% FCS and 1 mM IPTG for 9 h. Samples were harvested every hour and assayed for (a) β -galactosidase activity and (b) growth. ■, LRT9; ▲, GMF195 (LRT9 Δ *pst*); ▼, GMF201 (*pGM2* in GMF195). Experiments were repeated twice, and representative results are presented.

The *pst* operon positively regulates the expression of *bfp*, *eae* and *per*

EPEC adherence depends on the expression of at least two different adhesins, BFP and intimin. Deletion of *pst* might affect EPEC adherence by inhibiting the expression of one of these adhesins. To test this hypothesis, Northern- and Western-blot analyses were conducted. Cells were grown in DMEM and harvested at the mid-exponential phase. Total RNA was extracted and hybridized with DNA probes corresponding to the first gene of the *bfp* operon, *bfpA*. The *bfpA* probe hybridized with a 0.6 kb band corresponding to the transcript of *bfpA* alone (Fig. 4a). Interestingly,

Fig. 4. Effect of *pst* on the expression of *bfpA* and BFP. (a) Northern-blot analysis of *bfpA*. RNA was extracted from mid-exponential-phase cultures of strains LRT9, GMF195 (LRT9 Δ pst), GMF201 (pGM2 in GMF195) and GMF247 (Δ pst *phoB*23) grown in DMEM and hybridized with a labelled *bfpA* DNA probe. Densitometric analyses of the *bfpA* band intensities normalized against the mRNA of *rpoD* are shown in the graphs. Each bar corresponds to the mean $\pm$ SE of five independent experiments, except for GMF247, which corresponds to the mean $\pm$ SE of three independent experiments. (b) Western-blot of BFP. Cells were grown as above and total protein extracts were assayed for BFP using a polyclonal anti-BFP serum. The bars represent the mean $\pm$ SE of densitometric analysis of four independent experiments. The pictures of the blots are of typical experiments. **, Significantly different from the parent strain LRT9 by Student's *t*-test ($P < 0.05$).

although the *bfp* operon is composed of 14 genes, bands corresponding to transcripts containing the distal genes of this operon could not be observed under normal conditions. Overexposed autoradiograms, however, revealed the presence of large bands (data not shown). The presence of a stem-loop structure [$\Delta G -16.9$ kcal mol⁻¹ (-70.7 kJ mol⁻¹)] in the intergenic region between *bfpA* and *bfpG*, might be acting as an mRNA stabilizer of the *bfpA* transcript or as a transcription terminator. This would explain why the mRNA of *bfpA* appears to be in excess in relation to the other cognate operon gene transcripts. The blot was rehybridized with a DNA probe corresponding to the housekeeping gene *rpoD* to normalize the RNA present in each sample. The densitometric analysis of the band intensities showed there was, on average, a twofold reduction in *bfpA* mRNA levels in the Δ pst mutant when compared to the wild-type strain, and that this reduced level of *bfpA* transcript was also observed in the Δ pst *phoB* double mutant (Fig. 4a). When the mutant was transformed with the low-copy plasmid pGM2 (*ppst*⁺), the level of *bfpA* mRNA was restored and even slightly increased, probably due to the presence of several copies of *pst*⁺. Similar results were observed when the production of the BFP protein was assessed by Western blotting (Fig. 4b). There was a 1.7-fold decrease in both Δ pst and Δ pst *phoB* relative to the wild-type strain, which was restored by complementation *in trans* with pGM2. The fact that the Δ pst *phoB* double mutant was not able to restore expression of BFP at both transcript and protein level suggests again that the constitutivity of PHO caused by the *pst* deletion is not responsible for the inhibition of *bfp* expression.

Fig. 5(a) shows that a DNA probe corresponding to *eae*, which encodes intimin, hybridized to a 3 kb band, as described by Gómez-Duarte & Kaper (1995), although minor bands of 2.8 and 5.2 kb, corresponding to *cesT-eae* and to the entire *tir-cesT-eae* operon were also observed. The blots were rehybridized with *rpoD* as above and the densitometric analysis of the band intensities showed there was a 2.5-fold reduction in the level of Δ pst *eae* mRNA. pGM2 (*ppst*⁺) restored the level of *eae* mRNA. The Western blot analysis of intimin revealed that the *pst* deletion caused a 1.5-fold decrease in intimin level (Fig. 5b). These results indicate that *pst* is required for the full expression of *bfpA* and *eae*, and consequently for the maximization of synthesis of BFP and intimin.

PerA and PerC are positive regulators of the *bfp* and LEE1 operons, respectively (Mellies *et al.*, 1999; Tobe *et al.*, 1996). LEE1 contains *ler*, which activates *eae*. *perA-perB-perC* form an operon on the pEAF plasmid. Several attempts to measure the effect of Δ pst on *per* expression through Northern-blot analysis failed, because no signal could be observed (data not shown). This suggests that *perA* is transcribed at a very low level, and its mRNA cannot be detected with a moderately sensitive technique, such as Northern hybridization.

Fig. 5. Effect of *pst* on the expression of *eae* and intimin. (a) Northern-blot analysis of *eae*. RNA was extracted from mid-exponential cultures of strains LRT9, GMF195 (LRT9 *Δpst*) and GMF201 (pGM2 in GMF195) grown in DMEM and hybridized with a labelled *eae* DNA probe. Densitometric analysis of the *eae* band intensities normalized against the mRNA of *rpoD* are shown in the graphs. Each bar corresponds to the mean ± SE of five independent experiments (b) Western blot of intimin. Cells were grown as above and total protein extracts were assayed for intimin using a monoclonal anti-intimin serum. The bars represent the mean ± SE of densitometric analysis of four independent experiments. The pictures of the blots are of typical experiments. **, Significantly different from the parent strain LRT9 by Student's *t*-test ($P < 0.05$).

To measure the effect of *Δpst* on *per* expression, a transcriptional fusion between the promoter of *perA* and *lacZ* was constructed (pGM17) and transformed into strains LRT9, GMF195 (LRT9 *Δpst*), GMF201 [GMF195 bearing pGM2 (*ppst*⁺)] and JPN15 (EPEC cured of pEAF) as a negative control. Because GMF247 (LRT9 *Δpst* *phoB*) is resistant to tetracycline, a spectinomycin-resistance cassette was introduced into pGM17, resulting in plasmid pGM29. This plasmid, which behaves very similarly to pGM17 (not shown), was transformed into GMF247. All transformants were grown overnight and resuspended in DMEM supplemented with 2 % FCS and 0.4 % glucose (to repress endogenous *β*-galactosidase expression) to an

OD₅₄₀ of 0.025, and grown for 9 h without agitation. Growth of all strains was similar; only strain JPN15 (EPEC cured of pEAF and negative control) showed a slightly higher growth rate (Fig. 6b). Samples were taken every hour and assayed for *β*-galactosidase activity (Fig. 6a). With the exception of JPN15, all strains displayed a gradual increase in *β*-galactosidase, which reached its peak at the height of the exponential phase (around 6 h), followed by a decrease until a new plateau was reached. At its highest point, the *β*-galactosidase activity of LRT9 was almost twice as high as that of the *Δpst* mutant and 2.5-fold above the *β*-galactosidase level of *Δpst* *phoB*. This demonstrates that the deleterious effect of *Δpst* on *per* expression cannot be alleviated by abolishing PHO constitutivity. Introduction of pGM2 (*ppst*⁺) into LRT9 *Δpst* led to a 70 % increase in the level of *β*-galactosidase compared to the wild-type strain, suggesting that *pst* has a positive role in the induction of the *per* operon. Since PerA is a positive regulator of *bfp*, *pst* is likely to affect *bfp* expression via *perA*. Analogously, an augmentation in PerC would positively affect the expression of *ler*, which in turn increases the transcription of *eae*. Therefore, the positive effect of *pst* on *eae* expression is likely to be through an increase in *perC* transcription.

Fig. 6. Effect of *Δpst* on *per* expression. Plasmid pGM17 (*perA-lacZ* fusion) was transformed into LRT9 (■), GMF195 (LRT9 *Δpst*) (▲), GMF201 (pGM2 in LRT9 *Δpst*) (▼), and JPN15 (pEAF-cured EPEC) (◆). GMF247 (*Δpst* *phoB23*) was transformed with plasmid pGM29 (○). Cells were grown in DMEM for 9 h. Samples were taken every hour and assayed for (a) *β*-galactosidase and (b) growth. Experiments were repeated three times, and typical results are presented.

The *pst* operon is partially induced in DMEM

Genes of the PHO regulon are activated by P_i -shortage. Under P_i -excess conditions, expression of Pst and other PHO genes is only basal (Wanner, 1996). We asked whether a low (basal) expression of Pst would be sufficient to affect the expression of the adhesins, or if under the growth conditions used in the adherence assay (DMEM) the actual level of Pst is increased. To answer this question, the activity of the *pst* promoter was measured under different growth conditions. Plasmid pBS11 (*pstS-cat* transcriptional fusion) was transformed into LRT9 and assayed for CAT and AP activity in bacteria grown exponentially in LB, medium A + P_i and DMEM alone or supplemented with FCS and 1 mM P_i . Table 3 shows that cells grown under P_i -limiting conditions (medium A – P_i) presented an 11-fold induction in the level of *pst* expression when compared to cells grown in medium A + P_i or in LB. In contrast, the CAT activity in DMEM + 2 % FCS (the medium used in the adherence assays) was only fivefold lower than under P_i -starvation conditions (medium A – P_i) and twofold higher than the activity of cells grown in other high- P_i media (medium A + P_i or LB). Addition of 1 mM P_i to DMEM did not significantly alter the level of *pst* expression, suggesting that the increased *pst* expression in DMEM is not due to a shortage of P_i . Likewise, addition of 10 % FCS had no effect on the ability of DMEM to increase *pst* transcription. These results suggest that one or more components of DMEM positively affect *pst* expression. This effect is specific to *pst* because the basal level of another PHO protein, AP, was not affected by DMEM. In conclusion, expression of *pst* under the growth conditions used in the adherence assay was significantly higher for P_i -replete media. The relatively high level of Pst is likely to contribute to its positive effect on the expression of EPEC adhesins.

DISCUSSION

EPEC is characterized by its pattern of localized (primary) and intimate adherence, which are its main virulence

Table 3. CAT and AP activities of strains carrying the *pst-cat* fusion in various growth media

Values represent the mean $\pm$ SE of at least three independent experiments. See Methods for units.

Growth medium	CAT activity	AP activity
LB	2.32 ($\pm$ 0.88)	0.01 ($\pm$ 0.01)
Medium A + P_i	1.98 ($\pm$ 0.5)	0.02 ($\pm$ 0.01)
Medium A – P_i	22.1 ($\pm$ 9.05)	2.29 ($\pm$ 0.71)
DMEM	8.06 ($\pm$ 3.46)*	0.001 ($\pm$ 0.001)
DMEM + 2 % FCS	4.3 ($\pm$ 0.3)*	0.01 ($\pm$ 0.01)
DMEM + 2 % FCS + P_i	5.58 ($\pm$ 2.08)*	0.001 ($\pm$ 0.001)
DMEM + 10 % FCS	4.38 ($\pm$ 1.29)*	0.01 ($\pm$ 0.001)

*Values that are statistically significantly different from medium A + P_i or LB according to Student's *t*-test, with $P < 0.05$.

factors, and by the lack of Shiga-like toxin. EPEC adheres to epithelial cells in a two-step fashion: the first step is dependent on BFP; followed by the intimate adherence which is dependent on intimin. Environmental factors contribute to the regulation of virulence-related genes in EPEC. For instance, a temperature of 37 °C, the presence of calcium ions and low ammonium concentrations are paramount to the development of the LA phenotype and to *bfp* transcription (Puente *et al.*, 1996). Also, *bfp* expression is growth phase dependent, being transcribed predominantly during the exponential phase. Similarly, the A/E phenotype is also dependent on temperature and growth phase (Rosenshine *et al.*, 1996).

Some PHO regulon genes, particularly the *pst* operon and *phoB*, have been shown to be involved in different aspects of the virulence of *E. coli* and other bacteria. Among pathogenic *E. coli*, point mutations in *phoU*, *pstC* and a *pst* deletion reduced the virulence of different extra-intestinal strains (Buckles *et al.*, 2006; Daigle *et al.*, 1995; Lamarche *et al.*, 2005). Insertions in the *pstS* gene of a porcine EPEC strain resulted in reduced attachment of the bacteria to piglet ileal explants (Batisson *et al.*, 2003). In *Shigella flexneri*, a *pst* mutant displayed a significant reduction in plaque formation, which was suppressed by a mutation in *phoB* and also by the introduction of a non-constitutive *pstA* mutation (Runyen-Janecky *et al.*, 2005). Restoration of normal levels of plaque formation by suppression of the PHO-constitutive phenotype implied that at least in this case, the constitutive expression of the PHO genes was the cause of the inhibition of *S. flexneri* virulence. On the other hand, it was suggested that the lack of a functional Pst in the avian pathogenic *E. coli* O78 reduced its virulence due to changes in cell surface composition (Lamarche *et al.*, 2005). However, in most cases, the exact mechanism through which *pst* enhances pathogenicity remains unclear.

In the present study, we showed that a complete deletion of *pst* caused a reduction in the ability of EPEC to adhere to epithelial cells *in vitro* and to display the LA phenotype. Moreover, the Pst system was required for the full expression of the adhesins BFP and intimin, and of the regulators encoded by the *per* operon. It was also shown that the *pst* operon itself is slightly induced under the conditions of the adherence assay. Unlike in *S. flexneri* (Runyen-Janecky *et al.*, 2005), the constitutivity of the PHO genes caused by Δ *pst* was not responsible for its deleterious effect on EPEC virulence, because introduction of a *phoB* mutation into LRT9 Δ *pst* eliminated PHO constitutivity, but did not restore bacterial adherence to its original levels. Furthermore, a *phoR* mutant, which also constitutively expresses the PHO genes, did not inhibit bacterial adherence. Also, a *pstS* polar mutant of LRT9 inhibited *bfp* expression to the same extent as Δ *pst*, but a non-polar mutation in *pstS* (which is also PHO-constitutive) had no effect on *bfp* (data not shown), confirming the lack of effect of PHO constitutivity on cell adherence.

LRT9 and its Δpst mutant displayed a similar growth rate in DMEM, indicating that the reduction in adherence was not due to a growth disadvantage of the Δpst mutant. Measurement of the intrinsic β -galactosidase activities of the wild-type and Δpst mutant showed that they were very similar. This experiment was important to show that the quantitative method employed to determine bacterial adherence (i.e. endogenous β -galactosidase activity) was not influenced by some unrelated variation in the β -galactosidase expression pattern caused by the pst mutation. Although less common than determining c.f.u. ml⁻¹, the use of β -galactosidase as a reporter of EPEC adherence has already been shown to be reliable and reproducible (Minami *et al.*, 1987). Here, we confirmed the reliability of this methodology using a different EPEC lineage (LRT9) and also by comparing the adherence levels obtained with the β -galactosidase assays with c.f.u. ml⁻¹ calculations of the wild-type and the Δpst mutant, and by microscopic examination of the adhered bacteria.

Northern-blot analysis of *bfp* and *eae*, Western blots of BFP and intimin, and the enzymic assays of the *perA-lacZ* fusion showed that *pst* plays a positive role in the expression of the *bfp*, *tir-cesT-eae* and *per* operons. Since PerA and PerC positively regulate *bfp* and *eae*, respectively (Tobe *et al.*, 1996; Mellies *et al.*, 1999), it seems plausible to suggest that the mechanism by which *pst* enhances transcription of these genes is via induction of *per*, whose products in turn upregulate *bfp* and *eae*.

A possible source of concern was the fact that the adherence assay was performed under conditions of P_i abundance and that the level of *pst* expression under these conditions would be too low to exert any significant effect. However, measurement of *pst* transcription level in DMEM showed that it was twofold higher than that observed for a high-P_i medium such as LB or medium A + P_i. This implies that in DMEM, expression of *pst* is higher than normal and more likely to have a broader effect, for instance as an adherence enhancer, as observed here. The possibility that some component of FCS, which supplements DMEM, is responsible for the increased expression of *pst* was ruled out, because the level of *pst* was even higher in non-supplemented DMEM. The nature of the *pst*-inducing factor in DMEM remains to be investigated.

It has recently been shown that a short RNA sequence in the intergenic region between *pstA* and *pstB* has a regulatory role in σ^S translation (Schurdell *et al.*, 2007). It is not known whether *rpoS* has any effect on EPEC adherence, but in enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC), *rpoS* activates the expression of LEE via DsrA (Laaberki *et al.*, 2006). It is possible that the regulatory region between *pstA* and *pstB* plays a role in *per* transcription via *rpoS* or through another mechanism. The *pstA-pstB* intergenic region of EPEC E2348/69 carries a deletion of 92 bp (from position 3247 to 3338 on the ECOPHOS sequence K01992), but the *rpoS* regulatory sequence (which comprises the 3352–3383 region) is intact in this strain.

At this stage, it is still unclear if the entire *pst* operon or just one of its genes is involved in the regulation of EPEC adherence. A polar *pstS* mutant presented a reduction in the adherence level similar to the one observed for Δpst , while a non-polar mutation in this gene did not affect the level of adherence (not shown). To test the involvement of individual *pst* genes in adherence, single *pst* mutations (polar and non-polar) should be isolated and tested.

In conclusion, this study adds to a number of reports showing that the *pst* operon participates in the mechanism of *E. coli* virulence. This function could not be previously anticipated judging from the main roles of Pst as a P_i transport system and as a negative regulator of PHO. However, it has been recently reported that Pst also plays a role in the regulation of RpoS (Schurdell *et al.*, 2007) and in the phenomenon of bacterial persistence (Li & Zhang, 2007). It is becoming evident that Pst has a broader regulatory impact as a global (though not principal) regulator of pathogenicity in different bacterial species and even as a more general regulator beyond its role in P_i metabolism.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). G. M. F. was supported by grant 02/08604-8 of FAPESP. The authors thank Roxane Maria Fontes Piazza (Instituto Butantan, São Paulo) for kindly supplying the antibodies against BFP and intimin, and Ezra Yagil for valuable comments.

REFERENCES

- Battison, I., Guimond, M., Girard, F., An, H., Zhu, C., Oswald, E., Fairbrother, J. M., Jacques, M. & Harel, J. (2003). Characterization of the novel factor Paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun* 71, 4516–4525.
- Bracha, M. & Yagil, E. (1973). A new type of alkaline phosphatase negative mutant in *Escherichia coli* K-12. *Mol Gen Genet* 122, 53–60.
- Buckles, E. L., Wang, X., Lockatell, C. V., Johnson, D. E. & Donnenberg, M. S. (2006). PhoU enhances the ability of extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 to colonize the murine urinary tract. *Microbiology* 152, 153–160.
- Carmany, D. O., Hollingsworth, K. & McCleary, W. R. (2003). Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR. *J Bacteriol* 185, 1112–1115.
- Chan, F. Y. & Torriani, A. (1996). PstB protein of the phosphate-specific transport system of *Escherichia coli* is an ATPase. *J Bacteriol* 178, 3974–3977.
- Churchward, G., Belin, D. & Nagamine, Y. (1984). A pSC101-derived plasmid which shows no sequence homology to other commonly used cloning vectors. *Gene* 31, 165–171.
- Cox, G. B., Webb, D., Godovac-Zimmermann, J. & Rosenberg, H. (1988). Arg-220 of the PstA protein is required for phosphate transport through the phosphate-specific transport system in *Escherichia coli* but not for alkaline phosphatase repression. *J Bacteriol* 170, 2283–2286.
- Cox, G. B., Webb, D. & Rosenberg, H. (1989). Specific amino acid residues in both the PstB and PstC proteins are required for

- phosphate transport by the *Escherichia coli* Pst system. *J Bacteriol* 171, 1531–1534.
- Cravioto, A., Gross, R. J., Scotland, S. M. & Rowe, B. (1979). An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* 3, 95–99.
- Daigle, F., Fairbrother, J. M. & Harel, J. (1995). Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Infect Immun* 63, 4924–4927.
- Donnenberg, M. S., Girón, J. A., Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (1992). A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol Microbiol* 6, 3427–3437.
- Echols, H., Garen, A., Garen, S. & Torriani, A. (1961). Genetic control of repression of alkaline phosphatase in *E. coli*. *J Mol Biol* 3, 425–438.
- Gober, J. W. & Shapiro, L. (1992). A developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3' enhancer and IHF binding elements. *Mol Biol Cell* 3, 913–926.
- Gómez-Duarte, O. G. & Kaper, J. B. (1995). A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 63, 1767–1776.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D. J., Frey, E. A. & Finlay, B. B. (1997). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91, 511–520.
- Kreuzer, K., Pratt, C. & Torriani, A. (1975). Genetic analysis of regulatory mutants of alkaline phosphatase of *E. coli*. *Genetics* 81, 459–468.
- Laaberki, M. H., Janabi, N., Oswald, E. & Repoila, F. (2006). Concert of regulators to switch on LEE expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7: interplay between Ler, GrlA, HNS and RpoS. *Int J Med Microbiol* 296, 197–210.
- Lamarche, M. G., Dozois, C. M., Daigle, F., Caza, M., Curtiss, R., 3rd, Dubreuil, J. D. & Harel, J. (2005). Inactivation of the *pst* system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. *Infect Immun* 73, 4138–4145.
- LeDeaux, J. R. & Grossman, A. D. (1995). Isolation and characterization of *kinC*, a gene that encodes a sensor kinase homologous to the sporulation sensor kinases KinA and KinB in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 177, 166–175.
- Levine, M. M., Nataro, J. P., Karch, H., Baldini, M. M., Kaper, J. B., Black, R. E., Clements, M. L. & O'Brien, A. D. (1985). The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J Infect Dis* 152, 550–559.
- Levinthal, C., Signer, E. & Fetherolf, K. (1962). Reactivation and hybridization of reduced alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 48, 1230–1237.
- Li, Y. & Zhang, Y. (2007). PhoU is a persistence switch involved in persister formation and tolerance to multiple antibiotics and stresses in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 51, 2092–2099.
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kimura, S., Nakata, A. & Ishihama, A. (1988). Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*. Activation of *pstS* transcription by PhoB protein *in vitro*. *J Mol Biol* 203, 85–95.
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kawamoto, T., Yamada, M. & Nakata, A. (1989). Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J Mol Biol* 210, 551–559.
- Mellies, J. L., Elliott, S. J., Sperandio, V., Donnenberg, M. S. & Kaper, J. B. (1999). The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol* 33, 296–306.
- Miller, J. H. (1992). *A Short Course in Bacterial Genetics: a Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Minami, J., Okabe, A. & Hayashi, H. (1987). Enzymic detection of adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells. *Microbiol Immunol* 31, 851–858.
- Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11, 142–201.
- Puente, J. L., Bieber, D., Ramer, S. W., Murray, W. & Schoolnik, G. K. (1996). The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol* 20, 87–100.
- Rosenshine, I., Ruschkowski, S. & Finlay, B. B. (1996). Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth phase, temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells. *Infect Immun* 64, 966–973.
- Runyen-Janecky, L. J., Boyle, A. M., Kizzee, A., Liefer, L. & Payne, S. M. (2005). Role of the Pst system in plaque formation by the intracellular pathogen *Shigella flexneri*. *Infect Immun* 73, 1404–1410.
- Scaletsky, I. C., Silva, M. L. & Trabulsi, L. R. (1984). Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun* 45, 534–536.
- Schurdell, M. S., Woodbury, G. M. & McCleary, W. R. (2007). Genetic evidence suggests that the intergenic region between *pstA* and *pstB* plays a role in the regulation of *rpoS* translation during phosphate limitation. *J Bacteriol* 189, 1150–1153.
- Shaw, W. V. (1975). Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods Enzymol* 43, 737–755.
- Spira, B., Silberstein, N. & Yagil, E. (1995). Guanosine 3',5'-bisphosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for P_i. *J Bacteriol* 177, 4053–4058.
- Spira, B. & Yagil, E. (1999). The integration host factor (IHF) affects the expression of the phosphate-binding protein and of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 38, 80–85.
- Steed, P. M. & Wanner, B. L. (1993). 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. *J Bacteriol* 175, 6797–6809.
- Stone, K. D., Zhang, H. Z., Carlson, L. K. & Donnenberg, M. S. (1996). A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. *Mol Microbiol* 20, 325–337.
- Taschner, N. P., Yagil, E. & Spira, B. (2004). A differential effect of σ^S on the expression of the PHO regulon genes of *Escherichia coli*. *Microbiology* 150, 2985–2992.
- Tobe, T., Schoolnik, G. K., Sohel, I., Bustamante, V. H. & Puente, J. L. (1996). Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 21, 963–975.
- von Krüger, W. M., Humphreys, S. & Ketley, J. M. (1999). A role for the PhoBR regulatory system homologue in the *Vibrio cholerae* phosphate-limitation response and intestinal colonization. *Microbiology* 145, 2463–2475.
- Wanner, B. (1996). Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. In *Escherichia coli and Salmonella. Cellular and*

G. M. Ferreira and B. Spira

Molecular Biology, pp. 1357–1381. Edited by F. C. Neidhardt & others. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Webb, D. C., Rosenberg, H. & Cox, G. B. (1992). Mutational analysis of the *Escherichia coli* phosphate-specific transport system, a member of the traffic ATPase (or ABC) family of membrane transporters. A role for proline residues in transmembrane helices. *J Biol Chem* **267**, 24661–24668.

Xiao, H., Kalman, M., Ikehara, K., Zemel, S., Glaser, G. & Cashel, M. (1991). Residual guanosine 3',5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J Biol Chem* **266**, 5980–5990.

Edited by: B. Kenny

Stability of the *pstS* transcript of *Escherichia coli*

Meire Agüena · Gerson Moura Ferreira · Beny Spira

Received: 30 April 2008 / Revised: 8 July 2008 / Accepted: 10 September 2008 / Published online: 27 September 2008
 © Springer-Verlag 2008

Abstract The *pst* operon of *Escherichia coli* is composed of five genes that encode a high-affinity phosphate transport system. As a member of the PHO regulon, *pst* transcription is activated under phosphate shortage conditions. Under phosphate-replete conditions, the *pst* operon also functions as a negative regulator of the PHO genes. Transcription of *pst* is initiated at the promoter located upstream to the first gene, *pstS*. Immediately after its synthesis, the primary transcript of *pst* is cleaved into shorter mRNA molecules. The transcription unit corresponding to *pstS* is significantly more abundant than the transcripts of the other *pst* genes due to stabilisation of *pstS* mRNA by a repetitive extragenic palindrome (REP) structure downstream to the *pstS* locus. The presence of the REP sequence also results in an increased level of PstS proteins. However, the surplus level of PstS proteins produced in the presence of REP does not contribute to the repressive role of Pst in PHO expression.

Keywords *pst* operon · PHO regulon · mRNA half-life

Introduction

Escherichia coli possesses two transport systems for orthophosphate (Pi), Pit and Pst. Pit is a low affinity and high-velocity Pi-transporter that consists of a single membranal

protein. It is encoded by the gene *pit* and it is synthesised constitutively. Pst is a typical ABC transport system composed of four different proteins: PstS, the periplasmic Pi-binding protein; PstC and PstA, integral membrane proteins that mediate the translocation of Pi through the inner membrane (Webb et al. 1992) and PstB that binds ATP and energises the transport (Chan and Torriani 1996). Pst is encoded by an operon of the same name (Fig. 1a), which besides the four genes encoding the transport system- *pstS*, *pstC*, *pstA* and *pstB*, contains a fifth distal gene- *phoU*, whose product does not play a role in Pi transport (Steed and Wanner 1993). The *pst* operon belongs to the PHO regulon and is induced in response to Pi-limitation. Transcription of the PHO genes is regulated by the two- component system PhoB/PhoR. PhoR is a membranal sensor kinase that autophosphorylates in response to external low-Pi concentration and phosphorylates PhoB (Wanner 1996). Phosphorylated PhoB binds to consensus sequences in the promoter regions of all PHO genes, the PHO-boxes, where it interacts with RNA polymerase associated with σ^{70} and initiates transcription of the PHO genes (Makino et al. 1993). Most mutations in any gene of the *pst* operon result in the constitutive expression of the PHO regulon even under Pi-excess conditions. Thus the Pst system and the PhoU protein act as negative regulators of PHO transcription, but the mechanism of this repression is still unclear. Apparently, in the presence of sufficient Pi, the Pst proteins interact with PhoR, which dephosphorylates PhoB shutting off transcription of the PHO regulon (Wanner 1996).

Transcription of the five *pst* genes is initiated at the promoter upstream of the first gene- *pstS*. This is a typical PHO promoter with a -10 region and two PHO-boxes. Because of its instability, the full-length transcript of *pst* could be detected only with an enhanced RT-PCR method (Agüena et al. 2002; Agüena and Spira 2003), while

Communicated by Jorge Membrillo-Hernández.

M. Agüena · G. M. Ferreira · B. Spira (✉)
 Departamento de Microbiologia,
 Instituto de Ciências Biomédicas,
 Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes,
 1374, São Paulo, SP CEP 05508-900, Brazil
 e-mail: benys@usp.br

Fig. 1 **a** Schematic representation of the *pst* operon. The -10 and PHO-boxes in the promoter region are shown. The stem-loops represent the putative REP structures between *pstS*-*pstC* and *pstA*-*pstB*. A black line with an asterisk just below *pstS* represents the DNA probe used in the northern-blots. **b** DNA sequence of the REP structure in the intergenic region between *pstS* and *pstC*

northern hybridisations revealed small *pst* transcripts ranging from 0.9 to 2.6 Kb (Aguena et al. 2002). The intergenic region between *pstS* and *pstC* contains a putative RNA stem-loop structure, which shares a 73% identity with the consensus of repetitive extragenic palindromes (REP) of type Y (Bachelier et al. 1996) (Fig. 1b). REP are highly repetitive sequences that in many cases stabilise the 3' end of mRNAs, increasing the expression of upstream genes (Newbury et al. 1987). Here we show that the REP structure downstream of *pstS* displays a low transcription termination activity and that it enhances stabilisation of the *pstS* transcript and consequently results in an increased production of PstS proteins.

Materials and methods

Bacterial strains and plasmids

These are listed in Table 1.

Growth conditions

LB is a rich medium (Miller 1992). Medium A is a semi-rich medium with a limiting concentration of Pi (Levinthal et al. 1962). When supplemented with 1 mM KH_2PO_4 it is designated medium A +Pi; when not supplemented, it is called medium A -Pi. For the northern-blot analyses cells were exponentially grown in medium A +Pi or in medium A -Pi (in the case of MG1655) and treated with rifampicin (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for up to 8 minutes. Samples were taken for RNA extraction every 2 min. For the CAT assays, exponentially-growing cells were resuspended in Medium A supplemented or not with Pi and grown until $^{540}\text{OD} \approx 0.7$. Cells were washed, disrupted by sonication and tested for alkaline phosphatase (AP) and chloramphenicol acetyl transferase (CAT) activities.

Construction of a non-polar *pstS* mutant

A kanamycin resistance gene obtained by digesting pUC-4 K with *EcoRI* was ligated to pBS16 (*pstS*⁺) previously digested with *MunI*, which cuts inside *pstS*, generating pGM7 (*pstS*::Km^R). pGM7 was linearised with *EcoRI* and the DNA fragment carrying *pstS*::Km^R was resolved by electrophoresis, isolated from the gel and transformed into KM32 as described (Murphy et al. 2000). The resulting *pstS*::Km mutant (GMF197) was tested for constitutive AP expression and for complementation with a *pstS*⁺ plasmid. Strain GMF198 was constructed by transducing the *pstS*::Km mutation from GMF197 (KM32 *pstS*::Km) to MG1655 using phage P1 (Miller 1992).

Plasmid construction

Plasmid pBS16 was constructed by ligating a 1480 bp PCR fragment amplified with primers *pst*⁺ (TCATCTTCGGCT ACTTTTCTC) and *pstC*⁻ (ATGCGGCGAGGACGA TGAAGG) and digested with *BclI* and *DraI* to plasmid pKK232-8 digested with *BamHI* and *SmaI*. To construct pMA6 and pMA9, a *pstS* PCR fragment amplified with primers *pst*⁺ (see above) and *pstS*1333 (GCCTGCAGTTT TATTAGTAC) was first cloned in pGEM T-easy generating plasmid pMA3. pMA3 was then digested with *EcoRI* and ligated to pKK232-8 or to pEU720 digested with the same enzyme resulting in plasmids pMA6 and pMA9, respectively. pMA10 was constructed by ligating a PCR fragment amplified with primers *pst*⁺ and *pstCpr*⁻ (ATTA TGTCGCCCTTTTACCC) with pGEM T-easy, which was subsequently digested with *EcoRI* and ligated to a *EcoRI*-digested pEU720.

Chloramphenicol acetyl transferase assay

Overnight cultures of MG1655 transformed with pBS16 and pMA6 were resuspended in medium A supplemented

Table 1 Bacterial strains and plasmids

Strain name	Relevant genotype	Source
BS7	MG1655 Δ <i>pst</i> ::Km ^R	(Aguena et al. 2002)
GMF197	KM32 <i>pstS</i> ::Km ^R	This study
GMF198	MG1655 <i>pstS</i> ::Km ^R	This study
KM32	Δ <i>recBCD</i> :: <i>P</i> <i>tac</i> - <i>gam</i> - <i>bet</i> - <i>exo cat</i>	(Murphy et al. 2000)
MG1655	Wild-type <i>E. coli</i>	(Xiao et al. 1991)
Plasmids		
pBS11	Truncated <i>pstS</i> (–REP) cloned in pKK232-8	(Taschner et al. 2006)
pBS16	<i>pstS</i> (+REP) cloned in pKK232-8	This study
PEU720	Single-copy vector	(Froehlich and Scott 1991)
pKK232-8	Cloning vector carrying a promoterless <i>cat</i> gene	Amersham Biosciences
pMA6	<i>pstS</i> (–REP) cloned in pKK232-8	This study
pMA9	<i>pstS</i> (–REP) cloned in pEU720	This study
pMA10	<i>pstS</i> (+REP) cloned in pEU720	This study
pUC4 K		Amersham Pharmacia

or not with 1 mM Pi and grown until the exponential phase. Cells were then washed and disrupted by sonication. The supernatants were used as the enzyme source for the CAT assays as described (Shaw 1975). Briefly, 0.4 mg/ml 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), 0.5 mM acetyl-CoA and 0.1 mM chloramphenicol were added to a cuvette containing the cell extract. CAT activity was determined by measuring the rate of increase in absorbance at 412 nm. The specific activity was calculated according to the formula: $\Delta 412 \text{ nm} \times 1,000 \times 13.6^{-1} \text{ mg protein}^{-1} \text{ min}^{-1}$. Protein concentration was measured by the method of Bradford (Bradford 1976).

Alkaline phosphatase assay

Alkaline phosphatase assays were performed as in (Spira and Ferenci 2008). Briefly, 0.1 ml of bacteria cultures was mixed with 0.9 ml of 1 mg/ml *p*-nitrophenyl-phosphate dissolved in 1 M Tris pH 8.0, samples were incubated at 37°C for 5–10 min and the reaction was stopped by adding 0.25 ml 1 M Na₂PO₄. Samples were briefly centrifuged and measured at 410 nm. AP activity is represented by $_{410}\text{A min}^{-1} \text{ }_{540}\text{OD}^{-1}$.

Isolation and separation of periplasmic proteins

Periplasmic proteins were isolated from cells growing exponentially in medium A supplemented or not with 1 mM Pi at 37°C. The $_{540}\text{OD}$ of the cultures was measured and equal amounts of cells were harvested, washed twice with 0.1 M Tris–HCl buffer pH 8.0, resuspended in the same buffer supplemented with 20% sucrose, 20 μg lysozyme and 2 mM EDTA and incubated for 1 h at 37°C; 1 mM K₂HPO₄ was added to the cells grown in medium A +Pi to avoid induction of the PHO regulon during the treat-

ment with lysozyme. Spheroplasts were precipitated by centrifugation and the supernatant containing the periplasmic proteins was collected. The periplasmic proteins were resolved by SDS-PAGE in a 12.5% polyacrylamide gel. After electrophoresis, the gel was stained with Coomassie Brilliant blue, dried and photographed.

RNA extraction and northern-blot analysis

RNA extraction was performed by the guanidinium one-step method (Chomczynski and Sacchi 1987). Culture aliquots were withdrawn and immediately centrifuged. The pellet was homogenised with an acidic phenol/guanidine thiocyanate solution and incubated at 60°C for 5 min. Chloroform was added and the samples were centrifuged. RNA was precipitated with isopropanol, washed with 70% ethanol and resuspended in formamide. Aliquots of 20 μg RNA were resolved by electrophoresis in a 1% agarose gel containing 7% formaldehyde as described (Sambrook and Russel 2001). RNA was then transferred to nylon-based membranes (GeneScreen, Perkin Elmer) and probed overnight with 10^6 – 10^7 cpm of radioactively-labelled *pstS* DNA fragments. Following hybridisation the membranes were washed and exposed to X-ray films.

Preparation of probes

A 608 bp PCR fragment corresponding to the 5' end of *pstS* (Fig. 1a) was amplified using primers *pstS*+ (5'-CTTCCC TGCGCCGGTGTATGC) and *pstS*– (5'-TCAGCGGAG ATCAGTTTGGTGT). The resulting PCR product was used as a template for the preparation of the *pstS* DNA probe by the random-primer labelling method essentially as described (Sambrook and Russel 2001).

Calculation of *pstS* mRNA half-life

The densitometric analysis of the band intensities on the autoradiograms was performed with the help of the software ImageJ (available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). To calculate the half-life of *pstS* mRNA the following formulae were used:

$S = S_0 \times e^{-kt}$ and $T_H = \ln 2/k$; where S is the intensity of the last visible signal, S_0 is the intensity of the band at time 0 min, k is the rate of *pstS* mRNA decay, t represents the time between 0 min and the the last visible signal and T_H is the half-life of *pstS* mRNA.

Results

The secondary structure downstream of *pstS* displays transcription termination activity

The main transcript of the *pst* operon is the product of the most proximal gene *pstS* (Aguena et al. 2002). The relative abundance of *pstS* mRNA may be related to the presence of an RNA stem-loop structure in the intergenic region between *pstS* and *pstC*. To test this if this structure have a transcription termination activity, a DNA fragment containing the entire *pstS* gene, including the downstream sequence and another fragment containing *pstS* truncated in its 3' end were cloned in pKK232-8, generating plasmids pBS16 and pBS11, respectively. pKK232-8 carries a promoterless *cat* gene, which reports the activity of the *pstS* promoter cloned in the polylinker. Both plasmids were introduced into the wild-type strain MG1655. To test the CAT activity of the transformants, exponentially-growing cells were resuspended in Medium A –Pi and grown until they entered the Pi-starvation phase. The starvation status was monitored by measuring the AP activity of the cultures (not shown). The transformant bearing pBS16 (*pstS* +REP) displayed in average 15% less CAT activity than the strain carrying pBS11 (*pstS* –REP) (3.04 ± 0.07 against 3.54 ± 0.01 CAT units/mg protein). This difference is statistically significant with $P < 0.01$ by the t student's test, suggesting that the secondary structure downstream of *pstS* exerts a weak, though consistent transcription termination activity. The level of transcription termination activity due to the secondary structure, however, is not sufficient to account for the excess of *pstS* mRNA compared to cognate transcripts of the operon. Therefore, the sequence downstream of *pstS* probably has an additional function.

The REP sequence stabilises *pstS* mRNA

REP structures are known stabilisers of mRNA sequences located immediately upstream by obstructing the 3' → 5'

activity of exoribonucleases (Higgins et al. 1992). A putative secondary structure (73% identity with the REP consensus) is present in the intergenic region between *pstS* and *pstC* (Bachelier et al. 1996) (Fig. 1). We therefore, tested the ability of this sequence to stabilise the mRNA of *pstS*. Northern-blot analyses of rifampicin-treated Δ *pst* mutants transformed with plasmids pBS16 (*pstS* +REP) or pMA6 (*pstS* –REP) were conducted. Plasmid pMA6 carries the entire *pstS* locus lacking only the downstream REP sequence. Cells were grown in Medium A +Pi up to the mid-exponential phase and treated with rifampicin for several time intervals. In a Δ *pst* background, *pstS* as well as all other PHO genes are expressed constitutively; hence it was not necessary to grow cells in a Pi-limited medium to induce *pstS*. RNA was extracted and probed for *pstS*. A distinct *pstS* mRNA signal of 1 kb was observed in both transformants, but pMA6 *pstS* mRNA was fainter and degraded faster (compare Fig. 2a with b). The calculated half-life of the *pstS* +REP transcript was 1.3 min, while that of *pstS* –REP was 0.6 min. These results suggest that the REP secondary structure helps stabilising the *pstS* transcript. The same result was obtained with plasmid pBS11 (*pstS* truncated at its 3' end), which also presented a *pstS* mRNA half-life of 0.6 min (not shown).

The half-life of *pstS* transcript

It has been reported that the half-life of *Bacillus subtilis* *pstS* transcript is 11 min (Allenby et al. 2004). These authors conducted northern-blot analyses with different *pst* probes and observed a 4.4 Kb band corresponding to the primary transcript of *B. subtilis* *pst*. This contrasts with *E. coli*, whose *pst* mRNA could be observed only when a modified RT-PCR technique was employed (Aguena and Spira 2003), suggesting that the *pst* transcript of *B. subtilis* is more stable than that of *E. coli*. To compare the half-life of *pstS* mRNA in *E. coli* and in *B. subtilis*, total RNA was extracted from a wild-type strain (MG1655) grown under Pi-limitation treated with rifampicin as above and probed for *pstS* (Fig. 2c). The calculated half-life of MG1655 *pstS* mRNA was 1.8 min, slightly higher than that of the pBS16 (*pstS* +REP) transformant. This result confirms that the *pstS* transcript of *E. coli* has a low half-life and is considerably less stable than that of *B. subtilis*.

PstS protein level is enhanced by REP

To test if the increased stability of *pstS* mRNA provided by REP results in an augment in the level of PstS proteins, the periplasmic content of the Δ *pst* mutant carrying pBS16 (*pstS* +REP) or pMA6 (*pstS* –REP) was analysed. Periplasmic proteins extracted from Pi-starved and non-starved cells were resolved by SDS-PAGE (Fig. 3). As controls, the

Fig. 2 Effect of REP on the half-life of *pstS* mRNA. **a** BS7 (MG1655 Δpst) transformed with pBS16 (*pstS* +REP) was grown in medium A +Pi up to the exponential phase and at time 0 rifampicin (500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added. Samples were taken for RNA extraction at 0, 2, 4, 6 and 8 min following rifampicin addition and hybridised with a *pstS* probe; **b** Δpst transformed with pMA6 (*pstS* -REP) grown and probed as above; **c** MG1655 cells were grown in medium A -Pi until they entered the Pi-starvation phase and treated with rifampicin as above. The 23S rRNA bands stained with ethidium bromide are shown below each blot

periplasmic proteins of MG1655 and of the non-transformed Δpst mutant were also examined. A 34 KDa band corresponding to the expected molecular weight of PstS was observed. This protein was induced by Pi-limitation and was much stronger in the transformants carrying the multicopy plasmids pBS16 and pMA6 than in MG1655, which carries a single copy of the *pstS* gene. A faint band of

Fig. 3 Effect of REP on the level of PstS protein. Periplasmic proteins of cells grown in medium A +Pi or medium A -Pi were resolved by SDS-PAGE. The position of the molecular weight markers are shown on the left and an arrow on the right side points to the band corresponding to PstS. The gel presented here is representative of several independent experiments. (+), cells grown in medium A +Pi; (-), cells grown in medium A -Pi. Columns 1–2, Δpst transformed with pMA6 (*pstS* -REP); 3–4, Δpst transformed with pBS16 (*pstS* +REP); 5–6, MG1655; 7–8, Δpst

similar size can be observed in the lane corresponding to Δpst , which was not induced by Pi-limitation and therefore does not correspond to PstS. The intensity of the PstS band was considerably stronger in pBS16 (*pstS* +REP) than in pMA6 (*pstS* -REP) indicating that REP enhances the level of PstS proteins.

The presence of REP does not add to the repressive function of PstS

Most mutations in the *pst* operon lead to the constitutive expression of all PHO genes (Wanner 1996). This observation is at the basis of the notion that under Pi-excess conditions, Pst has a repressive role in the control of PHO expression. To test if the excess PstS conferred by REP is needed to fully repress PHO expression under Pi-excess, we measured the AP activity of a *pstS* constitutive mutant complemented *in trans* with *pstS* $\pm$ REP. Plasmids pBS16 (*pstS* +REP) and pMA6 (*pstS* -REP) were transformed into strain GMF198 and assayed for AP activity. GMF198 carries a non-polar insertion of a Km^R cassette in *pstS* ORF, which results in a PHO constitutive mutation. Figure 4 shows that GMF198 displayed high AP activity under Pi-excess that was thoroughly complemented by both plasmids, suggesting that the level of PstS produced either in the presence or in the absence of REP was sufficiently high to repress *phoA* transcription. However, pBS16 and pMA6 bear a pBR322 origin of replication, which results in 15–20 plasmid copies per cell. Because of its relatively high copy number, pMA6 is likely to produce enough PstS proteins to complement the mutation even in the absence of REP. It was therefore necessary to use single copies of *pstS* $\pm$ REP to complement the mutation. DNA fragments containing *pstS* -REP and *pstS* +REP were cloned in the single-copy vector pEU720 (Froehlich and Scott 1991) generating

Fig. 4 Complementation *in trans* of a *pstS* mutation by *pstS* ±REP. Cultures of MG1655, GMF198 (MG1655 *pstS*::Km^R) and GMF198 carrying pBS16 (*pstS* +REP cloned in pKK232-8), pMA6 (*pstS* –REP cloned in pKK232-8), pMA9 (*pstS* –REP cloned in pEU720) and

pMA10 (*pstS* +REP cloned in pEU720) were grown overnight in LB medium and assayed for AP activity. Bars represent the mean ± SE of three independent experiments

plasmids pMA9 and pMA10, respectively. The plasmids were transformed into GMF198 and the transformants were assayed for AP activity. Both plasmids complemented the *pstS* mutation by strongly reducing the AP level of GMF198. This result indicates that even though REP stabilises the message of *pstS* and increases its protein level, the level of PstS produced in the absence of REP is sufficient to maintain PHO repressibility.

Discussion

The Pst system is a typical ABC transporter and as such, the number of binding proteins (PstS) in the periplasm exceeds the number of the cognate membrane components (Boos and Lucht 1996). In most ABC-transport systems hitherto analysed, the gene encoding the binding protein is at the first locus of the operon. Similarly to other ABC systems, such as the *malEFG* and *araFGH* operons of *E. coli* and the *troABCD* operon of *T. pallidum*, the presence of REP elements is crucial to stabilise the message of the binding protein (Horazdovsky and Hogg 1987; Newbury et al. 1987; Hardham et al. 1997).

The REP-Y sequence downstream of *pstS* was originally proposed to be a Rho-independent transcription terminator (Magota et al. 1984; Amemura et al. 1985). Here we show that the *pstS* REP sequence displayed indeed a low transcription termination activity, similarly to other genes whose REP sequences also behave as mild transcription attenuators (Espéli et al. 2001). However, most of the positive effect of REP on *pstS* mRNA abundance is mainly due to its stabilising effect.

The average half-life of *E. coli* mRNAs is around 6–7 min (Mohanty and Kushner 1999; Bernstein et al. 2002; Selinger et al. 2003). Bernstein et al. (2002) (Table 5 in Electronic supplementary material) has found that the half

life of *pstS* mRNA in cells growing in M9 medium (Pi-excess) is 4.5 min. The half-life of *pstS* measured in the present study was below two minutes. Differences in strain (MG1655 versus NCM3416), methodology (northern-blot versus microarray) or growth conditions (medium A versus M9 medium) may explain the discrepancy between ours and Bernstein et al. (2002) measurements. Unfortunately, the northern-blot technique cannot be employed to measure the half-life of *pstS* mRNA in a wild-type strain under Pi-excess because under these conditions the signal of *pstS* is too faint to be quantified (Aguena et al. 2002) and data not shown). Interestingly, even though the half-life of the *pstS* transcript found by Bernstein et al. (2002) was more than twofold higher than the one measured here, it is still below the average of *E. coli* transcript half-lives, indicating that *pstS* is among the less stable transcripts of *E. coli*. The half-life of *pstS* mRNA generated from the chromosome was slightly higher than the one transcribed from plasmid pBS16 (*pstS* +REP) perhaps due to the Pi-limiting conditions used in the assessment of *pstS* transcript stability from the chromosomal copy.

Even in the absence of REP, the level of PstS proteins in the periplasm is sufficiently high to complement a *pstS* mutation and to restore PHO repression under Pi-excess. Hoffer et al. (2001) reported that an intact PstS protein is not required for PHO repression. They came to this conclusion because the AP constitutivity of a *pstS* mutant was complemented by overexpressing the Pit transport system. Therefore, PHO constitutivity in that *pstS* mutant was caused by the lack of Pi transport and/or by the resultant low internal Pi concentration. According to this hypothesis, an increase in *pstS* expression (by stabilisation of its mRNA) is not likely to have an impact on PHO repression. Nevertheless, an augment in the stabilisation of *pstS* mRNA increases the concentration of the binding protein in the periplasm and would have a positive impact in Pi-uptake up to a saturation point.

The half-life of *B. subtilis* *pst* operon and *pstS* transcripts is 1 and 11 min, respectively (Allenby et al. 2004). These authors performed northern-blots with rifampicin-treated cultures, as done in the present study to measure the mRNA half-lives. The average half-life of *B. subtilis* mRNAs is similar to that of *E. coli* (6–7 min); and even though the half-life of *B. subtilis* *pst* primary transcript is only 1 minute, it is still considerably more stable than that of *E. coli* (Aguena et al. 2002). Also, *pstS* mRNA is sixfold more stable in *E. coli* than in *B. subtilis*. Given the similar half-lives in most *E. coli* and *B. subtilis* mRNAs and the fact that Pst represents the only high-affinity Pi transport system in both bacteria species, it is interesting to speculate why *pst* mRNA is more stable in *B. subtilis* than in *E. coli*. One explanation might be related to the fact that the *pst* operon of *B. subtilis* lacks *phoU* and is not involved in PHO regulation (Allenby et al. 2004), while the *pst* operon of *E. coli* represses PHO expression in Pi-replete media. Another important difference between these two bacteria species is that the gram-positive *B. subtilis* requires more Pi than *E. coli*, which is used to build teichoic acid that is a key component of its cell wall (Ellwood and Tempest 1972). Therefore, a stable *pst* mRNA in *B. subtilis* would increase the level of the Pst system and consequently increment Pi-uptake.

Acknowledgments This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). Meire Aguena and Gerson M. Ferreira were recipients of FAPESP scholarships 02/04070-9 and 02/08604-8, respectively. We thank Ezra Yagil, June Scott and Kenneth Murphy for strains and plasmids.

References

- Aguena M, Spira B (2003) RT-PCR of long prokaryotic operon transcripts without DNase treatment. *J Microbiol Methods* 55:419–423
- Aguena M, Yagil E, Spira B (2002) Transcriptional analysis of the *pst* operon of *Escherichia coli*. *Mol Genet Genomics* 268:518–524
- Allenby NEE, O'Connor N, Prágai Z, Carter NM, Miethke M, Engelmann S, Hecker M, Wipat A, Ward AC, Harwood CR (2004) Post-transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* *pst* operon encoding a phosphate-specific ABC transporter. *Microbiology* 150:2619–2628
- Amemura M, Makino K, Shinagawa H, Kobayashi A, Nakata A (1985) Nucleotide sequence of the genes involved in phosphate transport and regulation of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 184:241–250
- Bachelier S, Gilson E, Hofnung M, Hill C (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. In: Neidhardt FC, Curtiss R, Ingraham JL (eds) ASM Press, Washington DC, pp 2012–2040
- Bernstein J, Khodursky A, Lin P, Lin-Chao S, Cohen S (2002) Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:9697–9702
- Boos W, Lucht J (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology. In: Neidhardt FC, Curtiss R, Ingraham JL (eds) ASM Press, Washington DC, pp 1175–1209
- Bradford M (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Chan FY, Torriani A (1996) PstB protein of the phosphate-specific transport system of *Escherichia coli* is an ATPase. *J Bacteriol* 178:3974–3977
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159
- Ellwood D, Tempest D (1972) Effects of environment on bacterial wall content and composition. *Adv Microbiol Physiol* 7:83–117
- Espéli O, Moulin L, Boccard F (2001) Transcription attenuation associated with bacterial repetitive extragenic BIME elements. *J Mol Biol* 314:375–386
- Fröhlich BJ, Scott JR (1991) A single-copy promoter-cloning vector for use in *Escherichia coli*. *Gene* 108:99–101
- Hardham JM, Stamm LV, Porcella SF, Frye JG, Barnes NY, Howell JK, Mueller SL, Radolf JD, Weinstock GM, Norris SJ (1997) Identification and transcriptional analysis of a *Treponema pallidum* operon encoding a putative ABC transport system, an iron-activated repressor protein homolog, and a glycolytic pathway enzyme homolog. *Gene* 197:47–64
- Higgins CF, Peltz SW, Jacobson A (1992) Turnover of mRNA in prokaryotes and lower eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* 2:739–747
- Hoffer SM, Schoondermark P, van Veen HW, Tommassen J (2001) Activation by gene amplification of *pitB*, encoding a third phosphate transporter of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 183:4659–4663
- Horazdovsky BF, Hogg RW (1987) High-affinity L-arabinose transport operon. Gene product expression and mRNAs. *J Mol Biol* 197:27–35
- Levinthal C, Signer E, Fetherolf K (1962) Reactivation and hybridization of reduced alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 48:1230–1237
- Magota K, Otsuji N, Miki T, Horiuchi T, Tsunasawa S, Kondo J, Sakiyama F, Amemura M, Morita T, Shinagawa H (1984) Nucleotide sequence of the *phoS* gene, the structural gene for the phosphate-binding protein of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 157:909–917
- Makino K, Amemura M, Kim SK, Nakata A, Shinagawa H (1993) Role of the sigma 70 subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 7:149–160
- Miller J (1992) A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Mohanty BK, Kushner SR (1999) Analysis of the function of *Escherichia coli* poly(A) polymerase I in RNA metabolism. *Mol Microbiol* 34:1094–1108
- Murphy KC, Campellone KG, Poteete AR (2000) PCR-mediated gene replacement in *Escherichia coli*. *Gene* 246:321–330
- Newbury SF, Smith NH, Higgins CF (1987) Differential mRNA stability controls relative gene expression within a polycistronic operon. *Cell* 51:1131–1143
- Sambrook J, Russell D (2001) Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- Selinger DW, Saxena RM, Cheung KJ, Church GM, Rosenow C (2003) Global RNA half-life analysis in *Escherichia coli* reveals positional patterns of transcript degradation. *Genome Res* 13:216–223
- Shaw WV (1975) Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods Enzymol* 43:737–755
- Spira B, Ferenci T (2008) Alkaline phosphatase as a reporter of sigma(S) levels and *rpoS* polymorphisms in different *E. coli* strains. *Arch Microbiol* 189:43–47

- Steed PM, Wanner BL (1993) 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. *J Bacteriol* 175:6797–6809
- Taschner NP, Yagil E, Spira B (2006) The effect of IHF on sigmaS selectivity of the *phoA* and *pst* promoters of *Escherichia coli*. *Arch Microbiol* 185:234–237
- Wanner, B (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. In: Neidhardt FC, Curtiss R, Ingraham JL (eds) ASM Press, Washinton DC, pp 1357–1381
- Webb DC, Rosenberg H, Cox GB (1992) Mutational analysis of the *Escherichia coli* phosphate-specific transport system, a member of the traffic ATPase (or ABC) family of membrane transporters. A role for proline residues in transmembrane helices. *J Biol Chem* 267:24661–24668
- Xiao H, Kalman M, Ikehara K, Zemel S, Glaser G, Cashel M (1991) Residual guanosine 3', 5'-bispyrophosphate synthetic activity of *relA* null mutants can be eliminated by *spoT* null mutations. *J Biol Chem* 266:5980–5990