HELOISA FILUS GALBIATI

**“CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE
Escherichia coli CONTENDO DIFERENTES
ALELOS *rpoS*”**

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

São Paulo
2011

HELOISA FILUS GALBIATI

**“CARACTERIZAÇÃO DE CEPAS DE
Escherichia coli CONTENDO DIFERENTES
ALELOS *rpoS*”**

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

Área de concentração: Microbiologia

Orientador: Prof. Dr. Beny Spira

Versão Original

São Paulo
2011

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

© reprodução total

Galbiati, Heloisa Filus.

Caracterização de cepas de *Escherichia coli* contendo diferentes alelos rpos / Heloisa Filus Galbiati. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Beny Spira.

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

Versão do título para o inglês: Characterization of *Escherichia coli* strains carrying different rpos alleles.

Descritores: 1. RNA polimerase 2. Fator sigma 3. RpoSam 4. Regulon PHO I. Spira, Beny II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

ICB/SBIB0101/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Heloisa Filus Galbiati.

Título da Dissertação: Caracterização de cepas de *Escherichia coli* contendo
diferentes alelos rpos.

Orientador(a): Beny Spira.

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

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (11) 3091-7733 - telefax : (55) (11) 3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

Comissão de Ética em Pesquisa

CERTIFICADO DE ISENÇÃO

Certificamos que o Protocolo CEP-ICB Nº 319/09, referente ao projeto intitulado: "*Caracterização do efeito positivo de rpoSam sobre genes do regulon PHO de Escherichia coli*" sob a responsabilidade de **Heloisa Filus Galbiati**, foi analisado na presente data pela CEEA - COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL e pela CEPsh - 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, 30 de junho de 2009.

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

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

Aos meus pais e meu irmão. Apesar de pequeno o gesto, que esta dedicação represente um pouco da gratidão que tenho por todo apoio e amor que vocês sempre me deram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família pelo carinho e apoio ao longo destes anos em que estive fora. Pelos momentos em que mesmo sem entender o que tanto precisava fazer no laboratório ao invés de visitá-los com mais frequência, deram todo apoio e acreditaram em mim. Obrigada por tudo, amo vocês!

Gostaria de agradecer ao Dr. Beny Spira pela oportunidade incrível da pesquisa. Pela paciência, ensinamentos, discussões e todas as outras coisas que me proporcionaram um grande crescimento no tempo em que estive aqui.

Aos amigos de laboratório pela companhia ao longo destes anos. Luiz (tubbie!) sempre tão prestativo pra tudo e sempre fazendo palhaçadas pra alegrar os meus dias frustrantes e cheios de resultados errados. Fernanda, com inteligência desproporcional ao seu pequeno tamanho, que sempre esteve ali para esclarecer dúvidas e me dar força em todos os momentos. Não posso me esquecer do Gerson, que foi a primeira pessoa que esteve ao meu lado compartilhando seu grande conhecimento. Assim como gostaria de agradecer aos estagiários, Gabriela, Henrique e Fábio por todos os momentos no laboratório.

Também não posso me esquecer dos amigos do Dr. René (que são muitos pra citar), por todos os almoços divertidos no “bandejão”, discussões de projetos, resultados, churrascos e festas. Um agradecimento especial ao trio André, Bianca e Diana, por todos os grandes momentos de amizade dentro e fora do laboratório. E a todos os outros amigos espalhados por este enorme corredor da Microbiologia (Talyta de modo especial).

Aos meus amigos de fora da USP:

As meninas que moraram comigo na pensão (que são muitas pra citar) e no apartamento (Belisa e Lilian), assim como as que moram comigo na “República do Sul”, Ro e Si (incluindo as queridas agregadas Bi e Fran). Aos meus amigos do Paraná Diogo e Vinicius, pela força que deram para que eu pudesse estar aqui hoje com eles.

A todos os meus amigos de Maringá, que apesar da distância provaram que são amigos de verdade e nunca deixaram de estar ao meu lado.

E é claro, um agradecimento mais do que especial vai para o Rodrigo, meu “bonitinho da parasito”. Obrigada por ter aparecido nos circulares, fila de bandeirão,

escada do Icb e todos os outros lugares bizarros e inesperados que fizeram nossas vidas se cruzarem cada dia mais até você entrar nela de vez.

Por fim agradeço a todos os funcionários da limpeza, portaria, biblioteca, pessoal da secretaria do Icb e a todos que me ajudaram de alguma forma. Também ao financiamento concedido pela CAPES, que foi indispensável para que eu pudesse realizar este trabalho.

RESUMO

Galbiati HF. Caracterização de cepas de *Escherichia coli* contendo diferentes alelos *rpoS*. [dissertação (Mestrado em Microbiologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

A bactéria *Escherichia coli* é encontrada em diversos habitats e deve estar preparada para sobreviver e crescer em condições desfavoráveis. A adaptação da bactéria a diferentes condições obriga-a a controlar a expressão de genes de forma eficiente. Uma das formas primárias de controle de expressão gênica é a competição entre os diversos fatores sigma pela ligação ao cerne da RNA polimerase. σ^{70} é o fator sigma mais abundante e participa da transcrição da maioria dos genes de *E. coli*, enquanto que σ^S é o segundo em importância e reconhece promotores de genes relacionados à resposta geral ao estresse. O gene *rpoS*, que codifica para σ^S é altamente polimórfico, e adquire mutações frequentemente. A mutação pontual C→T na posição 97 da ORF de *rpoS*, resulta em um códon de parada TAG (âmbar). Um *Shine-Dalgarno* alternativo e um códon de início de tradução na posição 157 dá início a uma proteína RpoS truncada, que é parcialmente funcional. Uma das situações de estresse na qual σ^S é ativado corresponde à privação de fosfato inorgânico. Porém, na limitação deste nutriente ocorre também a ativação do regulon PHO, cujos genes são predominantemente transcritos por σ^{70} . Neste trabalho, o efeito da versão truncada de RpoS sobre a expressão de genes dependentes de σ^{70} (*lacZ*, *phoA* e *pstS*) e de genes dependentes de σ^S (*osmY* e *proU*) foi testado. Foram também realizados ensaios de estresse oxidativo, osmótico e pelo frio. O perfil de atividade parcial descrito para RpoSam pôde ser observado em alguns casos, porém em outros o comportamento deste alelo se assemelhou ao do mutante *rpoS* nulo. Paralelamente, foi testada também uma cepa de *E. coli* que carrega a mutação âmbar em *rpoS*, mas esta é suprimida, resultando na expressão de uma proteína RpoS normal. A proteína RpoS truncada não pôde ser visualizada em *immunoblots*, provavelmente porque esta é traduzida de forma pouco eficiente a partir do *Shine-Dalgarno* alternativo. Com o objetivo de incrementar a detecção de RpoS em ensaios de imuno-detecção, foi inserida por recombinação alélica uma etiqueta SPA altamente imunogênica na porção C-terminal da proteína.

Palavras chave: RNA polimerase. Fator sigma. RpoSam. Regulon PHO.

ABSTRACT

Galbiati HF. Characterization of *Escherichia coli* strains carrying different *rpos* alleles. [Masters thesis (Microbiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Escherichia coli can be found in many different habitats and has to be prepared to survive and grow under unfavorable conditions. Bacteria adaptation to different growth conditions requires an efficient control of gene expression. One of the primary forms of gene expression control is the competition between different sigma factors for the binding to the core RNA polymerase. σ^{70} is the most abundant sigma factor and participates in the transcription of most *E. coli* genes. σ^S is the second one in importance and recognizes promoters of genes related to the general stress response. The *rpoS* gene, which encodes σ^S , is highly polymorphic and acquires mutations very often. The transition C→T at position 97 in the *rpoS* ORF results in a stop codon TAG (amber). Due to the presence of an alternative Shine-Dalgarno and a translation initiation codon at position 157 a truncated RpoS protein that is partially functional is translated. One of the stress situations that σ^S is activated is the starvation for inorganic phosphate. Phosphate limitation also triggers the activation of the PHO regulon, whose genes are predominantly transcribed by σ^{70} . In the present study, the effect of the truncated version of RpoS on the expression of σ^{70} dependent genes (*lacZ*, *phoA* e *pstS*) and σ^S dependent genes (*osmY* e *proU*) was tested. Bacteria were also assayed for sensitivity to oxidative, osmotic and cold stress. The profile of partial activity described for the truncated RpoS could be observed in some cases, while in others the behavior of this allele resembled the *rpoS* null mutant. In parallel, an *E. coli* strain which suppresses the amber mutation in RpoS, resulting in the expression of a normal protein was also tested. A band corresponding to the truncated RpoS could not be detected in immunoblots probably due to inefficient translation from the alternative Shine-Dalgarno. To improve the detection of RpoS, a highly immunogenic SPA tag was inserted in the C-terminal region of the protein.

Keywords: RNA polymerase. Sigma factor. RpoSam. Regulon PHO.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acetil-CoA – Acetil coenzima A
BSA – bovine serum albumine
CAT – cloranfenicol acetil transferase
DNA – ácido desoxiribonucleico
DO – densidade ótica
DTNB - 5,5´ditiobis-2 nitrobenzoic acid
E σ – holoenzima associada ao fator sigma
FA – fosfatase alcalina
GASP – growth advantage in stationary phase
H-NS - heat-stable nucleoid-structuring protein
IHF – integration host factor
Lrp – proteína reguladora de leucina
mRNA – RNA mensageiro
ORF – open reading frame
PCR – polymerase chain reaction
ppGpp – guanosina tetra-fosfato
RNA – ácido ribonucleico
RNAP – RNA polimerase
*rpo*Sam – mutante *rpo*S âmbar
SDS – sodium dodecyl sulphate
SPANC - self-preservation and nutritional competence
Pi – fosfato inorgânico
p-NPP – p-nitrofenil-fosfato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 RNA Polimerase e fatores sigma	15
1.1.1 O fator σ^S	16
1.1.2 Regulação da expressão de σ^S	17
1.1.3 σ^S e σ^D : Competição pelo cerne da RNAP e caracterização das regiões promotoras	19
1.1.4 Genes transcritos por $E\sigma^S$	21
1.2 Polimorfismo de <i>rpoS</i>	22
1.3 Regulon PHO	24
1.4 A relação entre o regulon PHO e σ^S	28
2 OBJETIVOS	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Meios de cultura	32
3.2 Bactérias e plasmídios	33
3.3 Construção de MG1655 <i>rpoS</i> ^{Sam} e C600 <i>rpoS</i> ¹⁶⁵⁵	35
3.4 Sequenciamento dos transductantes	36
3.5 Construção de bactérias contendo a fusão cromossomal <i>osmY-lacZ</i>	36
3.6 Preparação do lisado de fagos P1	37
3.7 Transdução	37
3.8 Inserção da etiqueta SPA em <i>rpoS</i>	37
3.9 Western-blot	38
3.10 Ensaio Enzimáticos	39
3.10.1 Fosfatase Alcalina	39

3.10.2 β -galactosidase	39
3.10.3 Ensaio de Cloranfenicol Acetil Transferase (CAT)	39
3.11 Ensaio de estresse	40
3.12 Análise Estatística	41
4 RESULTADOS	42
4.1 O efeito de <i>rpoSam</i> sobre a expressão de genes dependentes de σ^D	42
4.1.1 O efeito de <i>rpoSam</i> sobre a expressão da Fosfatase Alcalina	42
4.1.2 O efeito de <i>rpoSam</i> sobre a expressão de <i>lacZ</i>	44
4.1.3 Efeito de <i>rpoSam</i> sobre a expressão de <i>pstS</i>	45
4.2 Efeito de <i>rpoSam</i> sobre a expressão de genes dependentes de σ^S	47
4.2.1 Efeito de <i>rpoSam</i> sobre <i>proU</i>	47
4.2.2 Efeito de <i>rpoSam</i> sobre <i>osmY</i>	48
4.3 Comportamento do mutante <i>rpoSam</i> frente a situações de estresse	49
4.3.1 Comportamento de cepas contendo <i>rpoSam</i> frente ao estresse osmótico ...	49
4.3.2 Comportamento de cepas contendo <i>rpoSam</i> frente ao estresse oxidativo ...	51
4.3.3 Comportamento de cepas contendo <i>rpoSam</i> frente ao estresse frio	52
4.4 Detecção da proteína RpoS truncada	53
5 DISCUSSÃO	57
5.1 Efeito de <i>rpoS</i> e <i>rpoSam</i> sobre a expressão de genes dependentes de σ^D	57
5.2 Efeito de <i>rpoSam</i> sobre a expressão de genes dependentes de σ^S	60
5.3 Comportamento de cepas contendo <i>rpoSam</i> frente a situações de estresse	61
5.4 Comportamento da cepa C600 e suas derivadas	65
5.5 Detecção da proteína RpoS truncada	66
6 CONCLUSÕES	69

REFERÊNCIAS	70
ANEXO - The constancy of global regulation across a species: the concentrations of ppGpp and RpoS are strain-specific in <i>Escherichia coli</i>	83

1 INTRODUÇÃO

Escherichia coli é uma *Proteobacteria* γ que faz parte da microbiota de aves e mamíferos, incluindo o homem e, normalmente, tem uma relação de comensalismo com seu hospedeiro (Trabulsi, 2008). Contudo, também existem linhagens patogênicas que causam diarreia e outras infecções. *E. coli* é uma das espécies mais intensamente estudadas, sendo amplamente utilizada em estudos bioquímicos, genéticos, de biologia molecular e de evolução. Por ocupar diversos habitats e ser uma bactéria de vida livre sofre mudanças bruscas nas condições ambientais e tem que enfrentar condições desfavoráveis de pH, temperatura, osmolaridade, ataque de radicais livres e indisponibilidade de nutrientes. Para adaptar-se à esta diversidade de situações, *E. coli* mantém rígido controle sobre a expressão de genes, respondendo rapidamente à mudanças no ambiente externo (Browning e Busby, 2004; Farrel e Finkel, 2003).

A resposta aos diferentes tipos de estresse, entretanto, tem um custo alto para o organismo, pois demanda grande quantidade de recursos (Ferenci, 2005). Do ponto de vista populacional, a resposta ao estresse não se limita apenas às alterações fisiológicas e ao padrão de expressão de genes, mas também em longo prazo à seleção de mutações que irão conferir melhor adaptabilidade às condições do ambiente em que a bactéria se encontra (Farrel e Finkel, 2003).

1.1 RNA Polimerase e fatores sigma

O componente central da transcrição de genes em bactérias é a enzima RNA polimerase (RNAP). O cerne da enzima (E) é composto de 5 subunidades: α , α , β , β' e ω (Ishihama, 2000), que juntas, são competentes para a transcrição, mas não para o reconhecimento do sítio promotor. Para que a RNA polimerase reconheça o promotor deve primeiro interagir com uma sexta subunidade, conhecida como fator sigma (σ), formando assim a holoenzima ($E\sigma$) (Burgess e Anthony, 2001). O fator σ é, portanto, responsável pelo reconhecimento e posicionamento da RNAP na região regulatória do gene, ligando-a às regiões -35 e -10 do promotor (Lee e Gralla, 2001; Borukhov e Nudler, 2008).

Uma vez iniciado o processo de transcrição, o fator sigma é geralmente liberado, sendo o cerne da enzima suficiente para transcrever o gene até o ponto de terminação (Burgess e Anthony, 2001). Entretanto, alguns estudos contestam a necessidade do fator sigma em abandonar a holoenzima após o início da transcrição (Mukhopadhyay et al., 2001; Mukopadhyay et al., 2003).

Em *Escherichia coli*, foram identificadas até o momento sete subunidades sigma: σ^D , σ^S (σ^{38}), σ^H (σ^{32}), σ^F (σ^{28}), σ^E (σ^{24}) e σ^N (σ^{54}) e σ^{FecI} (Maeda et al., 2000). σ^D (σ^{70}) é considerado o principal fator sigma em *E. coli* (Paget e Hellman, 2003) sendo responsável pela transcrição da maior parte dos genes expressos durante a fase exponencial (Feklistov e Darst, 2009). σ^S ou RpoS é considerado o segundo em importância e é o regulador mestre da resposta geral ao estresse em *E. coli*. A designação σ^{38} é também utilizada para este fator, visto que a forma mais comum de σ^S em cepas de laboratório apresenta uma massa molecular de 37,8 kDa (Hengge-Aronis, 2002). Os demais fatores sigma reconhecem promotores de genes relacionados a deficiência de nitrogênio (σ^N), choque térmico (σ^H), síntese de flagelos e quimiotaxia (σ^F), funções extra-citoplasmáticas (σ^E), e finalmente, σ^{FecI} , é um membro da sub-família de fatores sigma relacionados à funções extra-citoplasmáticas (ECF) (Maeda et al., 2000; Ishihama, 2000). Trataremos detalhadamente neste trabalho do fator σ^S .

1.1.1 O fator σ^S

σ^S , ou RpoS, é codificado pelo gene *rpoS*, formando um operon com o gene *nlpD*. A transcrição de *rpoS* é feita a partir de 3 promotores: *nlpDp1* e *nlpDp2*, que localizam-se a jusante de *nlpD* e de um terceiro promotor, *rpoSp*, que situa-se dentro da ORF de *nlpD*, sendo este o principal responsável pela transcrição de *rpoS* durante a fase estacionária de crescimento (Lange et al., 1995; Hengge-Aronis, 2002). O operon *rpoS-nlpD* situa-se no minuto 61,76 do cromossomo de *E. coli* e é transcrito no sentido anti-horário (Hengge-Aronis, 2002).

O nível de RpoS na célula é baixo durante o crescimento exponencial, aumentando no princípio da fase estacionária e em situações de estresse, tais como alterações bruscas de pH, choque térmico, estresse osmótico e estresse oxidativo, situações de carência de carbono, nitrogênio, fosfato ou aminoácidos

(Farrel e Finkel, 2003). Devido a abrangência de genes dependentes de σ^S , este não é considerado um mero fator sigma alternativo, mas um segundo fator sigma principal (Hengge-Aronis, 2000).

A função anti-estresse de σ^S é de natureza geral e preventiva, ou seja, ao invés de eliminar o agente causador, ou simplesmente fazer a reparação do dano causado, os genes regulados por σ^S preparam a célula para que esta seja capaz de lidar com eventuais estresses que venham a ocorrer (Hengge-Aronis, 2002). Os genes dependentes de σ^S são também importantes para respostas a danos no DNA (Khil e Camerini-Otero, 2002; Merrikh et al., 2009). Além disso a proteína confere resistência à radiação ultravioleta, hiperosmolaridade, etanol e possivelmente outros estresses ainda não identificados (Loewen, 1998; Hengge-Aronis, 2002). Aproximadamente 500 genes são controlados positivamente por RpoS, o que corresponde a cerca de 10% do genoma total de *E. coli* (Hengge, 2009).

1.1.2 Regulação da expressão de σ^S

Durante a fase exponencial os níveis de RpoS são baixos, porém, detectáveis (Tanaka et al., 1993). Entretanto, é na fase estacionária que os níveis da proteína elevam-se de forma significativa, bem como em resposta aos diferentes tipos de estresse descritos anteriormente (Lange e Hengge-Aronis, 1994).

Em geral, condições de estresse potencialmente letais requerem uma resposta rápida, e é por isso que para promover rápido acúmulo de RpoS ocorre forte aumento na estabilidade da proteína. Já em casos de um estresse mais gradual ou condições ambientais menos severas, a tendência é estimular a transcrição ou tradução de σ^S (Hengge-Aronis, 2000). De fato, apesar de σ^S ser regulado em todos os níveis possíveis (transcrição, tradução, pós-tradução) (Figura 1), a principal forma de regulação se dá a nível de estimulação/inibição da proteólise da proteína (Schweder et al., 1996).

Figura 1 – Formas de regulação de σ^S em resposta a diferentes estímulos. As setas verdes indicam indução da transcrição e tradução, a seta vermelha indica inibição da proteólise
 Fonte: Taschner, 2006.

A estabilidade da proteína RpoS é baixa durante a fase exponencial, sendo degradada rapidamente pela protease ClpXP (Peterson et al., 2005; Hengge-Aronis, 2002). Contudo, σ^S só é reconhecido pela protease quando ligado à chaperona RssB, responsável pela “entrega” de RpoS à protease. Além de sua função proteolítica, ClpXP pode atuar como um fator anti-sigma, controlando a atividade de RpoS de forma reversível (Hengge, 2009).

Outra molécula envolvida no controle e expressão de genes dependentes de RpoS é ppGpp. Seu efeito positivo sobre *rpoS* foi primeiramente descrito por Gentry et al. 1993. Esta molécula de alarme tem seus níveis elevados em resposta a vários estresses celulares (Potrykus e Cashel, 2008). Além disso, ppGpp parece também reduzir a afinidade de σ^D pelo cerne da RNAP (Hernandez e Cashel, 1995). Pode-se dizer que os papéis de ambos estão interligados, havendo uma cooperação mecânica e estratégica entre eles.

Uma das formas de controle de expressão de *rpoS* é através dos “pequenos RNAs regulatórios” DsrA e RprA. Em condições de estresse estes reconhecem uma sequência próxima à região regulatória de *rpoS*, onde se ligam, desfazendo a estrutura secundária de mRNA que “esconde” o sítio Shine-Dalgarno, facilitando assim a tradução de *rpoS* (Majdalani et al., 1998).

1.1.3 σ^S e σ^D : Competição pelo cerne da RNAP e caracterização das regiões promotoras

RpoS pode ser visto como um controlador do desempenho celular, promovendo a proteção em detrimento do crescimento, de acordo com as condições do meio. A proteção contra estresses é observada através da ativação de genes específicos. O efeito de RpoS sobre o crescimento é negativo, uma vez que o acúmulo deste fator sigma na célula exacerba a competição com o fator σ^D reduzindo a transcrição de genes relacionados ao crescimento. Este fenômeno será descrito mais abaixo.

Relatos na literatura mostram que a concentração do cerne da RNA polimerase em uma célula de *E. coli* em crescimento é de aproximadamente 2000 moléculas por equivalente genômico de DNA, dos quais um terço (600-700) encontra-se livre, não associado ao DNA. Porém, a quantidade total de moléculas de todos os sete fatores sigma presentes em *E. coli* é de aproximadamente 1200/célula, ou seja, o dobro da concentração de moléculas de cerne livres. A limitação na quantidade de cernes de RNA polimerase na célula resulta em uma competição entre os fatores sigma pela ligação ao cerne da polimerase (Ishihama, 2000).

As afinidades dos fatores sigma em relação ao cerne diferem, sendo que a maior delas é encontrada para o fator σ^D , que chega a ser 16 vezes maior quando comparada a de σ^S , que apresenta a menor afinidade (Maeda et al., 2000). Além disso, em sua concentração máxima, σ^S corresponde a apenas 30% da concentração de σ^D (Ishihama, 2000). Entretanto, apesar de diferentes afinidades, $E\sigma^S$ e $E\sigma^D$ reconhecem sequências promotoras similares (Wise et al., 1996; Gaal et al., 2001; Lee e Gralla, 2001).

Devido a alta similaridade existente entre RpoS e σ^D , Chiang e Schellhorn (2010) propuseram que a origem de RpoS pode ter ocorrido a partir de uma duplicação do gene *rpoD* (que codifica para σ^D), anterior a divergência das proteobactérias (para uma revisão mais detalhada, ver Chiang e Schellhorn, 2010).

Estudos *in vitro* demonstraram que diversos genes são transcritos com igual eficiência por σ^S ou σ^D (Tanaka et al., 1993 e Colland et al., 2000). No entanto, *in vivo*, os promotores são geralmente reconhecidos por somente um dos fatores sigma (Hengge-Aronis, 1999; Colland et al., 2000; Ishihama, 2000). Desta forma, Tanaka et al (1993) classificaram os promotores de *E. coli* em 3 grupos: o primeiro reconhecido tanto por σ^S quanto por σ^D e o segundo e terceiro grupo reconhecidos por cada um dos fatores sigma isoladamente (Tanaka et al., 1993). Em relação a σ^S , vários elementos parecem contribuir de maneira integrada para sua seletividade.

Um papel especial é atribuído à posição -13, ocupada por uma citosina no promotor de genes transcritos preferencialmente por $E\sigma^S$. A presença deste nucleotídeo na posição ocorre em mais de 70% dos promotores naturalmente transcritos por $E\sigma^S$, enquanto que os promotores dependentes de σ^D exibem uma seleção contra -13C. Promotores reconhecidos por RpoS também são capazes de tolerar maiores desvios do consenso nas regiões -10 e -35 bem como maiores espaçamento entre elas. A jusante da região -10, uma alta concentração de Adenina ou Timina também promove maior seletividade por RpoS (Typas et al., 2007).

Outros fatores envolvidos na preferência de RpoS por promotores envolve a presença de elementos UP distais, que são regiões localizadas a jusante da sequência -35, e que auxiliam na ligação da RNA polimerase ao promotor. A presença de sítios de reconhecimento pela proteína H-NS inibe a iniciação da transcrição por $E\sigma^D$ mas não por $E\sigma^S$. A presença de sítios de ligação aos reguladores IHF e Lrp também está associada à preferência da transcrição de genes por $E\sigma^S$. O grau de enovelamento do DNA é outra característica tida como facilitadora da transcrição por uma ou outra holoenzima, bem como a presença de uma série de proteínas, e de pequenas moléculas, como DksA e ppGpp (Typas et al., 2007). Em conclusão, como via de regra, $E\sigma^S$ tem a capacidade de explorar sequências promotoras menos convencionais.

1.1.4 Genes transcritos por E σ^S

σ^S reconhece promotores de genes envolvidos na resposta geral ao estresse em *E. coli* (Hengge-Aronis, 2002), controlando positivamente cerca de 500 genes (Hengge, 2009). Alguns são destaque neste trabalho.

O promotor de *proU* é dependente de E σ^S (Wise et al., 1996). Em realidade, *proU* é um operon formado pelos genes *proV*, *proW* e *proX* (<http://regulondb.ccg.unam.mx/>), relacionado a funções osmorregulatórias e responsável por codificar o transportador de alta afinidade para a betaína, uma molécula carregada positivamente relacionada a proteção contra estresse osmótico (Cairney et al., 1985). Trata-se de um transportador do tipo ABC (*ATP-binding cassette*), onde ProV é uma ATPase, ProW uma proteína integral de membrana e ProX é uma proteína periplasmática de ligação à betaína (Gowrishankar, 1989). O operon *proU* é induzido sob condições de alta concentração intracelular de potássio e reprimido quando esta é baixa (Sutherland et al., 1986). O aumento na concentração de betaína contribui para a restauração do turgor da célula sem que esta acumule níveis deletérios de potássio, além disso, este aminoácido protege as proteínas da desnaturação causada pela presença de alta concentração iônica (Sutherland et al., 1986).

Outro gene dependente de RpoS e de destaque neste trabalho é *osmY*, também relacionado a funções osmorregulatórias (Yim et al., 1994). OsmY é uma das proteínas de resposta ao estresse osmótico que parece ser necessária durante todos os estágios de adaptação à hiperosmolaridade (Weber et al., 2006). OsmY também acumula-se quando a taxa de crescimento celular diminui. Pode-se dizer, portanto, que esta proteína é estimulada a partir de duas situações, sendo ambas dependentes de RpoS (Yim et al., 1994).

A proteína RpoS é também responsável pela regulação do gene *katE*, que codifica para a enzima catalase. Sua importância se dá em situações de estresse oxidativo, pois a catalase é responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio, o que a torna essencial para a defesa contra radicais livres de oxigênio (Loewen e Triggs, 1984). A ação desta enzima pode ser quantificada pelo grau de efervescência ocasionado pelo contato com H₂O₂. Desta forma, pode-se dizer que uma análise qualitativa da atividade de catalase serve como

indicador indireto da atividade de σ^S , visto que a expressão de *katE* é dependente exclusivamente de σ^S (Schellhorn et al., 1998).

1.2 Polimorfismo de *rpoS*

O gene *rpoS* é altamente polimórfico, sendo capaz de adquirir mutações facilmente (Ivanova et al., 1992). Este polimorfismo pode ser observado até mesmo entre cepas de uma mesma espécie (Dong, 2009). Devido a alta pressão seletiva que atua sobre RpoS, inúmeras mutações tem sido identificadas tanto em cepas de laboratório quanto em isolados naturais de *E. coli*.

Zambrano et al. (1993) demonstraram que cepas selvagens normalmente acumulam mutações em *rpoS* quando cultivadas por longos períodos de tempo e que estes mutantes possuem vantagem adaptativa em relação à culturas jovens, dando origem a um fenótipo conhecido como GASP (*Growth Advantage in Stationary Phase*) (Zambrano et al., 1993; Finkel, 2006).

A presença de mutações pontuais, deleções e/ou adição de sequências extras é observada com frequência (Subbarayan e Sarkar, 2004b). Enquanto que algumas destas mutações resultam na completa inativação do gene, outras levam apenas à redução da atividade de σ^S (Robey et al., 2001). Um exemplo de mutação que causa atenuação de RpoS é a transição C→T na posição 97 da ORF, resultando em um códon de parada TAG (âmbar) na posição 33 da proteína (Atlung et al., 2002; Subbarayan e Sarkar, 2004b).

Devido à presença de um sítio Shine-Dalgarno alternativo na posição 157, o ribossomo reinicia a tradução resultando em uma proteína com 277 aminoácidos, 53 aminoácidos a menos do que a selvagem (Rajkumari e Gowrishankar, 2002) (Figura 2). Apesar de truncada em sua porção N-terminal, esta proteína tem a capacidade de exercer parcialmente sua função, ou seja, é capaz de reconhecer genes dependentes de σ^S , ainda que com menos eficiência (Subbarayan e Sarkar, 2004a).

Figura 2– Sequência de *rpoS* âmbar. Em vermelho o códon de parada TAG, em azul o provável sítio Shine-Dalgarno (SD) e em rosa, o início de tradução GTG.

Fonte: Taschner, 2006.

De acordo com Subbarayan e Sarkar (2004c), um estudo comparativo das sequências de *rpoS* na cepa W3110 proveniente de diferentes laboratórios demonstrou a presença da mutação âmbar em 4 de 5 amostras sequenciadas.

Estas variações foram denominadas *rpoSam* (mutante âmbar de *rpoS*) (Subbarayan e Sarkar, 2004c). Curiosamente, ao sequenciarem uma cepa ancestral e outra derivada de W3110, os autores constataram que estas também continham um resíduo de timina na posição 97. Desta forma, foi sugerido que a proteína σ^S truncada corresponde à versão ancestral ou selvagem do gene *rpoS* em cepas aparentadas a W3110, já que a maioria das cepas possui um códon de parada na posição 97-99.

Atlung et al. (2002) também encontraram mutantes âmbar em aproximadamente 50% das cepas de *E. coli* K-12 examinadas, o que reforça a hipótese descrita anteriormente. Já em todas as cepas de *E. coli* ambientais e patogênicas (não derivadas de K-12) examinadas, encontraram uma guanina na posição 97. Foi sugerido então que o ancestral comum de *E. coli* possuía um códon GAG ou CAG (dependendo da bactéria), na posição 33 de *rpoS*, que transformou-se em TAG na linhagem K-12, dando origem aos mutantes conhecidos atualmente como âmbar. Segundo esta hipótese, com o passar do tempo, mutações ocorreram reconstituindo o alelo longo de σ^S através da reversão da mutação âmbar, ou por supressão da mesma (Atlung et al., 2002).

A função e ampla distribuição de alelos *rpoSam* não são completamente entendidas. Entretanto, estudos apontam importantes funções para a presença deste alelo na natureza. Subbarayan e Sarkar (2004a), por exemplo, examinaram a capacidade de *rpoSam* em expressar o fenótipo GASP e mostraram que uma

cepa *rpoS*_{Sam} não supressora venceu a competição com uma cepa contendo o alelo *rpoS* selvagem após 4 dias de crescimento conjunto em meio LB. Dong et al. (2009) relataram que mutações nulas e alelos polimórficos de RpoS, estão relacionadas à adaptação de *E. coli* patogênicas no hospedeiro.

Há uma necessidade de estudos mais aprofundados a cerca da frequente presença do alelo *rpoS*_{Sam} em bactérias. Porém, baseado na literatura, pode-se dizer que a seleção de mutações em *rpoS* está diretamente relacionada à adaptações aos diferentes tipos de ambientes nos quais as bactérias se encontram. Além disso, estas mutações parecem contribuir para a divergência e especialização de *rpoS* dentro de diferentes genomas bacterianos (Chiang e Schellhorn, 2010). Segundo Ferenci (2003), a seleção de mutações *rpoS* que conferem a atividade parcial de σ^S , soluciona o equilíbrio necessário em condições combinadas de estresse e carência nutricional extremas, onde perder completamente o fator σ^S implicaria em uma diminuição drástica no nível de resistência a estresses.

Dong et al. (2009) reportaram em seus estudos que mutantes espontâneos de *rpoS* foram isolados com uma frequência baixa, mas acima da frequência normal de mutações espontâneas (10^{-8} /célula). Isto sugere que mutantes *rpoS* naturais constituiriam apenas uma pequena fração da população de *E. coli*, a menos que houvesse um longo e forte processo de seleção. Apesar disso, vários estudos mostraram que mutantes nulos ou parciais de *rpoS* foram encontrados em pelo menos 20% das cepas de *E. coli* analisadas (Spira et al., 2010; Waterman e Small, 1996; Bhagwat et al., 2005).

1.3 Regulon PHO

O regulon é um dos principais sistemas regulatórios de expressão gênica em bactérias frente à adaptação às condições ambientais (Chiang e Schellhorn, 2010). Uma das situações comumente encontradas no ciclo de vida de uma *E. coli* é a carência de nutrientes, como o fósforo.

A principal fonte de fósforo para *Escherichia coli* é o ortofosfato ou fosfato inorgânico (PO_4^{3-} ou Pi) (Ohtake et al., 1998; van Veen, 1997). Bactérias possuem uma vasta rede de genes e operons relacionados a captação e assimilação de

fosfato para promover o crescimento da bactéria em condições limitantes deste nutriente (Makino et al., 1998). O regulon PHO de *E. coli* consiste de mais de 40 genes e operons relacionados com a captação e assimilação de P_i e outros compostos fosforilados (Baek e Lee, 2006). Os genes pertencentes a este regulon carregam em seus promotores, uma ou mais sequências consenso conhecidas como PHO-boxes no lugar da região -35 convencional (Makino et al., 1998). O PHO-box é uma sequência de 18 pb que encontra-se 10 pb acima da sequência -10 (Makino et al., 1993). A transcrição dos genes de PHO é regulada por um sistema de dois componentes formado por PhoB e PhoR. Em condições de carência de fosfato, ou seja, quando a concentração de fosfato no ambiente cai abaixo de 4 μM , PhoR, que está localizada na membrana interna, se autofosforila e transfere o grupo fosfato para a proteína PhoB. Uma vez fosforilada, PhoB, que é o ativador transcricional dos genes de PHO, liga-se aos PHO-boxes presentes nas regiões promotoras e interage com $E\sigma^D$ iniciando a transcrição dos genes deste regulon (Makino et al., 1998) (Figura 3).

Figura 3 - Esquema da regulação e transcrição dos genes de PHO. Compostos fosfatados penetram no periplasma através da porina PhoE, sendo então clivados pela enzima fosfatase alcalina (FA) que libera Pi. PstS se liga ao Pi e interage com o canal formado por PstA e PstB. A energia para este transporte ativo é fornecida pela hidrólise de ATP promovida por PstB. A função de PhoU ainda é desconhecida. Quando a concentração de Pi encontra-se abaixo de 4 μM , a forma repressora de PhoR (PhoR-R) se torna ativa (PhoR-A) e este transfere seu grupo fosfato para PhoB. Quando fosforilado, PhoB interage com sequências consenso nos promotores de genes de PHO (PHO-boxes) promovendo a transcrição destes genes.

O sistema Pst de transporte de Pi pertence ao regulon PHO e é codificado pelo operon *pst* formado pelos genes *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB* e *phoU*. PstS é uma proteína periplasmática que liga moléculas de Pi com alta afinidade. PstC e PstA são proteínas da membrana interna que formam um canal responsável pela entrada de Pi na célula, enquanto PstB é uma ATPase que fornece energia ao transporte (Chan e Torriani, 1996). A função da proteína PhoU não é clara, porém ela não está envolvida no transporte de Pi via Pst (Steed e Wanner, 1993) (Figura

3). Além de transportar P_i , Pst funciona também como regulador negativo de PHO, pois mutações no operon *pst* causam geralmente a síntese constitutiva dos genes do regulon. O mecanismo pelo qual Pst reprime a expressão de PHO em abundância de fosfato ainda não foi esclarecido.

Outros componentes do regulon PHO incluem os genes *phoA*, *phoE*, o operon *ugp* e o operon *phn*, que codificam respectivamente à fosfatase alcalina (FA), à porina seletiva de ânions da membrana externa PhoE, ao transportador de glicerol-3-fosfato Ugp e ao transportador de fosfonatos Phn (van Veen, 1997) (Figura 4).

Além do destaque dado ao operon *pst* neste trabalho, um outro gene de PHO que será amplamente citado é *phoA*, cuja indução durante a limitação de fosfato permite que a bactéria utilize ésteres de fosfato não transportáveis como fonte de fósforo (van Veen, 1997).

Figura 4 - Localização dos principais genes e operons do regulon PHO no cromossomo de *E. coli*.

1.4 A relação entre o regulon PHO e σ^S

A relação entre o regulon PHO e σ^S foi descrita em nosso laboratório. Em mutantes *rpoS*, os níveis de FA são mais elevados, pois na ausência de σ^S , não ocorre a competição com σ^D favorecendo assim a transcrição de genes do regulon PHO. Em contrapartida, em cepas *rpoS*⁺ os genes de PHO são expressos com menor intensidade e, em consequência disso, os níveis de FA encontram-se mais baixos (Taschner et al., 2004). Spira e Ferenci (2008) demonstraram que há inibição da FA por σ^S mesmo em condições de abundância de Pi quando o regulon PHO encontra-se reprimido e apenas níveis basais de FA são sintetizados. Desta forma, a FA foi descrita como marcadora da variação de σ^S . O efeito negativo de σ^S afeta também a expressão de *phoB*, *phoE* e *ugpB*, mas não do operon *pst* (Taschner et al., 2004).

Ruiz e Silhavy (2003) demonstraram que mutantes PHO-constitutivos, ou seja, que expressam altos níveis dos genes do regulon PHO mesmo em condições não-limitantes de Pi, apresentam altas concentrações de RpoS durante a fase exponencial de crescimento. Para explicar este fenômeno, Schurdell et al. (2007) propuseram que uma sequência de RNA localizada entre os genes *pstA* e *pstB* possui grande similaridade a DsrA e uma vez que o operon *pst* estaria sendo transcrito constitutivamente, o mRNA de *pst* processado pela ação da RNase E (Aguena et al., 2002; Aguena e Spira, 2009), liberaria o transcrito correspondente à porção intergênica entre *pstA* e *pstB*, que interagiria, por sua vez, com a região regulatória de *rpoS*, promovendo sua tradução. A figura 5 mostra como ocorre esta desrepressão.

Tradução inibida:

Desrepressão da tradução:

Figura 5- Estrutura secundária que “esconde” o Shine-dalgarno (SD) do mRNA de *rpoS*. A ligação de DsrA na fita oposta ao SD permite sua liberação para a ligação do ribossomo e consequente tradução de *rpoS*.

Levando em conta que a limitação de fosfato é uma condição comum em ambientes habitados por *E. coli*, tais como rios e mares, é esperado que nestes habitats o regulon PHO esteja constantemente ativo. Por outro lado, σ^S acumula-se em situações de carência de fosfato, visto que a limitação deste nutriente corresponde a uma situação de estresse para a bactéria. Apesar de ambos os mecanismos responderem ao mesmo tipo de estresse, eles cumprem papéis antagônicos (Taschner et al., 2004). Conforme mencionado anteriormente, isto se deve ao fato de que σ^S e σ^D competem por um número limitado de cernes de RNA polimerase na célula. Assim, o antagonismo causado pela competição entre os fatores σ^S e σ^D pode ser explicado por um modelo evolutivo conhecido como *trade-off* (Nystrom, 2003). Esse modelo propõe que limitações na capacidade transcricional da bactéria resultam na existência de um equilíbrio entre crescimento celular e sobrevivência, causado pela competição entre σ^D e σ^S respectivamente. Sendo assim, em situações de estresse, que ameaçam a sobrevivência da célula, o fator σ^S promove a transcrição dos seus genes, ao mesmo tempo em que reprime a transcrição dos genes relacionados ao crescimento (por exemplo, genes de PHO) (Nystrom, 2003).

A função regulatória de RpoS está também sujeita a ajustes de longo prazo. Neste caso, as diversas pressões seletivas que atuam sobre a bactéria resultam em um sistema de adaptação conhecido como SPANC (*Self-Preservation And Nutricional Competence*) (Ferenci, 2005). O SPANC é caracterizado como um mecanismo de seleção natural que seleciona mutações para o estabelecimento de um equilíbrio entre reprodução e estresse (Ferenci, 2005). Apesar de estar baseada no modelo de *trade-off*, SPANC trata de alterações mais profundas na bactéria, envolvendo alterações genotípicas, como por exemplo mutações em *rpoS*. Já o *trade-off* simplesmente trata de alterações fisiológicas e muitas vezes temporárias, até que a situação de estresse seja eliminada. Caso a limitação nutricional se estabeleça na população de bactérias por um longo período (várias gerações), o equilíbrio SPANC pode tender para um dos lados da balança fisiológica (reprodução ao invés de proteção). A medida em que isto ocorre varia de acordo com os níveis de RpoS encontrados nas diferentes linhagens, sendo que bactérias com níveis maiores da proteína são propensas a acumular mutações mais facilmente do que as que possuem níveis baixos de RpoS (Spira e Ferenci, 2008).

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é traçar uma correlação entre os mecanismos de proteção da bactéria frente à limitação de fosfato e à transcrição de genes relacionados a proliferação celular, tal como os genes do regulon PHO. A busca do entendimento genético e fisiológico da frequente presença do alelo âmbar na natureza está incluso nas investigações deste estudo. Objetivos mais específicos incluem:

- analisar o alelo *rpoSam* e caracterizar seu efeito sobre os genes do Regulon PHO;
- comparar o comportamento de cepas contendo *rpoSam* com cepas selvagens ou mutantes nulos de *rpoS*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios de cultura

Meio A (Levinthal et al., 1962): 0,12M Tris, 80 mM NaCl, 20 mM KCl, 20 mM NH_4Cl , 3 mM Na_2SO_4 , 1 mM MgCl_2 , 0,2 mM CaCl_2 , 2 μM ZnCl_2 , 0,5% Glicose, 0,5% Bacto-peptona, pH 7,5.

O Meio A é um meio de cultura semi-rico contendo concentração limitante de Pi (aproximadamente 0,2 mM) (Spira et al., 2010). Quando acrescido de 1 mM de KH_2PO_4 é denominado meio A +Pi. Na ausência de qualquer acréscimo de KH_2PO_4 , é denominado meio A -Pi

Meio LB (Miller, 1992): Bacto-Triptona (10 g/l), Extrato de levedura (5 g/l), NaCl (10 g/l).

Meio SOC (Sambrook e Russel, 2001): 20 g/l triptona, 5 g/l extrato de levedura, 0,5 g/l NaCl, 2,5 mM KCl, 0,35% glicose.

Meio T-salts (Torriani, 1960): NaCl (4,68 g/l), KCl (1,5 g/l), NH_4Cl (1,08 g/l), Tris-base (14,52 g/l), $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0,2 g/l), Na_2SO_4 (0,35 g/l), CaCl_2 (0,01 M), FeCl_3 (0,01 M), ZnCl_2 (0,01 M), pH 7,5.

Ao meio T-salts é acrescentado 0,2% de Glicose e concentrações variadas de KH_2PO_4 . Com este acréscimo o meio passa a chamar-se TGP.

3.2 Bactérias e plasmídios

Bactérias e plasmídios utilizados neste estudo estão listados nas Tabelas 1 e 2. Deve ser enfatizada a utilização de seis principais cepas: MG1655, MG1655 *rpoS*::Tn10, MG1655 *rpoSam*, C600, C600 *rpoS*::Tn10 e C600 *rpoS*1655, que serviram como base para todos os experimentos deste projeto.

Tabela 1 - Bactérias utilizadas neste estudo

(continua)

Linhagem	Genótipo	Fonte ou Referência
BS110	W3110 <i>zfi3251</i> ::Tn10 (50-60% de co-transdução entre <i>rpoS</i> e <i>zfi3251</i> ::Tn10)	Coleção do laboratório
BS16	MG1655 <i>rpoS</i> ::Tn10	Coleção do laboratório
C600	F- <i>hsdR supE44 thr-1 leuB6 thi-1 lacY1 fhuA21 e14- mcrB</i> lambda-	Coleção do laboratório
DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i> 80dlacZ Δ M15 Δ lacX74 <i>endA1 recA1 deoR (ara; leu)</i> 7697 <i>araD39 galU galK nupG rpsL</i>	Coleção do laboratório
HG1	C600 <i>zfi3251</i> ::Tn10	Transdução de <i>zfi3251</i> ::Tn10 em C600
HG2	MG1655 <i>rpoSam zfi3251</i> ::Tn10	Transdução de <i>rpoSam</i> de HG1 em MG1655
HG3	C600 <i>rpoS</i> 1655 <i>zfi3251</i> ::Tn10	Transdução de <i>rpoS</i> ⁺ de MG1655 em HG1

Tabela 1 – Bactérias utilizadas
neste estudo

(conclusão)

Linhagem	Genótipo	Fonte ou Referência
HG4	MG1655 <i>osmY::lacZ</i> KmR	Transdução de <i>osmY::lacZ</i> de R0151 em MG1655
HG5	MG1655 <i>rpoS::Tn10</i> <i>osmY::lacZ</i> KmR	Transdução de <i>osmY::lacZ</i> de R015 em MG1655 <i>rpoS::Tn10</i>
HG6	MG1655 <i>rpoSam</i> <i>osmY::lacZ</i> KmR	Transdução de <i>osmY::lacZ</i> de R015 em MG1655 <i>rpoSam</i>
HG7	C600 <i>osmY::lacZ</i> KmR	Transdução de <i>osmY::lacZ</i> de R015 em C600
HG8	C600 <i>rpoS::Tn10</i> <i>osmY::lacZ</i> KmR	Transdução de <i>osmY::lacZ</i> de R0151 em C600 <i>rpoS::Tn10</i>
HG9	C600 <i>rpoS1655</i> <i>osmY::lacZ</i> KmR	Transdução de <i>osmY::lacZ</i> de R0151 em C600 <i>rpoS1655</i>
KM32	Δ <i>recBCD::Ptac-gam-</i> <i>bet-exo cat</i>	Poteete et al., 1993
MG1655	<i>E.coli</i> K-12 selvagem	Coleção do laboratório
NP3	C600 <i>rpoS::Tn10</i>	Coleção do laboratório
R0151	MC4100 (<i>osmY::lacZ</i>) KmR	Weichart et al., 1993
W3110	<i>E.coli</i> K-12 <i>rpoS</i> selvagem	Ishihama, 2000

Tabela 2 - Plasmídios

Plasmídio	Características	Fonte ou Referência
pBS11	Fusão <i>PpstS-cat</i> no vetor pKK232-8	Taschner et al., 2006
pDHY272	Fusão <i>PproU-lacZ</i>	Dattananda et al., 1991
pJL148	Fonte do SPA <i>tag</i>	Zeghouf et al., 2003
pKK232-8	Vetor de clonagem	Amersham Biosciences
pNP5	<i>rpoS</i> ⁺ clonado em pACT3 sob <i>Ptac</i>	Taschner (2006)
pNP10	<i>rpoS</i> de C600 clonado em pACT3 sob <i>Ptac</i>	Taschner (2006)

3.3 Construção de MG1655 *rpoSam* e C600 *rpoS1655*

Para a construção das cepas MG1655 *rpoSam* e C600 *rpoS1655*, foi primeiramente inserida a marcação *zfi3251::Tn10* no cromossomo das cepas envolvidas, utilizando para isto a cepa doadora BS110 (W3110 *zfi3251::Tn10*). Esta cepa carrega uma inserção *Tn10* que confere resistência à tetraciclina e que pode ser co-transduzida com *rpoS* com uma frequência de 50-60%. A metodologia de transdução está descrita detalhadamente nos itens 3.6 e 3.7.

Para a obtenção de MG *rpoSam*, primeiro o lisado de fagos P1 obtido a partir de BS110 foi transduzido em C600 para inserir *zfi3251::Tn10* próximo a *rpoSam*, e os transductantes foram isolados em placas de tetraciclina. 15 colônias transductantes foram ensaiadas para a atividade de FA e uma que apresentou um nível de FA similar ao de C600 foi escolhida. Deve ser salientado que a presença do alelo *rpoSam* faz com que C600 produza níveis mais elevados de FA que a cepa doadora (BS110) ou MG1655. Portanto, um transductante resistente à tetraciclina e que apresente alto nível de FA deve apresentar o genótipo *rpoSam zfi3251::Tn10*. A partir deste isolado (C600 *zfi3251::Tn10*) foi preparado um novo

lisado de P1, que foi utilizado para transduzir MG1655, selecionando novamente para resistência à tetraciclina e atividade elevada de FA (similar a de C600). Para confirmar o genótipo da cepa transductante, a região da ORF de *rpoS* que abrange o códon 33 (onde está localizada a mutação âmbar) foi sequenciada.

Para a construção de C600 *rpoS*1655 um lisado de P1 obtido a partir de uma cepa *rpoS*::Km foi utilizado para transduzir C600, resultando em uma bactéria C600 *rpoS*::Km. Uma segunda transdução com o lisado de P1 em BS110 (*zfi3251*::Tn10 *rpoS*⁺) foi feita com o intuito de converter C600 *rpoS*::Km em C600 *rpoS*⁺ (*rpoS*1655). Lembrando que BS110 e MG1655 carregam o mesmo alelo de *rpoS* (*rpoS*⁺). As colônias transductantes obtidas nesta segunda transdução foram isoladas em placas de tetraciclina e testadas em relação à sensibilidade à canamicina. Os transductantes que fossem Tc^R e Km^S deveriam conter o alelo *rpoS*⁺. Transductantes foram testados também em relação à atividade de FA (que deveria ser mais baixa do que a de C600 selvagem ou de C600 *rpoS*::Km e similar a de MG1655), catalase e acúmulo de glicogênio (mais fortes em cepas *rpoS*⁺). Um transductante com as características fenotípicas desejadas teve a região correspondente ao códon 33 de *rpoS* sequenciada para confirmar a presença do alelo *rpoS*1655, conforme descrito no item 3.4.

3.4 Sequenciamento dos transductantes

Uma porção da sequência codificadora (ORF) de *rpoS* das cepas transductantes (MG1655 transduzido com *rpoS* de C600, e C600 transduzido com *rpoS* de MG1655), foi amplificada utilizando os iniciadores *rpoS*429F (5' –G GAACAACAAGAAGTTAAGG) e *rpoS*1730R (5' – GTATGGGCGGTAATTTGAC). A purificação do produto de PCR foi feita com o kit Wizard (Promega) e para o sequenciamento foi utilizado o kit *BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit*. Os produtos das reações foram purificados e então sequenciados em sequenciador automático.

3.5 Construção de bactérias contendo a fusão cromossomal *osmY-lacZ*

A cepa R0151 contendo a fusão cromossomal *osmY::lacZ* foi utilizada como doadora para a transdução das seis bactérias destacadas no item 3.2. Estas transduções foram realizadas utilizando o fago P1, conforme descrito nos itens 3.6- 3.7 e os transductantes foram selecionados para resistência à canamicina.

3.6 Preparação do lisado de fagos P1

A cepa doadora foi cultivada durante a noite em meio LB. Na manhã seguinte as culturas foram diluídas 100 vezes em 10 ml de LB suplementado com 5 mM CaCl_2 e 0,2% glicose. Bactérias foram cultivadas a 37 °C até a $\text{DO}_{540} = 0,3-0,5$ quando 0,1-0,2 ml de um lisado fresco de P1 foi adicionado à cultura. As células foram cultivadas por mais 2-3 horas até que a lise da cultura pôde ser observada. 500 µl de clorofórmio foram então adicionados e a cultura fortemente agitada por alguns segundos. Os restos de bactérias foram então centrifugados e o sobrenadante coletado com posterior adição de mais 500 µl de clorofórmio.

3.7 Transdução

As cepas receptoras foram cultivadas durante a noite em 2-3 ml de meio LB, centrifugadas na manhã seguinte e ressuspensas no mesmo volume de tampão MC (0,1 M MgSO_4 , 5 mM CaCl_2). 200 µl de células foram misturados com 200 µl do lisado de P1 e incubados por 20 min a 37 °C. O produto da transdução foi semeado em meio LB com o antibiótico apropriado para selecionar as bactérias transductantes e as placas de meio de cultura foram incubadas durante a noite.

3.8 Inserção da etiqueta SPA em *rpoS*

A etiqueta SPA foi obtida através de PCR pela amplificação do plasmídio pJL148 com primers específicos *rpoS*-SPA. O fragmento com tamanho

correspondente a 1700 pb foi recortado do gel e purificado através do kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System da Promega.

Para inserir a etiqueta SPA em *rpoS* foi utilizado o sistema de recombinação alélica λ -Red (Murphy e Campellone, 2003). Uma cultura de 20 ml da cepa a ser transformada foi cultivada em meio LB na temperatura de 30 °C. Ao atingir a $DO_{600} = 0,01$ foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mM. A cultura foi então crescida até a DO_{600} de 0,2-0,5 sendo então transferida para a temperatura de 42 °C com leve agitação por 15 minutos. Após este período, a cultura foi mantida no gelo por 10 minutos. As células foram então precipitadas e ressuspensas em 1 ml de 20% de glicerol + 1 mM MOPS e novamente centrifugadas, desta vez por 10 segundos na velocidade de 10.000 rpm. O *pellet* foi lavado mais duas vezes no mesmo tampão e ressuspendido em 90 μ l para posterior eletroporação com o DNA. Após o choque, as células foram ressuspensas em meio LB onde permaneceram incubadas com agitação por no mínimo 2 horas, para então serem semeadas em placas com seu respectivo antibiótico de seleção.

3.9 Western-blot

As bactérias foram cultivadas durante a noite em meio LB. Para cada cepa de interesse foi centrifugado 1 ml de cultura que foi ressuspendido em tampão de corrida (0,5 M Tris-HCl, 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol e 0,01% bromophenol blue), proporcionalmente a DO_{600} da cultura (1 $DO = 100 \mu$ l). As amostras foram então fervidas por 10 minutos e as proteínas do lisado de células separadas em gel de 12,5 % de acrilamida. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas à uma membrana de nitrocelulose (Protran, Perkin-Elmer Life Sciences) através do equipamento Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (BioRad). A membrana foi submetida a ensaio de imuno-deteção com o soro anti- σ^S (Santa Cruz Biotechnology) ou anti-FLAG M2 (Sigma) diluído 1000 vezes e soro anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Pierce) diluído 20.000 vezes. Para detecção do complexo, foi utilizado o kit de detecção Super Signal West Pico (Pierce) conforme recomendado pelo fabricante. A membrana foi exposta a filmes de raios-X por diversos períodos de tempo.

3.10 Ensaios Enzimáticos

3.10.1 Fosfatase Alcalina

50 µl de uma cultura de bactérias foram adicionados a 950 µl de p-NPP (p-nitrofenilfosfato) dissolvido em 1 M Tris pH8, na concentração de 1 mg/ml. As reações permaneceram incubadas a 37 °C até a obtenção de coloração amarela, sendo estas interrompidas pelo acréscimo de 250 µl de 1 M Na₂HPO₄. A absorbância foi então medida no comprimento de onda 410 nm. A atividade enzimática da amostra é obtida pela equação $E.U. = A_{410} \times FD/min \times DO_{540}$, onde A_{410} é a absorbância do produto da reação a 410 nm; FD é o fator de diluição das bactérias; min é o tempo de reação; e DO_{540} é a concentração de bactérias medida pelo nível de turbidez da cultura a 540 nm.

3.10.2 β-galactosidase

A atividade de β-galactosidase foi medida como descrito por Miller (1992). 100 µl de uma cultura de bactérias foram adicionados a 900 µl de tampão Z (16,1 g/l Na₂HPO₄, 5,5 g/l NaH₂PO₄, 0,75 g/l KCl, 0,25 g/l MgSO₄·7H₂O e 2,7 ml/l β-mercaptoetanol) acrescido de 50 µl de 0,1% SDS/100 µl clorofórmio para permeabilizar as bactérias. Após 10 s de forte agitação, a reação foi iniciada com a adição de 200 µl de uma solução de 4 mg/ml de orto-fenil-galactopiranosídeo (ONPG). As amostras foram incubadas a 32 °C até a solução tornar-se amarela e 500 µl de uma solução de 1 M Na₂CO₃ foi adicionado para terminar a reação. O produto da reação foi medido a 420 nm sendo o resultado expresso em Unidades Miller através da fórmula $U.M. = A_{410} \times FD \ 1000/min \times DO_{540}$, onde A_{410} é a absorbância do produto da reação a 410 nm; FD é o fator de diluição das bactérias; min é o tempo de reação; e DO_{540} é a concentração de bactérias medida pelo nível de turbidez da cultura a 540 nm.

3.10.3 Ensaios de Cloranfenicol Acetil Transferase (CAT)

Os ensaios de CAT foram realizados conforme descrito por Shaw (1975). A acetilação de cloranfenicol foi quantificada indiretamente medindo-se a acetilação do substrato 5,5'-ditiobis-2 ácido nitrobenzoico (DTNB) com Acetil CoA. A redução de DTNB por Acetil-CoA libera 5-tio-2-nitrobenzoato na mesma proporção em que

cloranfenicol é acetilado. Cepas contendo fusões *pst-cat* foram cultivadas durante a noite em meio A não suplementado com fosfato, com o intuito de induzir carência. No dia seguinte, as culturas foram lavadas e em seguida sonicadas, sendo os sonicados centrifugados e seus sobrenadantes coletados. A quantidade de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão. 200 µl do extrato celular foram adicionados a 0,4 mg DTNB e 0,5 mM Acetil CoA em um volume final de 1 ml. A reação foi iniciada através da adição de Cloranfenicol (Cm) em concentração final de 0,2 mM. A atividade foi determinada através da medição em espectrofotômetro da taxa de aumento na absorbância em 412 nm como resultado da liberação de 5-tio-1-nitrobenzoato, em temperatura ambiente. A atividade foi calculada pela seguinte fórmula: taxa de aumento de $A^{412} \times 1000 / 13,6 \times \text{mg Proteína}$.

3.11 Ensaios de Estresse

As cepas MG1655, MG1655 *rpoS*::Tn10, MG1655 *rpoS*Δ, C600, C600 *rpoS*::Tn10 e C600 *rpoS*Δ foram submetidas a três diferentes tipos de estresses: oxidativo, osmótico e frio. Todos os ensaios foram feitos com bactérias crescidas *overnight* em meio LB, lavadas duas vezes em NaCl 0,9% e diluídas para a concentração final de 3000 bactérias/ml. Para o estresse oxidativo as bactérias foram expostas a 6 mM de H₂O₂ e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente. Amostras de 100 µl foram coletadas a cada 5 minutos e plaqueadas em LB ágar. Para o estresse osmótico, bactérias foram incubadas em diferentes concentrações de NaCl (1 a 5 M) e coletadas após quatro horas de incubação a temperatura ambiente. Por fim, para o ensaio de estresse frio as bactérias suspensas em solução salina 0,9% foram mantidas em tubos de ensaio mergulhados no gelo dentro da geladeira, a 4 °C ao longo de 5 dias, e amostras foram coletadas a cada 24 horas. A análise da sensibilidade ao estresse foi realizada através da contagem de bactérias sobreviventes (UFC/ml).

3.12 Análise Estatística

Para as análises estatísticas foi utilizado o teste t-student com valor de significância $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

Com a intenção de estudar o efeito do alelo *rpoSam* sobre a expressão de genes dependentes de σ^S e de genes dependentes de σ^D , foram construídos um mutante isogênico de MG1655 contendo o alelo *rpoSam* e um derivado de C600 contendo o alelo *rpoS*⁺ (*rpoS*1655). Estas cepas e seus respectivos controles foram submetidas a diversos ensaios descritos abaixo.

4.1 O efeito de *rpoSam* sobre a expressão de genes dependentes de σ^D

4.1.1 O efeito de *rpoSam* sobre a expressão da Fosfatase Alcalina

Observações preliminares em nosso laboratório mostraram que a cepa C600, que carrega o alelo *rpoSam* apresenta um fenótipo atenuado de RpoS. Entre outras características, C600 expressa um nível elevado de fosfatase alcalina (FA) e a super-expressão de seu *rpoS* através do plasmídio pNP10 não inibe a atividade da FA, conforme acontece com outros alelos de *rpoS* (pNP5) (Taschner, 2006).

Para confirmar o efeito do alelo *rpoSam* proveniente de C600 sobre a expressão de FA, a atividade da enzima nas cepas MG1655 *rpoSam* e C600 *rpoS*1655 foi testada (Figura 6). Bactérias foram cultivadas em meio A -Pi para induzir a carência de Pi. Como controle, foi também testada a FA dos mutantes *rpoS* nulos.

Figura 6 - Efeito de *rpoSam* sobre a expressão da Fosfatase Alcalina. Bactérias foram cultivadas durante a noite em meio A -Pi e no dia seguinte ensaiadas para a atividade de FA. Cada barra corresponde a média ± DP de seis experimentos independentes com MG1655, C600 e suas derivadas transformadas ou não com pNP10 (*rpoS*⁺ de C600) e pNP5 (*rpoS*⁺ de MG1655).

O nível de FA de MG1655 é o mais baixo entre as cepas testadas. Nesta cepa, a expressão de FA é prejudicada pela competição entre σ^S e σ^D pelo cerne da RNA polimerase, uma vez que *phoA* é transcrito exclusivamente por $E\sigma^D$. Já o mutante *rpoS::Tn10* apresentou 3,5 vezes mais FA que a cepa selvagem, o que condiz com o esperado visto que não ocorre a competição entre os fatores sigmas nesta cepa. Já no caso de MG1655 *rpoSam* é possível observar níveis de FA similares ao do mutante *rpoS::Tn10*. O padrão de semelhança encontrado pode ser atribuído a duas possíveis causas, que serão detalhadas posteriormente neste trabalho.

A figura também mostra que a cepa selvagem C600 produz quase duas vezes mais FA do que MG1655. Isto poderia ser devido ao fato de que C600 carrega o alelo *rpoSam* (Taschner, 2006). Porém, a análise de western-blot mostrou que C600 produz uma proteína RpoS longa (38 KDa) em quantidade similar a de MG1655 (Figura 14). O nível de FA do mutante *rpoS::Tn10* de C600 é indistinguível de C600 ($p=0,08$) e de C600 *rpoS1655* ($p=0,13$) segundo análises estatísticas (t-student). O motivo pelo qual C600 apresenta uma atividade de FA mais alta do que a de MG1655 não é conhecido, mas tendo em vista que as três

cepas (MG1655, C600 e C600 *rpoS*1655) carregam proteínas RpoS idênticas, as diferenças no nível de FA não podem ser atribuídas a *rpoS*.

4.1.2 O efeito de *rpoS*^{am} sobre a expressão de *lacZ*

A enzima β -galactosidase, responsável pela hidrólise da lactose, é codificada por *lacZ*, o primeiro gene do operon *lac*. A transcrição de *lacZ* é dependente de σ^D (Fischer et al., 1998). Com o intuito de observar o efeito de *rpoS*^{am} sobre um gene dependente de σ^D , não pertencente ao regulon PHO, os níveis de expressão de β -galactosidase endógena em MG1655, C600 e seus derivados foram analisados. Uma vez que a expressão do operon *lac* não é constitutiva, este foi induzido artificialmente pelo análogo de lactose IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) (Sambrook e Russell, 2001).

Figura 7-Efeito de *rpoS*^{am} sobre a expressão de β -galactosidase endógena. Bactérias foram cultivadas em meio LB acrescido de 0,1 mM IPTG. Cada barra corresponde a média e DP de seis ensaios. As cepas também foram transformadas com pNP5 e pNP10 para a super-expressão de *rpoS*⁺ e *rpoS*^{am} respectivamente.

A Figura 7 revela que o mutante *rpoS::Tn10* de MG1655, apresentou uma atividade de β -galactosidase 4 vezes superior a da cepa selvagem. Este aumento é devido a eliminação da competição entre σ^D e σ^S no mutante *rpoS*. Já MG1655 *rpoSam* produz 3,5 vezes mais β -galactosidase do que a cepa selvagem MG1655 ($p=0,01$), e é estatisticamente indistinguível do mutante MG1655 *rpoS::Tn10* ($p=0,09$).

Levando em conta a funcionalidade parcial de *rpoSam*, era de se esperar que o nível enzimático de MG1655 *rpoSam* fosse intermediário entre MG1655 e MG1655 *rpoS::Tn10*, o que ocorre, ainda que de forma não estatisticamente significativa. Neste caso, ao contrário do que foi observado para a FA, a cepa MG1655 *rpoSam* não só demonstrou incapacidade na ligação do promotor de *lacZ*, como a super expressão desta versão truncada de RpoS (pNP10) inibiu a transcrição do gene (Figura 7) (Taschner, 2006).

Como já citado anteriormente, apesar do *rpoS* de C600 possuir a mutação âmbar que resulta na codificação de uma proteína RpoS truncada, a proteína RpoS efetivamente observada é longa, e tem sequencia idêntica a de MG1655. Conforme esperado, os níveis de expressão de β -galactosidase em C600 e C600 *rpoS1655*, cujo RpoS é originário de MG1655, foram similares. Já C600 *rpoS::Tn10* apresentou o dobro de atividade em relação à cepa parental, o que condiz com o esperado, visto que a transcrição de β -galactosidase é dependente de σ^D .

4.1.3 Efeito de *rpoSam* sobre a expressão de *pstS*

A relação conflituosa entre o regulon PHO, cujos genes são predominantemente transcritos por σ^D (Makino et al., 1993) e σ^S já foi sido descrita (Taschner et al., 2004, 2006). O fato de que RpoS afeta negativamente grande parte dos genes de PHO, exceto *pst* e a hipótese de que este operon possa ser transcrito tanto por σ^D quanto por σ^S nos levou a busca pela compreensão do comportamento do promotor de *pst* em cepas contendo diferentes alelos de RpoS. O plasmídio pBS11, que carrega uma fusão entre o promotor de *pstS* com o gene repórter *cat* foi transformado nas cepas de interesse, tendo como principal objetivo observar o efeito de *rpoSam* sobre a expressão de *pstS*.

Figura 8 - Efeito de *rpoSam* sobre a expressão de *pstS*. Bactérias contendo o plasmídeo pBS11 (*PpstS-cat*) foram cultivadas durante a noite em meio A -Pi e no dia seguinte ensaiadas para a atividade de CAT. Cada barra corresponde a média ± DP de três experimentos independentes.

Conforme pode ser observado na figura não houve diferenças significativas entre as diferentes cepas em relação à expressão de *pstS*, sejam elas mutantes ou selvagens para RpoS. A atividade de CAT encontrou-se dentro da faixa entre 0,8 a 1,4 unidades enzimáticas, sem que houvesse significância estatística entre os valores obtidos (t-student). Estes resultados remetem a idéia inicialmente proposta por Taschner et al. (2004, 2006) de que *pst* possa ser transcrito tanto por σ^D quanto por σ^S . Além disso, a versão truncada de RpoS, presente em MG1655 *rpoSam* não revelou padrão de expressão diferente do que foi observado com as outras versões de RpoS, permanecendo no mesmo patamar de expressão quando comparada as demais cepas. Isto é esperado, uma vez que a presença ou ausência de RpoS longa não teve efeito sobre *pstS*, e sugere que RpoS truncada também pode participar da transcrição deste gene.

4.2 Efeito de *rpoSam* sobre a expressão de genes dependentes de σ^S

4.2.1 Efeito de *rpoSam* sobre *proU*

Após testar o efeito de *rpoSam* sobre genes dependentes de $E\sigma^D$, foram analisadas fusões transcricionais com promotores dependentes de $E\sigma^S$. *proU* é um operon induzido sob condições de alta concentração intracelular de potássio e reprimido quando estas concentrações são baixas. Sendo dependente de $E\sigma^S$ sua transcrição também é induzida durante a fase estacionária (Rajkumari e Gowrishankar, 2002). O plasmídio pDHY272 (fusão transcricional *proU-lacZ*) foi transformado nas cepas contendo as diferentes versões de RpoS, e a atividade de β -galactosidase foi medida. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 9.

Figura 9 - Ensaio de β -galactosidase com cepas contendo a fusão *proU-lacZ*. Bactérias transformadas com o plasmídio pDHY272 foram cultivadas durante a noite em meio LB e ensaiadas para β -galactosidase. As barras representam a média e desvio padrão de seis ensaios.

Conforme esperado, a expressão da enzima em MG1655 foi elevada, enquanto a expressão de *proU* nos mutantes *rpoS* de MG1655 e C600 foi

praticamente nula, confirmando a dependência de *proU* em $E\sigma^S$. A atividade de β -galactosidase de MG1655 *rpoSam* foi 40% menor do que a da cepa selvagem MG1655, mas estatisticamente indistinguível desta ($p = 0,16$). Deve ser salientado que os níveis basais de β -galactosidase endógena foram medidos nas cepas ausentes de qualquer fusão, estando na ordem de 30 a 60 unidades Miller, e não sendo, portanto, relevantes para interferir nos resultados obtidos com as fusões deste estudo. A atividade de *proU-lacZ* em C600 foi estatisticamente idêntica a de C600 *rpoS1655* ($p=0,47$), conforme esperado. Estes resultados sugerem que a proteína truncada produzida por MG1655 *rpoSam* é funcional em relação ao reconhecimento do promotor de *proU*.

4.2.2 Efeito de *rpoSam* sobre *osmY*

Para confirmar o efeito de *rpoSam* sobre a expressão de genes dependentes de RpoS, o gene *osmY* foi testado. *osmY* também está relacionado à adaptação de bactérias ao aumento da osmolaridade (Yim et al., 1994). A fusão cromossomal *osmY-lacZ* (Weichart et al., 1993) foi transduzida às cepas de interesse e a atividade de β -galactosidase foi medida. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 10.

Figura 10 - Ensaio de β -galactosidase contendo fusões *osmY-lacZ*. As cepas contendo a fusão foram cultivadas durante a noite em LB e ensaiadas para a atividade de β -galactosidase. Cada barra representa a média e desvio padrão de 6 ensaios.

A mutação nula *rpoS::Tn10* causou uma redução de 5,3 vezes no nível de expressão de *osmY* quando comparada com a cepa MG1655. Isto era esperado uma vez que *osmY* é dependente de RpoS. Em relação a MG1655 *rpoSam*, era de se esperar um nível de atividade intermediário entre a cepa selvagem e a mutante *rpoS::Tn10*, visto que esta cepa carrega a versão truncada de RpoS parcialmente ativa. Contudo, a expressão de β -galactosidase nesta cepa foi muito semelhante a do mutante *rpoS::Tn10* ($p=0,98$), sugerindo que a proteína truncada não seria capaz de reconhecer o promotor de *osmY* de forma eficiente.

Como já frisado anteriormente, C600 e C600 *rpoS1655* expressam uma proteína RpoS longa, e portanto não apresentam diferenças significativas entre elas. A semelhança nos níveis de *osmY* nas duas cepas pôde ser constatada. Já a expressão de *osmY* em C600 selvagem é quase 4 vezes menor do que a de MG1655, um dado curioso visto que ambas as cepas produzem RpoS e níveis similares da proteína. Conforme esperado, a atividade enzimática de C600 *rpoS::Tn10* foi 5 vezes menor do que na cepa selvagem C600.

4.3 Comportamento do mutante *rpoSam* frente a situações de estresse

A proteína RpoS coordena a “resposta geral a estresses”. O próximo passo foi, portanto, testar o comportamento da cepa *rpoSam* frente a diferentes situações de estresse. Com isso, objetivamos examinar o grau de sobrevivência das bactérias correlacionando com o tipo de alelo de RpoS presente. Através deste ensaio, buscamos principalmente a compreensão de uma possível vantagem que explique a ampla distribuição da versão truncada em *E.coli*.

4.3.1 Comportamento de cepas contendo *rpoSam* frente ao estresse osmótico

Em um típico ensaio de exposição de bactérias à hiperosmolaridade, MG1655, seu mutante *rpoS::Tn10*, MG1655 *rpoSam*, C600, C600 *rpoS::Tn10* e C600 *rpoS1655* foram submetidas a concentrações crescentes de NaCl por um período de 4 horas. Após este período, as bactérias sobreviventes foram semeadas em placas de LB e o número de UFC contado. A figura 11 ilustra a média dos resultados obtidos.

Figura 11 - Efeito do estresse osmótico sobre MG1655, MG1655 *rpoS::Tn10*, MG1655 *rpoSam*, C600, C600 *rpoS::Tn10* e C600 *rpoS1655*. O gráfico representa a média de três ensaios realizados em duplicata para cada cepa. A análise dos dados foi feita por contagem do número de colônias sobreviventes (UFC/ml).

A cepa selvagem MG1655 não foi praticamente afetada pela alta concentração salina. Já MG1655 *rpoS::Tn10* mostrou ser a mais sensível de todas as cepas testadas, chegando a quase 100% de mortalidade na concentração mais alta de NaCl (5 M). MG1655 *rpoSam* apresentou um índice de sobrevivência intermediário entre o mutante *rpoS* nulo e a cepa selvagem.

C600 apresentou maior sensibilidade ao estresse osmótico do que MG1655 com 4 e 5 M NaCl, ao passo que MG1655 não foi praticamente afetada nestas concentrações. Porém, estatisticamente esta diferença não é significativa ($p=0,11$), colocando MG1655, C600 e C600 *rpoS1655* em um mesmo patamar de resistência para este tipo de estresse. Já o perfil de resistência observado para C600 *rpoS::Tn10* ficou dentro do comportamento típico esperado para um mutante *rpoS*, chegando a quase 100% de morte celular de bactérias na concentração salina mais alta.

4.3.2 Comportamento de cepas contendo *rpoSam* frente ao estresse oxidativo

Com o intuito de testar a resistência da versão truncada de RpoS frente ao estresse oxidativo, bactérias foram incubadas na presença de 6 mM H₂O₂.

Figura 12 - Efeito do estresse oxidativo sobre a sobrevivência de MG1655, C600 e seus derivados. A figura representa a média de 3 ensaios realizados em duplicata. A análise dos dados foi feita por contagem do número de colônias sobreviventes (UFC/ml).

Mais uma vez, MG1655 apresentou o padrão mais resistente dentre todas as cepas. Sua respectiva mutante *rpoS::Tn10* foi a mais sensível, mas MG1655 *rpoSam* não apresentou resistência significativamente maior do que a do mutante *rpoS* nulo.

As cepas C600 e C600 *rpoS*1655 não apresentaram o perfil de resistência esperado para uma cepa *rpoS*⁺, visto que a taxa de mortalidade chegou a 60% após 20 minutos de exposição ao peróxido de hidrogênio, em ambas as cepas. C600 *rpoS::Tn10* mostrou-se um pouco mais sensível (78% de mortalidade após 20 minutos), mas esta diferença não é estatisticamente significativa ($p=0,5$ e $p=0,12$ em relação a C600 e C600 *rpoS*1655, respectivamente).

4.3.3 Comportamento de cepas contendo *rpo*Sam frente ao estresse frio

Outra situação adversa na qual as bactérias foram expostas foi o estresse causado pelo frio. Para tal, bactérias foram mantidas em tubos de ensaio mergulhados no gelo e dentro da geladeira ao longo de 5 dias, com temperatura controlada de 4 °C e coletas a cada 24 horas. A figura 13 apresenta os resultados obtidos.

Figura 13 - Efeito do estresse frio sobre a sobrevivência de MG1655, C600 e seus derivados. A figura representa a média de 3 ensaios com todas as cepas em duplicata. A análise dos dados foi feita por contagem do número de colônias sobreviventes (UFC/ml).

Como pode-se observar na figura, MG1655 selvagem não foi praticamente afetada pelo estresse frio. Seu mutante *rpoS* nulo teve uma mortalidade de 80% ao cabo de 5 dias, enquanto que MG1655 *rpo*Sam mostrou um comportamento híbrido. Até as 72 h, a cepa *rpo*Sam mostrou-se mais resistente que o mutante *rpoS*::Tn10, mas entre 72 h e 96 h o nível de sobrevivência caiu drasticamente, apresentando a maior sensibilidade dentre todas as cepas testadas ao final do experimento.

Diferentemente de MG1655, C600 apresentou um padrão de alta sensibilidade ao frio, com 80% de morte celular ao final de 5 dias. C600 *rpoS*1655 foi um pouco mais resistente, mas a diferença entre esta cepa e a C600 selvagem não foi estatisticamente significativa ($p=0,07$). Não temos ainda uma explicação

para a alta sensibilidade de C600 selvagem em relação aos estresses oxidativo e baixa temperatura. Podemos, entretanto, afirmar que esta não deve ter relação com RpoS, pois C600 e MG1655 expressam a mesma proteína RpoS e em quantidades similares (Figura 14).

Em conclusão, o alelo *rpoSam* conferiu um fenótipo claramente intermediário em relação ao estresse osmótico e com menos intensidade nos estresses oxidativo e pelo frio.

4.4 Detecção da proteína RpoS truncada

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório mostraram que a cepa C600 contém um códon âmbar na posição 97-99 da ORF de *rpoS* (Taschner, 2006). Entretanto, uma análise de western-blot mostrou que a proteína RpoS de C600 possui tamanho idêntico ao RpoS de MG1655 (38 Kda) (Figura 14), indicando que a mutação âmbar está sendo suprimida. Para estudar o alelo truncado de RpoS foi necessário transferir o alelo *rpoSam* de C600 para MG1655, que não suprime a mutação âmbar e produz, portanto, uma proteína RpoS truncada. Paralelamente, *rpoS*⁺ de MG1655 foi transferido para C600 (ver seção 3.3 de Material e Métodos). As trocas de alelos *rpoS* nas duas cepas foi confirmada por sequenciamento.

O transductante MG1655 *rpoSam* deveria expressar uma proteína RpoS de aproximadamente 30 KDa. Porém, apesar de várias tentativas em detectar uma banda correspondente a RpoS truncada, esta não pôde ser visualizada (Figura 14).

Figura 14 - Western-blot com anticorpo monoclonal específico para RpoS. As bandas visíveis correspondem a proteína RpoS longa com 38 kDa. Nenhuma banda de 30 kDa pôde ser detectada.

Na tentativa de detectar *rpoSam* optamos por inserir a etiqueta (tag) SPA (*sequential peptide affinity*) na porção C-terminal de RpoS. A etiqueta SPA é

composta por sequências repetitivas do tipo FLAG (contendo no total 22 aminoácidos) e uma marcação de resistência ao antibiótico canamicina, para permitir a seleção da inserção de SPA no gene (Zeghouf et al., 2003). Há um códon de parada entre as sequências FLAG e o gene de resistência a canamicina. O peptídeo 3X FLAG possui extrema sensibilidade pelo respectivo anticorpo (anti-FLAG). Esta etiqueta foi utilizada com sucesso para observar a expressão de diversas proteínas que não puderam ser detectadas de outra forma (Hu et al., 2009).

Inicialmente foi amplificada a sequência SPA-KmR a partir do plasmídeo pJL48 (Zeghouf et al., 2003) com iniciadores híbridos SPA-*rpoS* originando um fragmento de DNA de 1700 pb.

O fragmento SPA-*rpoS* foi inserido por transformação no cromossomo da cepa KM32 entre o penúltimo e o último códon de *rpoS*. KM32 contém os genes que codificam para a maquinária de recombinação do sistema λ -Red (Poteete et al., 1999) (Figura 15). Desta forma, é obtida uma cepa que expressa *rpoS* por completo acrescido de 22 aminoácidos do peptídeo 3X FLAG.

A seleção foi feita em placas de canamicina e cerca de 20 transformantes foram isolados. Para confirmar a presença da inserção SPA-KmR, uma segunda reação de PCR com iniciadores específicos para *rpoS* foi realizada. Cinco transformantes testados apresentaram uma banda de 2500 pb, indicando a presença do SPA-KmR na porção C-terminal de *rpoS*.

Figura 15 - SPA-KmR amplificado a partir do plasmídeo pJL148 com iniciadores híbridos SPA-*rpoS* e posteriormente inserido na extremidade 3' de *rpoS* da cepa KM32 através de recombinação catalisada pelo sistema λ -Red.

Fonte: adaptado de Zeghouf et al., 2003.

Dos transformantes obtidos um foi escolhido para confirmação da inserção de SPA::KmR em *rpoS* através de análises de western-blot, utilizando anticorpos anti-FLAG e anti- σ^S para detectar a presença da etiqueta SPA na proteína RpoS. A figura 16 apresenta os resultados.

Figura 16 - Western-blot com anticorpos específicos para SPA (anti-FLAG) e RpoS (anti- σ^S). Linha 1 corresponde ao transformante de *rpoS*::SPA na cepa KM32.

Observando a figura é possível notar que a sequência SPA foi inserida corretamente no gene *rpoS* de KM32. O isolado 1 revelou uma banda intensa de 40 kDa com ambos os anticorpos, indicando que esta cepa recombinante expressa uma proteína de fusão RpoS-SPA (38 kDa de RpoS + 2 kDa de SPA), que responde a ambos os anticorpos (anti-SPA e anti-RpoS). Já a cepa MG1655,

que foi utilizada como controle apresentou uma banda de 38 KDa quando testada com o anti- σ^S , e nenhuma banda na presença do anti-FLAG.

O próximo passo foi transferir a etiqueta SPA para MG1655 *rpoSam* por transdução via fago P1. Foi preparado um lisado de P1 a partir da cepa KM32 *rpoS::SPA*, que foi utilizado para transduzir MG1655 *rpoSam*, selecionando para resistência à canamicina. Dois transductantes foram isolados e testados em análises de western-blot, utilizando os anticorpos anti-FLAG para detectar RpoS-SPA nas cepas. A figura 17 apresenta os resultados.

Figura 17 - Western-blot com anticorpos específicos para SPA (anti-FLAG). 1, cepa MG1655 selvagem. 2, Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas). 3, KM32 *rpoS::SPA*. Linha 4, *rpoS::Tn10* e linhas 5 e 6, transductantes de *rpoS::SPA* em MG1655 *rpoSam*.

Conforme o esperado, nenhuma banda foi observada para MG1655 e MG1655 *rpoS::Tn10*. Na linha 3 é possível observar a presença de uma banda de 40 KDa, correspondente a fusão RpoS-SPA. Já as bandas detectadas nas linhas 5 e 6 correspondem aos transductantes de SPA em MG1655 *rpoSam*. Porém, estas bandas possuem tamanho igual a de KM32 RpoS-SPA (que não carrega o alelo *rpoSam*), e portanto, a recombinação entre o fragmento *rpoS*-SPA transduzido deve haver englobado também o códon 33 de KM32 que trocou o códon TAG de *rpoSam* pelo de KM32, que não é âmbar. Para obter um gene *rpoSam*-SPA, novas transduções devem ser realizadas, ou alternativamente, a etiqueta SPA deve ser inserida diretamente em MG1655 *rpoSam* por recombinação alélica.

5 DISCUSSÃO

5.1 Efeito de *rpoS* e *rpoSam* sobre a expressão de genes dependentes de σ^D

Devido à competição entre σ^S e σ^D pela ligação ao cerne da RNA polimerase, genes relacionados ao crescimento e, portanto, dependentes de σ^D são inibidos por *rpoS*. Experimentos realizados por nosso grupo já haviam apontado para uma exceção a esta regra: o *operon pst*, que codifica para um sistema de transporte de P_i , mas não é negativamente afetado por RpoS (Taschner et al., 2004, 2006). Além disso, experimentos preliminares haviam sugerido que a forma truncada de RpoS poderia também participar da transcrição do gene *phoA*. A principal evidência foi a de que a super-expressão de *rpoSam* causou um aumento no nível de FA, contrariamente ao que ocorre quando RpoS longa é super-expressa. Para aprofundar o entendimento sobre o efeito do alelo âmbar de *rpoS* em genes dependentes de σ^D , foi construída uma cepa derivada de MG1655 no qual o alelo *rpoS*⁺ foi trocado por *rpoSam* e seu efeito sobre *phoA*, *pstS* e *lacZ* foi testado. A expressão dos genes *phoA*, *lacZ* e *pstS* foi respectivamente analisada através da medição dos níveis de FA e β -galactosidase endógenos e pela medição da fusão transcricional *pstS-cat*.

phoA codifica para a enzima fosfatase alcalina e pertence ao regulon PHO. Sua síntese aumenta devido a limitação de fosfato e permite que a bactéria utilize ésteres de fosfato não transportáveis (van Veen, 1997). Sabe-se que os genes de PHO são transcritos pela holoenzima $E\sigma^D$ (Makino et al., 1988, 1989).

De fato, os dados obtidos na figura 6 mostram que a cepa selvagem MG1655 apresenta níveis inferiores de FA quando comparada ao mutante MG1655 isogênico *rpoS::Tn10*, indicando que a competição entre fatores sigma é um mecanismo modulador do padrão de transcrição de *phoA* (Maeda et al., 2000). Contudo, uma atenção especial deve ser dada a cepa MG1655 *rpoSam*, portadora do alelo *rpoS* âmbar. É nítida a semelhança entre os níveis de FA produzido por esta cepa e o mutante *rpoS::Tn10*. Uma possível explicação para este comportamento seria o fato de que a cepa *rpoSam* produz baixas quantidades de proteínas RpoSam e assemelha-se desta forma a um mutante *rpoS* nulo. Uma explicação alternativa refere-se a capacidade de *rpoSam* em reconhecer o

promotor de *phoA*, contribuindo desta forma para a transcrição do gene. Há evidências para ambas as hipóteses: a dificuldade em detectar uma banda correspondente a RpoS truncada (Figura 14) indica que a tradução de *rpoS* a partir do ATG alternativo é pouco eficiente, resultando em baixos níveis de expressão de RpoSam (Subbarayan e Sarkar, 2004a). Por outro lado, a super-expressão de *rpoSam* a partir de um promotor forte causou um aumento no nível de atividade de FA em relação à cepa selvagem MG1655 (Figura 6), sugerindo que RpoSam é capaz de reconhecer o promotor de *phoA* e promover sua transcrição.

Outro gene dependente de σ^D testado foi *lacZ* (Fischer et al., 1998). Níveis basais de β -galactosidase são detectados normalmente em bactérias cultivadas na ausência de lactose, na ordem de 30 a 60 unidades Miller. Porém, para estimular a transcrição de *lacZ*, análogos de lactose são utilizados, sendo que IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) é o mais comum destes (Sambrook e Russell, 2001).

Os resultados obtidos para as cepas mutantes e selvagens no ensaio de β -galactosidase estão de acordo com o esperado para um gene dependente de σ^D , já que a transcrição de *lacZ* é beneficiada pela ausência de σ^S . Assim como na análise da expressão de *phoA*, os resultados obtidos com *lacZ* mostraram que a cepa contendo a versão truncada de RpoS comportou-se de forma semelhante ao mutante nulo, sugerindo novamente que a proteína truncada não compete eficientemente com o fator σ^D neste caso. No entanto, diferentemente do que ocorreu com *phoA*, a super-expressão de *rpoSam* inibiu a síntese de β -galactosidase (Figura 7), indicando que *lacZ* não pode ser transcrito por $E\sigma^{Sam}$.

A proteína CAT foi utilizada como repórter para a expressão do promotor principal do operon *pst*. A relação conflituosa entre o regulon PHO, cujos genes são predominantemente transcritos por σ^D (Makino et al., 1993) e σ^S já havia sido relatada. Taschner et al. (2004) demonstraram que RpoS afeta negativamente todos os genes de PHO, exceto *pst*, que não só não é afetado pela competição entre os fatores sigma, como tem seu nível de transcrição moderadamente estimulado pela super-expressão de σ^S , e moderadamente inibido em sua ausência. Estes dados apontaram então para a possibilidade deste operon ser transcrito tanto por $E\sigma^D$ quanto por $E\sigma^S$ (Taschner et al., 2004, 2006). Os motivos

pelos quais a transcrição de *pst* pode ser realizada por $E\sigma^S$ incluem algumas características peculiares do promotor de *pst* que permitem que este seja reconhecido por $E\sigma^S$, como a presença de uma citosina na posição -13, importante para o reconhecimento do promotor por σ^S (Typas et al., 2007), e também um sítio de ligação à proteína IHF (Taschner et al., 2006; Spira e Yagil, 1999).

Complementando os relatos já existentes na literatura, foi mostrado aqui que o alelo *rpoSam* não teve um efeito diferenciado sobre a expressão de *pst*, uma vez que o promotor de *pst* pode ser transcrito por σ^D e também por σ^S , este comportamento era esperado.

Tendo em vista que o operon *pst* pertence ao regulon PHO e codifica um sistema de transporte de P_i , que obviamente está relacionado ao crescimento, seria interessante especular sobre o motivo pelo qual a interação positiva entre σ^S e *pst* surgiu durante a evolução de *E. coli*. Conforme mencionado na Introdução, a sequência Shine-Dalgarno (SD) no mRNA de *rpoS* fica normalmente inacessível ao ribossomo, devido à formação de uma estrutura secundária que inclui a região de ligação ao ribossomo. Para liberar o SD, dois RNAs pequenos expressos durante a fase estacionária- DsrA e RprA, ligam-se à fita oposta ao SD na haste de mRNA (Figura 5). Ruiz et al (2003) descobriram que um mutante que expressa constitutivamente o operon *pst* apresenta altos níveis de RpoS durante a fase exponencial. Schurdell et al. (2007) mostrou que isto é devido à presença de uma ponta livre de mRNA na região intergênica entre *pstA* e *pstB* (Aguena et al., 2002), que tem similaridade à DsrA. Portanto, do ponto de vista teleológico, para RpoS é interessante estimular a transcrição de *pst*, pois a síntese da sequência DsrA-like irá favorecer a tradução de *rpoS*.

Embora existam fortes indícios de que *phoA* possa ser transcrito por $E\sigma^{Sam}$ e *pst* por $E\sigma^S$, não há até o momento uma evidência direta e definitiva de que isto ocorra. Uma forma de testar estas hipóteses seria através de ensaios de transcrição *in vitro*. Porém, é importante lembrar que *in vitro* diversos genes são transcritos com igual eficiência por ambos os fatores sigma (Tanaka et al., 1993; Colland et al., 2000), enquanto *in vivo*, os promotores são geralmente reconhecidos por somente um deles (Hengge-Aronis, 1999; Colland et al., 2000; Ishihama, 2000). Seria portanto desejável a aplicação de testes *in vivo* que pudessem confirmar o papel de RpoS na transcrição de *phoA* e *pst*. Uma técnica

possível é o ensaio de Imunoprecipitação de Cromatina (ChIP). Esta elegante técnica testa *in vivo* as interações entre proteínas e DNA. O ChIP é rotineiramente utilizado em eucariotos e vem sendo aplicado também em bactérias (Wade et al., 2007).

Foram feitas tentativas para testar possíveis interações de RpoSam e RpoS com os promotores de *phoA* e *pst*, respectivamente. Porém, até o momento não foi possível obter dados confiáveis que permitam determinar se há uma ligação verdadeira entre os fatores sigma e as sequencias promotoras de *phoA* e *pst*. O principal problema desta técnica é a presença de bandas falso-positivas (Waldminghaus e Skarstad, 2010). Foi demonstrado inclusive que mais de 50% dos dados obtidos por ChIP na detecção de promotores reconhecidos por um outro fator sigma, σ^{32} , corresponderam a falso-positivos (Waldminghaus e Skarstad, 2010). Desta forma, a adaptação do ChIP para bactérias ainda vem sendo otimizada, na esperança de encontrar estratégias precisas que contornem os problemas para a sua aplicação.

5.2 Efeito de *rpoSam* sobre a expressão de genes dependentes de σ^S

Para testar o efeito de *rpoSam* sobre promotores dependentes de σ^S foram escolhidos os genes *proU* e *osmY*, ambos relacionados a funções osmorregulatórias (Yim e Villarejo, 1992).

Em situações de alta osmolaridade onde há perda no turgor celular, o aumento da concentração de potássio intracelular é a primeira alteração observada na célula, visto que este íon está quase sempre disponível no meio. Entretanto, uma elevação acentuada de potássio pode acarretar danos, como por exemplo, a desnaturação de proteínas. A elevação da concentração de K^+ sinaliza para a indução do operon *proU* (Sutherland et al., 1986). Este é responsável pela captação de glicina betaina, que é uma molécula osmoprotetora, pois possui a capacidade de restaurar o turgor, reduzindo a necessidade do acúmulo de níveis deletérios de K^+ ao mesmo tempo em que preserva as funções intracelulares (Sutherland et al., 1986). Já *osmY* codifica para uma proteína também fortemente induzida em situações de alta osmolaridade (Yim e Villarejo, 1992). Ambos os genes são também induzidos quando a bactéria entra na fase estacionária de

crescimento. Pode-se dizer, portanto, que estas proteínas são estimuladas a partir de duas situações, sendo ambas dependentes de RpoS (Yim et al., 1994).

Os dados aqui apresentados confirmam a dependência de *proU* e *osmY* em $E\sigma^S$. É nítida a diferença na expressão destes genes entre as cepas selvagens e seus respectivos mutantes *rpoS::Tn10*. Entretanto, o que buscávamos de fato era observar os níveis de expressão de genes dependentes de σ^S em uma cepa contendo a versão truncada de RpoS.

As observações da fusão *proU-lacZ* da cepa contendo RpoSam revelou níveis de β -galactosidase intermediários entre a cepa selvagem e a mutante âmbar. Entretanto, análises estatísticas mostraram que MG1655 e a cepa *rpoSam* não apresentaram diferenças significativas. O contrário foi observado na fusão *osmY-lacZ*, onde a expressão da versão truncada de RpoS se assemelhou a do mutante *rpoS::Tn10*, tendo estas duas cepas diferença significativa quando comparadas a selvagem.

Rajkumari e Gowrishankar, 2002 investigaram a fusão *proU-lacZ* e observaram níveis similares de expressão de *proU* em uma cepa derivada de MC4100 e em seu mutante *rpoSam*, sugerindo que a região N-terminal de RpoS, eliminada pela mutação âmbar, não é essencial para o reconhecimento do promotor de *proU* (Rajkumari e Gowrishankar, 2002). Neste trabalho eles também investigaram o efeito da proteína truncada sobre *osmY* e chegaram às conclusões semelhantes de que *osmY-lacZ* não apresentou níveis significativos na transcrição de *lacZ* a partir do alelo âmbar, o que está de acordo com os resultados obtidos também em outro estudo (Vijayendran et al., 2007). Os resultados do presente estudo confirmam o padrão intermediário de *rpoSam*, quando comparado aos outros alelos de *rpoS*, em relação à expressão de genes dependentes de σ^S .

5.3 Comportamento de cepas contendo *rpoSam* frente à situações de estresse

O fato de ser uma bactéria de vida livre e ocupar diferentes habitats, faz com que *E. coli* sofra mudanças repentinas nas condições ambientais e tenha que enfrentar inúmeras condições desfavoráveis ou situações de estresse (Farrel e Finkel, 2003). A ampla distribuição da proteína RpoS truncada na natureza (Robey

et al., 2001; Atlung et al., 2002) levou-nos a perguntar como cepas contendo o alelo *rpoSam* atuam frente a diferentes situações estressantes. Para tal, bactérias foram submetidas a três tipos de estresse: osmótico, oxidativo e por baixa temperatura.

Em situações de hiperosmolaridade, algumas proteínas, tais como OsmY, ProX, KatE, OmpC, AcnA, MetL e PoxB, são expressas. O aumento no nível destas proteínas é na maior parte das vezes regulado por RpoS (Weber et al., 2006). Os resultados alcançados neste estudo reforçam a idéia de que RpoS tem um papel importante na regulação de genes relacionados à proteção e osmorregulação.

As análises do perfil entre cepas selvagens e mutantes para RpoS estão de acordo com os resultados alcançados por Behmardi et al. (2009), onde a sensibilidade das cepas *rpoS* nulas foi acentuada em relação as cepas contendo o alelo *rpoS* em um experimento semelhante. Já em relação a versão truncada, a ineficiente transcrição de *osmY* por $E\sigma^S$ âmbar justificaria o baixo nível de resistência da cepa que carrega o alelo truncado. Apesar de *osmY* não ser o único gene relacionado ao estresse osmótico, ele é considerado um dos mais importantes para este tipo de situação adversa de acordo com Weber et al. (2006). Os relatos deste grupo ainda revelaram que enquanto todas as proteínas relacionadas ao estresse por osmolaridade são expressas independentemente do osmólito utilizado, OsmY acumula-se em um nível significativamente mais elevado quando o osmólito em questão é o NaCl. Desta forma, a ineficiência de RpoSam na transcrição de *osmY* poderia explicar o motivo pelo qual o nível de sobrevivência de MG1655 *rpoSam* foi apenas um pouco maior do que o do mutante *rpoS::Tn10*. Lembrando que aqui também foi observado que a expressão de *osmY* no alelo âmbar e no mutante nulo foi igualmente baixa.

Como já mencionado previamente neste trabalho, *proU*, também é expresso em situações de hiperosmolaridade, e foi expresso eficientemente no mutante *rpoSam*. A boa expressão de *proU*, porém, não foi suficiente para conferir alta resistência ao estresse osmótico. Além disso, talvez o aumento na osmolaridade causado por NaCl não tenha sido suficiente para resultar no acúmulo de potássio intracelular, responsável pela ativação de *proU* (Sutherland et al., 1986).

Um outro dado importante a ser acrescentado é a existência de fatores adicionais, como o aumento de potássio intracelular citado anteriormente, bem como outros que ainda vêm sendo investigados, que possivelmente estão envolvidos na modulação da atividade de promotores dependentes de RpoS em situações de hiperosmolaridade (Hengge-Aronis et al., 1993; Yim et al., 1994). Isto sugere que outros fatores não analisados neste trabalho podem estar envolvidos na regulação de genes expressos em situações de hiperosmolaridade e consequentemente, afetando a expressão de genes importantes para a sobrevivência da bactéria.

Outra situação de estresse testada foi o estresse oxidativo. A utilização de oxigênio no metabolismo energético da célula tem um custo alto, que vem a tona quando há um desequilíbrio entre a produção e a remoção de espécies reativas (Bearson et al., 2009). Os principais alvos das espécies reativas de oxigênio são o DNA, RNA, proteínas e lipídios (Cabiscol et al., 2000). A resposta bacteriana para este tipo de estresse envolve dois principais reguladores, OxyR e SoxRS (Cabiscol et al., 2000). Quando desafiadas com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), células também aumentam drasticamente o nível de proteínas, tais como a catalase, responsável pela degradação do peróxido de hidrogênio (Loewen e Triggs, 1984). Tendo em vista o importante papel de RpoS na transcrição de genes necessários na resposta ao estresse oxidativo (Bearson et al., 2009), testamos a resistência conferida pela versão truncada de RpoS através da exposição de bactérias a H_2O_2 .

O padrão de baixa resistência de MG1655 *rpoSam* sugere que a proteína truncada teria dificuldade em reconhecer promotores de genes relacionados ao estresse oxidativo (Robey et al., 2001). Além disso, foi demonstrado que RpoS truncada é produzida em baixas quantidades, e que não seria suficiente para conferir resistência em determinadas situações.

Um trabalho realizado com estresse causado por alta pressão hidrostática, revelou duas cepas contendo a mutação âmbar em *rpoS* (Robey et al., 2001). Neste artigo, estes mutantes não só apresentaram o menor nível de RpoS como também não foram capazes de induzir a proteína em fase estacionária, indicando que RpoSam pode se comportar como um mutante nulo em determinadas

situações de estresse, como foi o caso do estresse causado por H₂O₂ testado nesta dissertação.

Contudo, é importante salientar que alguns genes relacionados ao estresse oxidativo e dependentes de RpoS, como por exemplo o gene *katE*, são apenas parcialmente afetados pela proteína truncada (Subbarayan e Sarkar, 2004b). Desta forma, pode-se sugerir que frente a uma situação estressante alguns genes são melhor expressos do que outros na presença deste alelo.

Um outro estresse analisado foi o de sensibilidade à baixas temperaturas. *Escherichia coli* é considerado um microrganismo mesófilo com temperatura de crescimento ótima em torno de 37 °C e sendo assim, baixas temperaturas são um importante tipo de adversidade, capaz de modificar drasticamente os parâmetros físico-químicos da célula, afetando a difusão de solutos, fluidez da membrana, cinética enzimática, interações de macromoléculas, entre outras implicações (Gualerzi et al., 2003; Yamanaka, 1999). Além disso, o frio é uma condição frequentemente enfrentada pela bactéria na natureza. Quando uma cultura de *E. coli* é transferida de 37 °C para 10-15 °C, ocorre indução de várias proteínas, tais como, CspA, CspB, RbfA, NusA, IF-2, RecA e H-NS (Jones et al., 1987; Yamanaka, 1999). Levando em conta que em temperaturas abaixo do ideal (37 °C), a taxa de crescimento diminui e aos 8 °C ela cessa por completo (Jones et al., 1987), neste trabalho as bactérias foram expostas a temperatura de 4 °C. Nesta temperatura a água ainda encontra-se em estado líquido, de forma que o único agente estressante é o frio.

RpoS mostrou-se necessário também para a proteção contra baixas temperaturas. Este mesmo padrão de resistência proporcionado por RpoS em situações de frio foi observado por outros autores em um estudo recente comparando uma *E.coli* K-12 não patogênica com uma EHEC e sua respectiva mutante nula para *rpoS* (Vidovic et al., 2011). Já MG1655 *rpoS*^{Sam}, teve sensibilidade semelhante a do mutante MG1655 *rpoS*::Tn10.

Contrariando em parte nossos resultados, White-Ziegler (2008) e seu grupo argumentaram que não existem evidências claras de que mutantes *rpoS* sejam mais sensíveis ao frio quando comparados a cepas selvagens e sim, que é preciso uma combinação de outros fatores associados a baixa temperatura para que as células percam a viabilidade. Esta hipótese se aplicaria a C600 e suas

derivadas, que não apresentaram diferenças significativas nos níveis de sobrevivência das cepas *rpoS*⁺ e *rpoS*⁻. Neste caso, algum outro fator genético estaria comprometendo a viabilidade da cepa C600 em baixas temperaturas.

É possível citar ainda outros fatores relacionando RpoS e a sensibilidade ao frio, como por exemplo a síntese do açúcar trealose, que necessita de genes cuja indução requerem RpoS, e que está relacionado a proteção da bactéria frente a este tipo de estresse (Kandror et al., 2002). Ainda em relação a trealose, um estudo mostrou que MG1655 *rpoS*⁺ tem níveis elevados deste açúcar quando comparado a *rpoS*⁻ (Vijayendran et al., 2007), o que poderia também justificar o perfil de sensibilidade do mutante âmbar ao frio.

O padrão de alta sensibilidade observado em RpoS⁻ frente a diferentes situações de estresse pôde ainda ser encontrado em outro trabalho, cuja situação adversa foi a carência de nitrogênio (Kabir et al., 2004). Neste estudo, a comparação entre cepas K-12 contendo o alelo longo para RpoS e cepas com o mesmo alelo truncado aqui utilizado, mostraram que os mutantes *rpoS* nulo e *rpoS* âmbar são igualmente sensíveis à carência de nitrogênio (Kabir et al., 2004). Desta forma, é possível inferir que a versão truncada de RpoS não é capaz de conferir resistência em determinadas situações estressantes.

5.4 Comportamento da cepa C600 e suas derivadas

Há na literatura grande variedade de estudos utilizando a cepa MG1655 e seu respectivo mutante *rpoS* nulo, entretanto, trabalhos utilizando as cepas C600 e seu mutante *rpoS* não são encontrados.

Um dos dados surpreendentes observados neste trabalho para C600 foi em relação a atividade de FA, que foi o dobro da registrada para MG1655. Já o mutante C600 *rpoS*::Tn10 produziu apenas um pouco mais de FA do que a cepa selvagem, o que sugere que C600 carrega uma mutação nula em *rpoS*. Entretanto, C600 contém um alelo *rpoS*⁺, que é suprimido, levando à síntese de uma proteína longa. Além disso, o nível de expressão de RpoS de C600 é semelhante ao de MG1655. Como explicar então o padrão fenotípico de "baixo RpoS", compatível com a alta atividade de FA e β -galactosidase, baixa expressão de genes dependentes de *rpoS*, e maior sensibilidade a estresses apresentado

por C600? Dado os vários *inputs* que regulam e agem juntamente com RpoS seria difícil apontar para uma provável causa para esta aparente contradição. Com a exceção da mutação supressora *supE44*, responsável pela supressão da mutação âmbar em *rpoS*am, nenhuma das mutações conhecidas no genótipo de C600 indicam qualquer relação com *rpoS* ou *rpoS*am que possa explicar o fato de C600 expressar quantidades normais de RpoS selvagem e ainda assim apresentar fenótipo de uma cepa atenuada em *rpoS*.

C600 apresentou também resultados discrepantes quando comparada a MG1655 nas análises das fusões dependentes de σ^S . O nível de expressão de *proU-lacZ* de C600 foi similar ao de MG1655, enquanto que a expressão de *osmY-lacZ* foi drasticamente inferior em C600 quando comparado a MG1655. É possível que a acentuada diferença de atividade enzimática de C600 em relação a MG1655 na fusão *osmY-lacZ* seja devido a algum polimorfismo na região regulatória deste gene. Um sequenciamento desta região poderá responder a esta questão.

5.5 Detecção da proteína RpoS truncada

A mutação âmbar nos nucleotídeos 97-99 da ORF de *rpoS* resulta em um códon de parada TAG (âmbar) na posição 33 da proteína (Atlung et al., 2002; Subbarayan e Sarkar, 2004a). A existência de um sítio de início de tradução alternativo na posição 157 permite que o ribossomo reinicie a tradução resultando em uma proteína com 277 aminoácidos, 53 aminoácidos a menos do que a cepa selvagem (Rajkumari e Gowrishankar, 2002).

O sequenciamento da ORF de *rpoS* de C600 revelou que esta carrega a mutação âmbar, entretanto, esta cepa é capaz de suprimir esta mutação e restaurar o fenótipo selvagem, apresentando uma proteína longa (Figura 14). De acordo com Belin (2003), mutações supressoras são frequentes em cepas de *E. coli* K-12 e podem suprimir até 60% de um códon âmbar. Ou seja, até 60% dos tRNAs de anticódon AUC estariam carregando aminoácidos ao invés de estarem vazios, conforme esperado para tRNAs com este anticódon, dando desta forma continuidade à síntese da proteína. Além disso, o códon âmbar de *rpoS* pode sofrer *readthrough* pelo Gln-tRNA^{supE} presente em C600, estimulado por poliaminas (Yoshida et al., 2002).

Apesar de confirmações genotípicas a cerca desta mutação, outros estudos falharam em observar um fenótipo claro para a bactéria portadora da proteína truncada (Rajkumari e Gowrishankar, 2002). Porém, sabe-se da real existência de uma atividade parcial para *rpoSam* já que a mutação em destaque não inativa a funcionalidade da proteína por completo (Robey et al., 2001). Esta funcionalidade parcial, bem como algumas vantagens em possuir o alelo, foram comprovadas em alguns casos (Ferenci, 2003; Subbarayan e Sarkar, 2004a, b) assim como em experimentos realizados neste estudo (ver seções 4.1.1 e 4.2.1).

Ferenci (2003) relatou que em condições de estresse associadas à limitação nutricional, onde a expressão de genes dependentes de σ^D é necessária, são preferencialmente selecionadas mutações que atenuem a expressão de σ^S ao invés de mutações nulas em *rpoS*. Perder completamente o fator σ^S em determinados casos implicaria em perder a resistência ao estresse. Desta forma, a seleção de mutações âmbar em *rpoS* confere a atividade parcial de σ^S , solucionando o balanço necessário em condições combinadas de estresse e carência nutricional extremas.

Embora já relatado que a atividade parcial de RpoSam tenha vantagens, a possível tradução menos eficiente de *rpoS* a partir do ATG alternativo, que resulta em uma baixa quantidade de proteínas traduzidas (Subbarayan e Sarkar, 2004a), seria uma provável explicação para a cepa *rpoSam* se comportar em algumas situações como um mutante nulo, bem como explicaria a falha em detectar uma banda correspondente à proteína truncada em ensaios de western-blot. Apesar de Subbarayan e Sarkar (2004a) haverem mostrado uma banda de 30 kDa supostamente correspondente à proteína truncada quando o gene *rpoSam* foi super-expresso a partir de um plasmídio (Figura 18), nós não conseguimos repetir este feito, mesmo quando *rpoSam* foi clonada sob controle do promotor *P_{tac}* e induzida por IPTG (dados não apresentados).

Figura 18 - M corresponde ao marcador Low Mol. Wt. Marker (Bio-Rad, USA). Linha 1, σ^S purificado. Linha 2, corresponde a cepa selvagem para RpoS. Linhas 3 e 4 correspondem ao plasmídio contendo o alelo truncado de RpoS, p25*rpoSAm* antes e depois da indução por IPTG, respectivamente.

Fonte: modificado de Subbarayan e Sarkar (2004a).

A inserção da etiqueta SPA em *rpoSam* pareceu ser uma alternativa promissora para incrementar o sinal e auxiliar na detecção da proteína truncada. Hu et al. (2009) detectaram a expressão de cerca de 1200 proteínas nas quais SPA havia sido inserida. Grande parte destas proteínas não haviam sido detectadas anteriormente devido a baixa expressão dos genes que as codificam. Em um trabalho recente, Babu e colaboradores também utilizaram esta marcação para detecção de proteínas de interesse (Babu et al., 2011). Apesar de não termos ainda conseguido visualizar a proteína RpoS truncada, já mostramos que a inserção da etiqueta SPA em *rpoS*⁺ resulta em uma proteína viável e de tamanho compatível com o esperado. Em um próximo passo, SPA será inserido em *rpoSam* por transdução ou por recombinação homóloga e os ensaios de western-blot serão repetidos.

6 CONCLUSÕES

O papel da proteína RpoS é fundamental para a adaptação da bactéria frente à situações adversas. A partir dos resultados obtidos neste estudo, foi possível aprofundar nosso conhecimento sobre a versão truncada de RpoS.

- Em relação à expressão de genes dependentes de σ^s e σ^d foi possível observar que este alelo se comportou como um mutante nulo em alguns casos. Entretanto, se destacou em outros apresentando um efeito positivo sobre a transcrição de *phoA* e *proU*.
- Situações de estresse testadas revelaram um comportamento sensível da cepa contendo *rpoSam*, ocasionado provavelmente pela tradução ineficiente a partir do Shine-dalgarno alternativo, que tem dificuldade em ligar-se ao ribossomo. No caso do estresse osmótico, a cepa *rpoSam* mostrou ter um nível intermediário de resistência.
- O alelo truncado de RpoS não foi detectado em *immunoblots*. Porém, a perspectiva de tornar RpoS truncada mais imunogênica com a inserção de uma etiqueta SPA poderá favorecer sua detecção.

REFERÊNCIAS*

Aguena M, Yagil E, Spira B. Transcriptional analysis of the *pst* operon of *Escherichia coli*. Mol Genet Genomics. 2002;268(4):518-24.

Aguena M, Spira B. Transcriptional Processing of the *pst* Operon of *Escherichia coli*. Curr Microbiol. 2009;58:264-7.

Atlung T, Nielsen HV, Hansen FG. Characterisation of the allelic variation in the *rpoS* gene in thirteen K12 and six other non-pathogenic *Escherichia coli* strains. Mol Genet Genomics. 2002;266(5):873-81.

Babu M, Aoku H, Chowdhury WQ, Gagarinova A, Graham C, Phanse S, Laliberte B, Sunba N, Jessulat M, Golshani A, Emili A, Greenblatt JF, Ganoza CM. Ribosome-Dependent ATPase Interacts with Conserved Membrane Protein in *Escherichia coli* to Modulate Protein Synthesis and Oxidative Phosphorylation. PLoS One. 2011;6(4). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21556145> [2011 May 10].

Baek JH, Lee SY. Novel gene members in the Pho regulon of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett. 2006;264(1):104-9.

Behmardi P, Grewal E, Kim Y, Yang HN. RpoS-Dependant Mechanism is Required for Cross Protection Conferred to Hyperosmolarity by Heat Shock. JEMI. 2009;13:18-21.

Bearson BL, Lee IS, Casey TA. *Escherichia coli* O157 :H7 glutamate- and arginine-dependent acid-resistance systems protect against oxidative stress during extreme acid challenge. Microbiology. 2009;155(3):805-12.

Belin D. Why are suppressors of amber mutations so frequent among *Escherichia coli* K12 strains?. A plausible explanation for a long-lasting puzzle. Genetics. 2003;165(2):455-6.

Bhagwat AA, Chan L, Han R, Tan J. Characterization of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Strains Based on Acid Resistance Phenotypes. Infection and Immunity. 2005;73(8):4993-5003.

* De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

Borukhov S, Nudler E. RNA polymerase: the vehicle of transcription. *Cell Press*. 2007;16(3):126-34.

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.

Browning DF, Busby SJ. The regulation of bacterial transcription initiation. *Nat Rev Microbiol*. 2004;2(1):57-65.

Burgess RR, Anthony L. How sigma docks to RNA polymerase and what sigma does. *Curr Opin Microbiol*. 2001;4(2):126-31.

Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Int Microbiol*. 2000;3(1):3-8.

Cairney J, Booth IR, Higgins CF. Osmoregulation of Gene Expression in *Salmonella typhimurium*: *proU* Encodes an Osmotically Induced Betaine Transport System. *J Bacteriol*. 1985;164(3):1224-32.

Chan FY, Torriani A. PstB Protein of the Phosphatase-Specific Transport System of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1996;178(13):3974-7.

Chiang SM, Schellhorn HE. Evolution of the RpoS regulon: origin of RpoS and the conservation of RpoS-dependent regulation in bacteria. *J Mol Evol*. 2010;70(6): 557–71.

Colland F, Barth M, Hengge-Aronis R, Kolb A. sigma factor selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase: role for CRP, IHF and Irp transcription factors. *EMBO J*. 2000;19(12):3028-37.

Dattananda CS, Rajkumari K, Gowrishankar J. Multiple mechanisms contribute to osmotic inducibility of *proU* operon expression in *Escherichia coli*: demonstration of two osmoresponsive promoters and of a negative regulatory element within the first structural gene. J Bacteriol. 1991;173(23):7481-90.

Dong T, Chiang SM, Joyce C, Yu R, Schellhorn HE. Polymorphism and selection of *rpoS* in pathogenic *Escherichia coli*. BMC Microbiology. 2009;9:118. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/9/118/abstract> [2009 Dec 6].

Farrell MJ, Finkel SE. The growth advantage in stationary-phase phenotype conferred by *rpoS* mutations is dependent on the pH and nutrient environment. J Bacteriol. 2003;185(24):7044-52.

Feklistov A, Darst SA. Promoter recognition by bacterial alternative σ factors: the price of high selectivity? Genes Dev. 2009;23: 2371-5.

Ferenci T. What is driving the acquisition of *mutS* and *rpoS* polymorphisms in *Escherichia coli*? Trends Microbiol. 2003;11(10):457-61.

Ferenci T. Maintaining a healthy SPANC balance through regulatory and mutational adaptation. Mol Microbiol. 2005;57(1):1-8.

Finkel SE. Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. Nat Rev Microbiol. 2006;4(2):113-20.

Fischer D, Teich A, Neubauer P, Hengge-Aronis R. The general stress sigma factor sigmaS of *Escherichia coli* is induced during diauxic shift from glucose to lactose. J Bacteriol. 1998;180(23):6203-6.

Gaal T, Ross W, Estrem ST, Nguyen LH, Burgess RR, Gourse RL. Promoter recognition and discrimination by $E\sigma^S$ RNA polymerase. *Mol Microbiol.* 2001; 42(4):939-54.

Gentry DR, Hernandez VJ, Nguyen LH, Jensen DB, Cashel M. Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp. *J Bacteriol.* 1993;175(24):7982-9.

Gowrishankar J. Nucleotide Sequence of the Osmoregulatory *proU* Operon of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1989;171(4):1923-31.

Gualerzi CO, Giuliadori AM, Pon CL. Transcriptional and Post-transcriptional Control of Cold-shock Genes. *J Mol Biol.* 2003;331(3): 527–39.

Hengge-Aronis R. Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell.* 1993;72(2):165-8.

Hengge-Aronis R. Interplay of global regulators and cell physiology in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr Opin Microbiol.* 1999;2(2):148-52.

Hengge-Aronis R. A role for the sigma S subunit of RNA polymerase in the regulation of bacterial virulence. *Adv Exp Med Biol.* 2000;485: 85-93.

Hengge-Aronis R. Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002;66(3):373-95.

Hengge, R. Proteolysis of σ^S (RpoS) and the general stress response in *Escherichia coli*. *Res Microbiol.* 2009;160(9): 667-76.

Hernandez VJ, Cashel M. Changes in conserved region 3 of *Escherichia coli* sigma 70 mediate ppGpp-dependent functions in vivo. *J Mol Biol.* 1995;252(5): 536-49.

Hu P, Janga SC, Babu M, Diaz-Meji J, Butland G, Yang W, Pogoutse O, Guo X, Phanse S, Wong P, Chandran S, Christopoulos C, Nazarians-Armavil A, Nasser NK, Musso G, Nazemof MN, Eroukova V, Golshani A, Paccanaro A, Greenblatt JF, Moreno-Hagelsieb G, Emili, A. Global Functional Atlas of *Escherichia coli* Encompassing Previously Uncharacterized Proteins. *PLoS Biology.* 2009;7(4). Available from; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19402753> [2010 Nov 13].

Ishihama A. Functional modulation of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Annu Rev Microbiol.* 2000;54:499-518.

Ivanova A, Renshaw M, Guntaka RV, Eisenstark A. DNA base sequence variability in *katF* (putative sigma factor) gene of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Research.* 1992;20(20):5479-80.

Jones PG, Vanbogelen RA, Neidhardt FC. Induction of Proteins in Response to Low Temperature in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1987;169(5):2092-5.

Kabir MS, Sagara T, Oshima T, Kawagoe Y, Mori H, Tsunedomi R, Mamoru Y. Effects of mutations in the *rpoS* gene on cell viability and global gene expression under nitrogen starvation in *Escherichia coli*. *Microbiology.* 2004;150(8): 2543- 53.

Kandror O, DeLeon A, Goldberg AL. Trehalose synthesis is induced upon exposure of *Escherichia coli* to cold and is essential for viability at low temperatures. *PNAS.* 2002;99(15):9727-32.

Khil PP, Camerini-Otero D. Over 1000 genes are involved in the DNA damage response of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2002;44(1):89–105.

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 Dev.* 1994;8(13):1600-12.

Lange R, Fischer D, Hengge-Aronis R. Identification of transcriptional start sites and the role of ppGpp in the expression of *rpoS*, the structural gene for the sigma S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1995;177(16): 4676-80.

Lee SJ, Gralla JD. Sigma38 (*rpoS*) RNA polymerase promoter engagement via -10 region nucleotides. *J Biol Chem.* 2001;276(32):30064-71.

Levinthal C, Signer ER, Fetherolf K. Reactivation and hybridization of reduced alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1962;48:1230-7.

Loewen PC, Triggs BL. Genetic Mapping of *katF*, a locus that with *katE* Affects the Synthesis of a Second Catalase Species in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1984; 160(2):668-75.

Loewen PC, Hu B, Strutinsky J, Sparling R. Regulation in the *rpoS* Regulon of *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Microbiology.* 1998;44(8):707-17.

Maeda H, Fujita N, Ishihama A. Competition among seven *Escherichia coli* sigma subunits: relative binding affinities to the core RNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(18): 3497-503.

Majdalani N, Cunnig C, Sledjeski D, Elliott T, Gottesman S. DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998; 95(21):12462-7.

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. J Mol Biol. 1989;210(3):551-9.

Makino K, Amemura M, Kim SK, Nakata A, Shinagawa H. Role of the sigma 70 subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*. Genes Dev. 1993;7(1):149-60.

Makino K, Amemura M, Kim SK, Yokoyama K, Kimura S. Mechanism of Transcriptional Activation of the Phosphate Regulon in *Escherichia coli*. J Microbiol. 1998;36(4):231-38.

Merrikh H, Ferrazzoli AE, Bougdour A, Olivier-Mason A, Lovett ST. A DNA damage response in *Escherichia coli* involving the alternative sigma factor, RpoS. PNAS. 2009;106(2). 611-8.

Miller JH. 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;1992.

Mukhopadhyay J, Kapanidis AN, Mekler V, Kortkhonjia E, Ebricht YW, Ebricht RH. Translocation of sigma(70) with RNA polymerase during transcription: fluorescence resonance energy transfer assay for movement relative to DNA. Cell. 2001; 106(4):453-63.

Mukhopadhyay J, Mekler V, Kortkhonjia E, Kapanidis AN, Ebricht YW, Ebricht RH. Fluorescence resonance energy transfer (FRET) in analysis of transcription-complex structure and function. Methods Enzymol. 2003;371:144-59.

Murphy KC, Campellone KG. Lambda Red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*. BMC Microbiology. 2003;4:11.

Nystrom T. Conditional senescence in bacteria: death of the immortals. *Mol Microbiol.* 2003;48(1):17-23.

Ohtake H, Kato J, Kuroda A, Wu H, Ikeda T. Regulation of bacterial phosphate taxis and polyphosphate accumulation in response to phosphate starvation stress. *J. Biosci.* 1998;23(4): 491-99.

Paget MS, Helmann JD. The sigma70 family of sigma factors. *Genome Biol.* 2003; 4(1):203.

Peterson CN, Mandel MJ, Silhavy TJ. *Escherichia coli* Starvation Diets: Essential Nutrients Weigh in Distinctly. *J of Bacteriol.* 2005;187(22):7549-53.

Poteete AR, Fenton AC, Murphy KC. Roles of RuvC and RecG in Phage lambda Red-Mediated Recombination. *J Bacteriol.* 1999;181(17):5402-8.

Potrykus K, Cashel M. (p)ppGpp: Still Magical?. *Annu Rev Microbiol.* 2008;62:35-51.

Rajkumari K, Gowrishankar J. An N-terminally truncated RpoS (sigma(S)) protein in *Escherichia coli* is active in vivo and exhibits normal environmental regulation even in the absence of *rpoS* transcriptional and translational control signals. *J Bacteriol.* 2002;184(12):3167-75.

Regulon DB. Operon *proU*. Disponível em: <http://regulondb.ccg.unam.mx/>. [2010 set 8].

Robey M, Benito A, Hutson RH, Pascual C, Park SF, Mackey BM. Variation in resistance to high hydrostatic pressure and *rpoS* heterogeneity in natural isolates of *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol.* 2001;67(10):4901-7.

Ruiz N, Silhavy TJ. Constitutive Activation of the *Escherichia coli* Pho Regulon Upregulates *rpoS* Translation in an Hfq-Dependent Fashion. *J Bacteriol.* 2003; 185(20):5984-92.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 2001. p. 1.124-1.125, A1.27.

Schellhorn HE, Audia JP, Wei LI, Chang L. Identification of conserved, RpoS-dependent stationary-phase genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1998; 180(23):6283-91.

Schurdell MS, Woodbury GM, McCleary WR. Genetic Evidence Suggests that the Intergenic Region between *pstA* and *pstB* Plays a Role in the Regulation of *rpoS* Translation during Phosphatase Limitation. *J Bacteriol.* 2007;189(3):1150-3.

Schweder T, Lee KH, Lomovskaya O, Martin A. Regulation of *Escherichia coli* Starvation Sigma Factor (σ^S) by ClpXP Protease. *J Bacteriol.* 1996;178(2):470-6.

Shaw WV. Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods Enzymol.* 1975;43:737-55.

Spira B, Yagil E. The integration host factor (IHF) affects the expression of the phosphate-binding protein and of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol.* 1999;38(2):80-5.

Spira B, Ferenci T. Alkaline phosphatase as a reporter of σ^S levels and *rpoS* polymorphisms in different *E. coli* strains. *Arch Microbiol.* 2008;189(1):43–7.

Spira B, Agüena M, Oliveira JVC, Yagil E. Alternative Promoters in the *pst* operon of *Escherichia coli*. *Mol. Genet. Genomics.* 2010; 284(6):489-98.

Steed PM, Wanner BL. 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.* 1993;175(21):6797-809.

Subbarayan PR, Sarkar M. *Escherichia coli rpoS* gene has an internal secondary translation initiation region. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004A;313(2): 294-9.

Subbarayan PR, Sarkar M. A stop codon-dependent internal secondary translation initiation region in *Escherichia coli rpoS*. *CSHL Press.* 2004B;10(9):1359-65.

Subbarayan PR, Sarkar M. A comparative study of variation in codon 33 of the *rpoS* gene in *Escherichia coli* K12 stocks: implications for the synthesis of sigma(s). *Mol Genet Genomics.* 2004c;270(6):533-8.

Sutherland L, Cairney J, Elmore MJ, Booth IR, Higgins C. Osmotic Regulation of Transcription: Induction of the *proU* Betaine Transport Gene Is Dependent on Accumulation of Intracellular Potassium. *J Bacteriol.* 1986;168(2):805-14.

Tanaka K, Takayanagi Y, Fujita N, Ishihama A, Takahashi H. Heterogeneity of the principal sigma factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product, sigma 38, is a second principal sigma factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(17):3511-5.

Taschner NP, Yagil E, Spira B. A differential effect of σ^S on the expression of the PHO regulon genes of *Escherichia coli*. *Microbiology.* 2004;150(9):2985-92.

Taschner NP, Yagil E, Spira B. The effect of IHF on σ^S selectivity of the *phoA* and *pst* promoters of *Escherichia coli*. *Arch Microbiol.* 2006;185:234-7.

Taschner NP. A regulação da fosfatase alcalina pelo fator σ^S da RNA Polimerase de *Escherichia coli* [tese (Doutorado em Microbiologia)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2006.

Torriani A. Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatases by *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*. 1960;38:460-9.

Typas A, Becker G, Hengge R. The molecular basis of selective promoter activation by the σ^S subunit of RNA polymerase. *Mol Microbiol*. 2007;63(5):1296-1306.

van Veen, HW. Phosphate transport in prokaryotes molecules, mediators and mechanisms. 1997. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1997;72(4):299-315.

Vidovic S, Mangalappalli AK, Korber DR. Prolonged cold stress response of *Escherichia coli* O157 and the role of *rpoS*. *Int J Food Microbiol*. 2011;146(2):163-9.

Vijayendran C, Polen T, Wendisch VF, Friehs K, Niehaus K, Flaschel E. The plasticity of global proteome and genome expression analyzed in closely related W3110 and MG1655 strains of a well-studied model organism, *Escherichia coli*-K12. *J Biotechnol*. 2007;128(4):747-61.

Wade JT, Struhl K, Busby SJW, Grainger DC. Genomic analysis of protein–DNA interactions in bacteria: insights into transcription and chromosome organization. *Mol Microbiol*. 2007;65(1):21-6.

Waldminghaus T, Skarstad K. ChIP on Chip: surprising results are often artifacts. *BMC Genomics*. 2010;11(414).

Waterman SR, Small PLC. Characterization of the Acid Resistance Phenotype and *rpoS* Alleles of Shiga-Like Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 1996; 64(7): 2808-11.

Weber A, Kogl SA, Jung K. Time-Dependent Proteome Alterations under Osmotic Stress during Aerobic and Anaerobic Growth in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 2006;188(20): 7165-75.

Weichert D, Lange R, Henneberg N, Hengge-Aronis R. Identification and characterization of stationary phase-inducible genes in *Escherichia coli*. Mol Microbiol. 1993;10(2):407–20.

White-Ziegler CA, Um S, Perez NM, Berns AL, Malhowski AJ, Young S. Low temperature (23 °C) increases expression of biofilm-, cold-shock- and RpoS-dependent genes in *Escherichia coli* K-12. Microbiology. 2008;154(1):148-66.

Wise A, Brems R, Ramakrishnan, V, Villarejo, M. Sequences in the -35 Region of *Escherichia coli* *rpoS* Dependent Genes Promote Transcription by $E\sigma^S$. J Bacteriol. 1996;178(10):2785-93.

Yamanaka K. Cold Shock Response in *Escherichia coli*. JMMB. 1999;1(2):193-202.

Yim HH, Villarejo M. *osmY*, a New Hyperosmotically Inducible Gene, Encodes a Periplasmic Protein in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 1992;174(11):3637-44.

Yim HH, Brems RL, Villarejo M. Molecular Characterization of the Promoter of *osmY*, an *rpoS*-Dependent Gene. J Bacteriol. 1994;176(1):100-7.

Yoshida M, Kashiwagi K, Kawai G, Ishihama A, Igarashi K. Polyamines Enhance Synthesis of the RNA Polymerase σ^{38} Subunit by Suppression of an Amber Termination Codon in the Open Reading Frame. J Biol Chem. 2002; 277(40):37139-46.

Zambrano MM, Siegele DA, Almiron M, Tormo A, Kolter R. Microbial competition: *Escherichia coli* mutants that take over stationary phase cultures. Science. 1993; 259(5102): 1757-60.

Zeghouf M, Li J, Butland G, Borkowska A, Canadien V, Richard D, Beattie B, Emili A, Greenblatt JF. Sequential Peptide Affinity (SPA) System for the Identification of Mammalian and Bacterial Protein Complexes. J Proteome Res. 2003;3(3):463-68.

ANEXO

RESEARCH ARTICLE

Open Access

The constancy of global regulation across a species: the concentrations of ppGpp and RpoS are strain-specific in *Escherichia coli*

Thomas Ferenci², Heloisa Filus Galbiati¹, Thu Betteridge², Katherine Phan² and Beny Spira^{1*}

Abstract

Background: Sigma factors and the alarmone ppGpp control the allocation of RNA polymerase to promoters under stressful conditions. Both ppGpp and the sigma factor σ^S (RpoS) are potentially subject to variability across the species *Escherichia coli*. To find out the extent of strain variation we measured the level of RpoS and ppGpp using 31 *E. coli* strains from the ECOR collection and one reference K-12 strain.

Results: Nine ECORs had highly deleterious mutations in *rpoS*, 12 had RpoS protein up to 7-fold above that of the reference strain MG1655 and the remainder had comparable or lower levels. Strain variation was also evident in ppGpp accumulation under carbon starvation and *spoT* mutations were present in several low-ppGpp strains. Three relationships between RpoS and ppGpp levels were found: isolates with zero RpoS but various ppGpp levels, strains where RpoS levels were proportional to ppGpp and a third unexpected class in which RpoS was present but not proportional to ppGpp concentration. High-RpoS and high-ppGpp strains accumulated *rpoS* mutations under nutrient limitation, providing a source of polymorphisms.

Conclusions: The ppGpp and σ^S variance means that the expression of genes involved in translation, stress and other traits affected by ppGpp and/or RpoS are likely to be strain-specific and suggest that influential components of regulatory networks are frequently reset by microevolution. Different strains of *E. coli* have different relationships between ppGpp and RpoS levels and only some exhibit a proportionality between increasing ppGpp and RpoS levels as demonstrated for *E. coli* K-12.

Background

Sigma factors direct RNA polymerase to various sets of promoters, and are at the centre of complex networks regulating gene expression in bacteria such as *Escherichia coli* [1,2]. Sigma factors are highly conserved in comparison to more specific regulators [1], but does genetic conservation imply functional conservation at the core of cell regulation? This is an important question in light of current systems biology efforts to construct models of regulatory behaviour [3-5]. There are instances where regulation differs between closely related bacteria [6-8] so how conserved is regulation, especially global regulation, within a species? We approach this question by measuring the concentration

of two cellular components with global regulatory roles in multiple members of the same species. We focus on two factors with complementary functions in switching between vegetative growth and stress-related gene expression. The RpoS sigma factor (σ^S), responds to stress and shifts transcription away from vegetative growth and towards stress resistance [9-12]. Higher levels of RpoS in stressed or stationary-phase cells alter expression of several hundred genes [13,14]. The alarmone ppGpp [15] also accumulates in bacteria undergoing stress, such as amino acid, carbon or phosphate limitation [16-19]. Accumulation of ppGpp triggers the stringent response and a radical decrease in ribosome and protein synthesis, even leading to growth arrest [20,21]. ppGpp and σ^S co-operate both mechanistically and strategically under stress and expression of σ^S -controlled genes is partly dependent on ppGpp [22,23]. The level of ppGpp also controls the amount of σ^S in

* Correspondence: benys@usp.br

¹Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

the cell, as ppGpp increases by several-fold the cellular concentration of σ^S during nutritional stress or in the stationary phase. The absence of ppGpp impairs or severely delays the accumulation of σ^S [9] and ppGpp positively affects the efficiency of *rpoS* translation under stress conditions as well as *rpoS* basal expression under conditions of optimal growth [24,25]. The response to phosphate starvation additionally involves stabilisation of RpoS protein sensed through SpoT [19]. At several levels then, ppGpp is intertwined with *rpoS* regulation and here we investigate the conservation of the level of these regulators across the species *E. coli*.

This study was prompted by several indications that RpoS and ppGpp were subject to strain variation. The *rpoS* gene is polymorphic in isolates of *E. coli* [26]. Recently, variations in ppGpp levels were also observed between laboratory strains of *E. coli* due to *spoT* mutations [21]. However, the assumption that *rpoS* is subject to extensive variation has been challenged [27]. These authors claimed that the endogenous RpoS levels are actually fairly conserved in *E. coli*. They also noted that the trade-off hypothesis was originally based on only two high-RpoS strains in [28].

Here, we study the hypothesis that stress-related gene expression is variable across the species *E. coli* because it involves a trade-off in the expression of genes related to stress resistance and vegetative growth [11]. The equilibrium between metabolic capacity essential during vegetative growth and stress resistance, the so-called SPANC (Self Preservation and Nutritional Competence) balance [11], is subject to selection in laboratory culture [28]. High levels of σ^S impair the growth of *E. coli* on poor carbon sources or

under nutrient limitation [28]. Stress resistance is not constant amongst all *E. coli* strains [28-30] also indicating possible variation in gene expression relating to RpoS and/or ppGpp. We demonstrate here that strain variation in ppGpp is one of several factors that contribute to the difference in the level of σ^S across the species *E. coli* and discuss the polymorphisms at the core of bacterial regulation.

Results

The goal of this study is three-fold: to provide evidence that *rpoS* polymorphism and variation in σ^S levels are widespread in the species *E. coli*; to show that the genes that control ppGpp synthesis and degradation are also subject to variation and finally to demonstrate that the different levels of RpoS are at least partially dependent on variability of endogenous ppGpp.

Strain variation in RpoS levels in the species *E. coli*

To test the extent of variation in RpoS levels, we analysed 31 strains from the ECOR collection of *E. coli* isolates from various locations and environments [31]. The 72 ECOR strains are divided into five phylogenetic groups (A, B1, B2, D and E). Nine of the strains tested here belonged to group A, 7 to group B1, 10 to group B2 and 5 to group D. The K-12 strain MG1655 was used as a control reference. As shown in Figure 1, the cellular content of RpoS was highly variable in standardised overnight cultures. Nine isolates had no detectable RpoS, another five had RpoS level 3 to 7-fold above that of the laboratory K-12 strain MG1655. The remainder of strains had levels within a 2-fold range around MG1655. The absence of RpoS from the nine strains

Figure 1 Quantitation of RpoS. Overnight bacterial cultures grown in LB were harvested, lysed and their total protein content resolved by SDS-PAGE. Proteins were immunoblotted with anti-RpoS monoclonal antibodies. The bands were scanned and quantified. Densitometric measurements were normalised against ECOR 56 to which was assigned 100 units. Relative values represent the mean $\pm$ S.E. of at least three independent experiments.

Table 1 Sequence analysis of *rpoS* in twenty-two ECOR strains

Strain	^a <i>rpoS</i> PCR fragment size	^b Change in nucleotide sequence	^b Change in amino acid sequence
ECOR02	1.3 Kb	C97G	Q33E
ECOR05	1.3 Kb	C97G,C942T	Q33E
ECOR08	1.3 Kb	C97G,C942T	Q33E
ECOR17	1.3 Kb	C97G, G377T, C942T	Q33E, G126V
ECOR18	1.3 Kb	C97G, Ω T392, C942T	Q33E, E132R, K133E, F134V, D135 amber *
ECOR20	1.3 Kb	T32G, C97G, C942T	L11 amber, Q33E *
ECOR22	1.3 Kb	C97G, C777T, C942T	Q33E
ECOR28	4.2 Kb	Ω A269	Frameshift after aa R85 *
ECOR32	4.2 Kb	C97G,G598T	Q33E, E200amber *
ECOR33	4.2 Kb	C97G, Ω A after nt494, Ω T after nt915	Q33E, frameshift after I165 *
ECOR45	4.2 Kb	Ω A518	Frameshift after aa 174 *
ECOR50	4.2 Kb	C264T, T270C, T357G, T462C, T549C, G564A, T573C, G819A	wild type
ECOR51	3.4 Kb	Ω T76, C97G,T163C, C264T, T357G, T462C, T573C, C732T, G819A, C987T	D26 amber *
ECOR54	3.4 Kb	Ω A after nt83, C97G, T163C, C264T, T357G, T462C, T573C, C732T, G819A, C987T	Q33E, frameshift after K28**
ECOR55	3.4 Kb	C97G, T163C, C264T, T357G, T462C, T573C, C732T, G819A, C987T	Q33E
ECOR56	3.4 Kb	C97G, T163C, T357G, G377A, T462C, T573C, C732T, G819A, C987T	Q33E, G126E
ECOR58	4.2 Kb	C97G, C672T	Q33E
ECOR59	3.4 Kb	C97G, G124T, T163C, T339C, T357G, C405T, T462C, T573C, C732T	Q33E, E42 amber and frameshift after aa S186 *
ECOR63	3.4 Kb	C97G, T163C, T357G, C405T, T462C, T573C, C732T, G990A	Q33E
ECOR66	3.4 Kb	C97G, T163C, T357G, C421T, T462C, T573C, C732T	Q33E, R141C
ECOR69	4.2 Kb	C97G	Q33E
ECOR70	1.3 Kb	Δ nt94-nt121 (28nts)	Δ aa32-41 (10aas) *

^a The PCR product covering the *rpoS* gene was of differing size, consistent with variation in the *rpoS-mutS* region in the species *E. coli* [34]. The 1.3 Kb fragment corresponds to *E. coli* K-12, and the 4.2 Kb and 3.4 Kb products are equivalent to regions found by [35,36].

^b The comparison is to the *E. coli* K-12 *rpoS* sequence.

* Not detectable RpoS in immunoblots (see Figure 1).

** Truncated RpoS, as described [63].

was confirmed by screening for σ^S -related phenotypes (glycogen accumulation [32] and catalase activity [33]; results not shown).

rpoS sequences in ECOR strains

Variation in the *rpoS* locus was already indicated by the observation that PCR amplification of the *rpoS* region resulted in fragments of three different sizes, as shown in Table 1. These differences were consistent with the genomic variation in the *rpoS-mutS* region in the species *E. coli* [34]. The size of fragments and sequence matches correspond to previously described *rpoS* regions, with the 1.3 Kb fragment like that in *E. coli* K-12, and the 4.2 Kb and 3.4 Kb products similar to those found in [35] and [36] respectively. Sequencing of the *rpoS* gene in 22 ECOR strains (Table 1) representing high, low and null RpoS phenotypes indicated highly deleterious mutations (nonsense or frameshift) resulting in stop codons in *rpoS* in all ECORs with no detectable RpoS. That nearly a third of strains

carried mutations in *rpoS* is striking, but not inconsistent with previous data with other *E. coli* strains. Bhagwat et al. [37] found that an introduced plasmid with wild-type *rpoS* was able to restore resistance in 20 acid-sensitive isolates amongst 82 pathogenic *E. coli* isolates tested. Similar results were obtained by [38]. Hence *rpoS*-defective strains consistently constitute 20-30% of natural isolates.

The strains with high levels of RpoS were also sequenced for *rpoS*, but were mainly similar to the K-12 sequence. As shown in Table 1, several contained the commonly observed Q33E difference found amongst many K-12 strains but which has similar functional activity [39]. There is a G126 substitution to E or V in two of the five strains with high RpoS, but the significance of this is not clear. Two isolates with very low RpoS levels (ECOR2, ECOR22) had the same amino acid sequence as the strain with highest protein (ECOR69) so the structural gene is not the essential cause of RpoS variation. Given the many regulatory

Figure 2 The rate of acquisition of *rpoS* mutations in nutrient-limited chemostats. ECOR strains were inoculated into glucose-limited chemostats and culture samples were withdrawn every 24 h for 4 days as previously described [32]. The aerobic chemostat populations were supplied with 0.02% glucose at a pH of 7, a temperature of 37°C and operating at a dilution rate of 0.1 h⁻¹. The lines represent the proportion of wild-type bacteria, and the error bars on points show the standard deviations between two replicate chemostats with each strain. RpoS levels of tested strains (data from Figure 1): ECOR5 (67.1); ECOR50 (14.5); ECOR55 (15.5); ECOR63 (10.5); ECOR66 (90.8); ECOR69 (107.0).

inputs affect RpoS protein levels [40], this is not altogether surprising; for example an *rssB* mutation can elevate RpoS level in some lab lineages [41].

RpoS loss in ECOR strains

The high level of σ^S in K-12 strains such as MC4100TF is associated with a measurably greater incidence of *rpoS* mutations in nutrient-limited populations than found with low- σ^S strains like MG1655 [28]. To see if the elevated RpoS in ECOR strains increased the selection pressure for *rpoS* mutations under nutrient limitation, the spread of *rpoS* mutations was followed in chemostat cultures limited by glucose, with all cultures growing at the same rate ($\mu = 0.1 \text{ h}^{-1}$). The rate of enrichment of *rpoS* mutations in Figure 2 showed that strains with higher levels (ECOR66, 69) accumulated significant numbers of *rpoS* mutations within three days of continuous culture. With some intermediate-level strains, *rpoS* mutations still proliferated in the culture, but more slowly. There was no absolute relationship between RpoS level and rate of *rpoS* sweeps because one strain (ECOR5) had fairly high σ^S but the culture accumulated mutations slowly, while another (ECOR55) had low- σ^S levels but the culture rapidly accumulated *rpoS* mutations. As in earlier data, MG1655 did not accumulate mutations in *rpoS* under these conditions [28]. Hence it is evident that mutational changes can

generally reassort RpoS levels in certain environments but differences between the strains besides RpoS levels need to be invoked to explain the extent of *rpoS* changes under glucose limitation. A possible difference is in the level of other global regulators affecting σ^S synthesis or degradation; below we investigate the variation in ppGpp as a possible contributor to RpoS variation.

Strain variation in ppGpp levels in the species *E. coli*

Recent experiments with laboratory strains [21] suggested that ppGpp levels were under SPANC selection and likely to be subjected to frequent microevolution under stress or under nutrient limitation. Initial experiments on some ECOR strains showed the kinetics of accumulation of ppGpp upon amino acid starvation (elicited by serine hydroxamate [42]) and carbon starvation (elicited by the addition of the inhibitor methyl- α -glucoside (α -MG [43]) were distinct. Amino acid starvation mainly operates through RelA and the level of ppGpp accumulation was quite similar in all strains (Figure 3b). In contrast in Figure 3a, it is evident that ppGpp response under carbon starvation was much more heterogeneous, consistent with variations in SpoT or its regulation by carbon starvation.

Based on the kinetics in Figure 3, the level of ppGpp appeared to stabilise at around 30 min (in agreement

with [44]) and a 30 min point was used to survey other ECOL strains. The levels of ppGpp measured under carbon starvation and amino acid starvation respectively are shown in Figure 4a and 4b. Overall, the stringent response with amino acid starvation was present and relatively constant in all strains (collective mean = 0.78, SD = 0.06, SD/mean = 0.08). On the other hand, the ppGpp levels triggered by α-MG addition varied over a much greater range (collective mean = 0.24, SD = 0.07,

SD/mean = 0.29), consistent with the more heterogeneous kinetics in Figure 3.

DNA sequencing of the *spoT* gene from four high- and four low-ppGpp strains in Figure 4 revealed a mutation common in several low-ppGpp strains. A T13N substitution not present in lab strains or high-ppGpp strains was found in ECOL50, 51, 53 and 63. Although there is no direct evidence implicating these substitutions in altered ppGpp levels, these polymorphisms and those found in

Figure 4 ppGpp levels of ECOR strains starved for carbon or amino acid. Cells were treated as in the legend of Figure 3, except that samples were withdrawn 30 minutes following the addition of α -MG or SH. ECORs 50, 51, 53 and 63 carry a T13N substitution in *spoT*. Bars represent the mean $\pm$ SD of three independent measurements.

laboratory strains [21] are possibly consistent with *spoT* being subject to microevolutionary pressures.

The relationship between ppGpp and RpoS levels in the species *E. coli*

As shown in Figure 5a, a plot of the measured ppGpp and RpoS levels in all the strains does not give a simple relationship in which RpoS concentration is proportional to ppGpp inside cells, as would be expected from extrapolating data on one K-12 strain [9]. Not surprisingly, strains with undetectable RpoS have various ppGpp levels. Some strains, such as ECOR44,36,5,56,17,66 and 69 do exhibit a proportionality between the two measured entities, unlike ECOR14,55,58,65,54 and MG1655, which fall on a plateau with a limited amount of RpoS. This separation of responses in the ECORs was reinforced by multivariate analysis, which identified the relationship between three groups of strains (Figure 5b).

Discussion

Sigma factors are high in the hierarchy of transcriptional regulators and are influenced by multiple environmental sensing pathways [45,46]. Molecules like ppGpp

contribute to altering the pattern of transcription through sigma factors [15] and affect many important bacterial characteristics [20,47-49]. We address the question of the constancy of σ^S and ppGpp function across a species, beyond an individual lab strain.

The variation in σ^S levels and their physiological consequences across *E. coli* strains has been demonstrated earlier [28], and led to the idea of a trade-off between stress resistance (in high-RpoS strains) and nutritional capability (better in low-RpoS strains) [11]. This conclusion has been questioned [27]. Based on measurements of RpoS levels in six *E. coli* isolates these authors found a six-fold difference in RpoS level, with the highest RpoS only 1.49-times the MG1655 level. They noted that the trade-off hypothesis was originally based on only two high-RpoS strains in [28]. The variation of RpoS levels therefore needed a deeper analysis. Here we show that there is a much larger range of variation in σ^S amongst the ECOR isolates than Ihssen et al. found with fresh-water isolates. Further, we detected here sequence polymorphisms that would not have been observable in the earlier comparative genome hybridisation analysis [27]. Our conclusions are also consistent with results on RpoS variation in other laboratories

Figure 5 The relationship between ppGpp and RpoS concentration in bacteria. (a) A plot of the RpoS concentration against ppGpp concentration for the numbered ECOR isolates. (b) Multivariate analysis was performed using non-metric multidimensional scaling and Gower similarity measures using the software *Past* [62]. The lines between points show the minimum spanning tree drawn by the program.

[30,39] and recent indications that RpoS levels are highly variable within clinical populations of *E. coli* [50].

The variation in σ^S levels is not simply a result of differences in *rpoS* sequence. Variation in ppGpp was

also evident in ECOR strains, revealing a possible diversifying influence on RpoS level and function [9,10]. ppGpp levels in ECOR strains showed dissimilarity particularly in response to carbon starvation.

Variation in ppGpp levels was less with amino acid deprivation, consistent with greater variation in *spoT* than *relA* function. The conservation in *relA* function is not surprising, since the main role of RelA and the stringent response is to control the translational machinery of the cell in response to intracellular amino acid availability. This regulation is likely to be a universal need and hence widely conserved. In contrast, the response to extracellular nutrient availability and carbon starvation, mediated through *spoT*, is subject to fluctuating environmental inputs.

The *spoT* gene is central to the ppGpp-dependent response of bacteria to changes in growth rate and nutrient starvation [20] so it was interesting to find that it is subject to polymorphism both in laboratory strains [21] and ECOR isolates of *E. coli*. It is probably no accident that *spoT* variations were already noted in some lab lineages [51]. Further genomic comparisons in a BLAST search followed by a global alignment showed that 15 of 50 *E. coli* commensal and pathogenic strains currently in the sequence database have one or two amino acid substitutions in SpoT and two K-12 derivatives carry a QD insertion at position 84, the same insertion that is present in MC4100 [21]. In contrast, we found variation in only four out of 50 RelA sequences and three of them have only a single amino acid substitution between similar amino acids. Distinct mutations in *spoT* were also found in *E. coli* after thousands of generations of laboratory growth on glucose [52], suggesting *spoT* is subject to selection under repeat-batch culture conditions as well.

The strain variation in the concentration of ppGpp was more extensive than the genetic variation in *spoT*. Our results suggests that, as with *rpoS*, differences in ppGpp between natural isolates can be due to polymorphism in extragenic regulatory genes or in stress signal processing, as well as polymorphisms in *spoT* itself. For example, the steady-state level of ppGpp is increased in a *cgtA* mutant [53], but the accumulation of ppGpp during amino acid starvation is not affected, exactly as we find in some ECOR strains. CgtA interacts with SpoT and is thought to maintain low ppGpp levels when bacteria are growing in a nutrient-rich environment [54]. Further work on genomic and signal processing changes is needed to define all the influences leading to ppGpp variation in ECOR strains.

Traxler et al. have recently shown that increasing concentrations of ppGpp during the progression of amino acid limitation precisely activate genes related to the Lrp and RpoS regulons at a different stages [55]. According to these authors full induction of RpoS-dependent genes requires high concentrations of ppGpp. However, accumulation of RpoS is not due simply to increased ppGpp, once a ppGpp⁰ strain still accumulates almost normal

amounts of RpoS, although with a considerable delay [9,25]. It is therefore conceivable that as an alternative to ppGpp regulation another redundant mechanism operates to induce RpoS. This redundancy may explain the difficulty in establishing a clear relationship between ppGpp and RpoS and the consequent imperfect relation between ppGpp and RpoS described here. This is even more true for a heterogeneous set of strains as the ECOR collection, with its wide genetic heterogeneity.

Due to the number of strains tested, a growth-independent system for eliciting starvation was used to induce *relA* and *spoT*-dependent ppGpp accumulation. Hence the serine analogue SH and glucose analogue α -MG were used to induce amino acid and carbon limitation respectively. It is believed that α -MG acts through competition with glucose, thus limiting its utilisation. However, a recent study challenged this idea and proposed an alternative mechanism for α -MG toxicity resulting in growth arrest [56]. This explanation is based on the toxicity of α -MG phosphate, which accumulates in the cytoplasm. Nevertheless, whether growth arrest is caused by α -MG toxicity and/or competition with glucose, ppGpp accumulation due to α -MG is dependent on SpoT, because it occurs in both wild-type and *relA* mutants [44]. Furthermore, ppGpp accumulation following phosphate exhaustion with selected ECOR strains resulted in similar differences to the ones observed for α -MG treatment (results not shown).

As described for the *spoT*⁺ and *spoT* variants of *E. coli* K12 [21], the nature of the *spoT* allele present in *E. coli* simultaneously influences the level of σ^S , stress resistance and nutritional capabilities of *E. coli*. The environmental influence on ppGpp regulation is affected by the same dichotomy already observed and discussed for RpoS [11], namely the fluctuating needs of the cell in response to nutrient limitation and stress resistance. Indeed, the variation in *spoT* resembles the polymorphisms in *rpoS*, which are, if anything, even more extensive [26,39]. These new results suggest that one or more of the genes involved in ppGpp synthesis and degradation is subject to the same kind of selective pressures as is *rpoS*. In this respect, *spoT* and *rpoS* are both involved in SPANC balancing within a bacterium in response to changes in the immediate environment and hunger for nutrients.

Conclusions

Two of the cellular components that control the allocation of transcriptional resources are strain-specific, since ppGpp and σ^S levels are potentially non-uniform in *E. coli* under identical growth conditions. A significant complication in the systems biology of *E. coli* is that even the regulatory relationship between ppGpp and RpoS is non-uniform across the species. The data from K-12 studies suggests ppGpp should stimulate RpoS synthesis, but the

level of RpoS is not equally stimulated by high ppGpp in all ECOR isolates. As shown in Figure 5, there appear to be three groups of strains based on ppGpp/RpoS relationships, and in only one of these there is a discernible proportionality between ppGpp and RpoS concentrations. So not only is there likely to be variation in individual components, but also variation in the interaction of components of global networks. The new results suggest that the genes involved in ppGpp synthesis and degradation are also subject to the same kind of selective pressures as is *rpoS*. This has major consequences for the universality of the pattern of expression of hundreds of genes controlled directly or indirectly (by competition) at the level of RNA polymerase. The species-wide variation in the cellular concentration of two global directors of gene expression has significant implications for systems biology, because these regulators control many metabolic genes as well as gene expression networks [5,14]. Equally importantly, many of the numerous traits controlled by ppGpp [20,47-49] are also likely to be subject to strain variation.

Methods

Strains and media

The origins of the ECOR strains is described in [31] and the reference K-12 strain MG1655 was used for comparisons.

T-salts is a Tris-buffered minimal medium supplemented with different concentrations of glucose and KH_2PO_4 [18]. Minimal medium A (MMA) and L-agar plates were as in [57].

Sequence analysis

The *rpoS* gene from different ECOR strains was amplified using the "universal" primer pair RpoS-F2 (5'-CCAT AACGACACAATGCTGG) and RpoS-R2 (5'-CG ACCATTCTCGGTTTACC). PCR products were purified directly with Wizard DNA Preps DNA purification system (Promega). The nucleotide sequence of the *rpoS* gene was determined using either primer RpoS-F1 (5'-TGATTACCTGAGTGCCTACG) or RpoS-F2 for the first half and primer RpoS-I (5'-CTGTTAACG GCCGAAGAAGA) for the second half of gene.

For the sequencing of the *spoT* ORF, DNA was amplified by PCR using primers *spoTF1* (5'-CAGTATCAT GCCCAGTCATTCTTC) and *spoTR2* (5'-GGTAGT ACTGGTTTCGCCGTGCTC). Sequencing analysis of both DNA strands were performed with primers *spoTF1*, *spoTF2* (5'-AAAAGCGTCGCCGAGCTGGTA GAGG), *spoTF3* (5'-TGATCGGCCCGCACGGTGT GCCGG), *spoTF5* (5'-TGATCGGCCCGCACGGT GTGCCGG), *spoTR1* (5'-TGCACCATCGCCATAAT CATCTTGC), *spoTR2* and *spoTR3* (5'-CTTGATTTC GGTGATGAACCTCCTG). All sequence reactions were done at the Australian Genome Research Facility.

ppGpp assay

ppGpp was extracted from cells growing at 37°C in minimal medium containing 100 $\mu\text{Ci/ml}$ $^{32}\text{P-KH}_2\text{PO}_4$. For ppGpp extraction from C-starved ECOR strains, exponentially-growing cells were resuspended in T-salts supplemented with 0.1% glucose, 0.25 mM $^{32}\text{P-KH}_2\text{PO}_4$ and all 20 amino acids (30 $\mu\text{g/ml}$ each) and grown for another 60 minutes. Methyl α -glucoside (α -MG) was then added at a final concentration of 2% and samples were withdrawn after 30 minutes in the single-point experiments or at several time intervals in the kinetic experiments.

Extraction of ppGpp from amino acid-starved cells was as above except that amino acid starvation was started by adding 1 mg/ml serine hydroxamate (SH) to the cultures.

The labelled samples were mixed immediately with 0.5 volume of cold formic acid and stored overnight at -20°C. The extracts were centrifuged for 5 minutes at 10,000 rpm to precipitate cell debris, and 3-5 μl were applied to PEI-cellulose TLC-plates. The labelled nucleotides were resolved by one-dimensional TLC using 1.5 M KH_2PO_4 as solvent. The amounts of ppGpp on the chromatograms were estimated by measuring the radioactivity of the spots in a Phosphor-Imager (Molecular Dynamics) and calculating the level of ppGpp relative to that of GTP + ppGpp [58]. The densitometric analysis was performed with the help of the Image J free software (available at <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Steady-state growth conditions in chemostats

T-salts supplemented with 0.02% glucose and 1.0 mM KH_2PO_4 was used to set up a 80 ml chemostat culture as described [32]. The dilution rate was set to 0.1 h^{-1} . Daily samples were taken to monitor the *rpoS* status of members of the population. The *rpoS* status was determined by diluting the culture, growing the colonies on LB plates and staining with iodine (see below).

Detection of *rpoS* status by iodine staining

The level of *rpoS* was qualitatively assessed by staining glycogen with an iodine solution as described [59]. Patches of bacteria or diluted chemostat samples were grown overnight on L-agar plates, stored at 4°C for 24 h and then flooded with iodine. The intensity of the brown colour varies according to the level of σ^S in the cell [28,60]. *rpoS*⁺ strains stain brown to dark brown.

Quantitation of RpoS blots

Bacteria cultures were grown overnight in LB medium at 37°C. LB medium possesses a limiting amount of amino acids that serve as main carbon sources. *E. coli* stops growing following overnight growth due to carbon depletion [61]. Culture volumes corresponding to 2. 10^9 cells

were then centrifuged, resuspended in 200 µl application buffer (0,5 M Tris-HCl, 2% SDS, 5% 2-mercaptoethanol, 10% glycerol and 0,01% bromophenol blue) and boiled for 5 minutes. Proteins were resolved by SDS-PAGE in a 12,5% gel and transferred to a nitrocellulose membrane (GE HealthCare) by capillary force. Following blocking with 5% skim milk, the membrane was incubated with 2,000-fold diluted monoclonal anti-RpoS antibodies (Neoclone) and 20,000 fold diluted peroxidase conjugated anti-mouse IgG (Pierce). The Super Signal West Pico kit (Pierce) was used to detect the RpoS bands as recommended by the manufacturer. The membrane was exposed to X-ray films for various periods of time and the signal intensities on the autoradiograms were scanned and computed using the Image J software.

Acknowledgements

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP- Brazil) and an Australian Endeavour Research Fellowship (to BS), as well as the Australian Research Council (to TF).

Author details

¹Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo-SP, Brazil. ²School of Molecular and Microbial Biosciences, The University of Sydney, NSW 2006 Australia.

Authors' contributions

TF conceived and designed the study, wrote and corrected the manuscript. HFG, TB and KP carried out the experimental work. BS performed experiments, conceived and designed the study, wrote and corrected the manuscript. All authors read and approved the final version of this manuscript.

Received: 19 January 2011 Accepted: 25 March 2011

Published: 25 March 2011

References

- Martínez-Antonio A, Janga SC, Thieffry D: Functional organisation of *Escherichia coli* transcriptional regulatory network. *J Mol Biol* 2008, **381**:238-247.
- Seshasayee ASN, Bertone P, Fraser GM, Luscombe NM: Transcriptional regulatory networks in bacteria: from input signals to output responses. *Curr Opin Microbiol* 2006, **9**:511-519.
- Karlebach G, Shamir R: Modelling and analysis of gene regulatory networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008, **9**:770-780.
- Rodionov DA: Comparative genomic reconstruction of transcriptional regulatory networks in bacteria. *Chem Rev* 2007, **107**:3467-3497.
- Cho B, Charusanti P, Herrgård MJ, Palsson BO: Microbial regulatory and metabolic networks. *Curr Opin Biotechnol* 2007, **18**:360-364.
- Winfield MD, Groisman EA: Phenotypic differences between *Salmonella* and *Escherichia coli* resulting from the disparate regulation of homologous genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:17162-17167.
- Sawers RG: Expression of *fmr* is constrained by an upstream IS5 insertion in certain *Escherichia coli* K-12 strains. *J Bacteriol* 2005, **187**:2609-2617.
- Lintner RE, Mishra PK, Srivastava P, Martínez-Vaz BM, Khodursky AB, Blumenthal RM: Limited functional conservation of a global regulator among related bacterial genera: Lrp in *Escherichia*, *Proteus* and *Vibrio*. *BMC Microbiol* 2008, **8**:60.
- Gentry DR, Hernandez VJ, Nguyen LH, Jensen DB, Cashel M: Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma S is positively regulated by ppGpp. *J Bacteriol* 1993, **175**:7982-9.
- Jishage M, Kvint K, Shingler V, Nyström T: Regulation of sigma factor competition by the alarmone ppGpp. *Genes Dev* 2002, **16**:1260-1270.
- Ferenci T: Maintaining a healthy SPANC balance through regulatory and mutational adaptation. *Mol Microbiol* 2005, **57**:1-8.
- Typas A, Becker G, Hengge R: The molecular basis of selective promoter activation by the sigmaS subunit of RNA polymerase. *Mol Microbiol* 2007, **63**:1296-1306.
- Storz G, Hengge-Aronis R: *Bacterial stress responses* ASM Press; 2000.
- Weber H, Polen T, Heuveling J, Wendisch VF, Hengge R: Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* 2005, **187**:1591-1603.
- Potrykus K, Cashel M: (p)ppGpp: still magical? *Annu Rev Microbiol* 2008, **62**:35-51.
- Cashel M, Gallant J: Two compounds implicated in the function of the RC gene of *Escherichia coli*. *Nature* 1969, **221**:838-841.
- Lazzarini RA, Cashel M, Gallant J: On the regulation of guanosine tetraphosphate levels in stringent and relaxed strains of *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1971, **246**:4381-4385.
- Spira B, Silberstein N, Yagil E: Guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi. *J Bacteriol* 1995, **177**:4053-8.
- Bougoudour A, Gottesman S: ppGpp regulation of RpoS degradation via anti-adaptor protein IraP. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:12896-12901.
- Cashel M, Gentry DM, Hernandez VJ, Vinella D: The stringent response. In *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, Volume 1. Edited by: Neidhart FC (Ed. in Chief). American Society for Microbiology Washington, D.C.; 1996:1458-1496.
- Spira B, Hu X, Ferenci T: Strain variation in ppGpp concentration and RpoS levels in laboratory strains of *Escherichia coli* K-12. *Microbiology* 2008, **154**:2887-95.
- Kvint K, Farewell A, Nyström T: RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate for induction even in the presence of high levels of sigma(S). *J Biol Chem* 2000, **275**:14795-14798.
- Nyström T: Growth versus maintenance: a trade-off dictated by RNA polymerase availability and sigma factor competition? *Mol Microbiol* 2004, **54**:855-862.
- Brown L, Gentry D, Elliott T, Cashel M: DksA affects ppGpp induction of RpoS at a translational level. *J Bacteriol* 2002, **184**:4455-65.
- Hirsch M, Elliott T: Role of ppGpp in *rpoS* stationary-phase regulation in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2002, **184**:5077-5087.
- Ferenci T: What is driving the acquisition of *mutS* and *rpoS* polymorphisms in *Escherichia coli*? *Trends Microbiol* 2003, **11**:457-61.
- Ihssen J, Grasselli E, Bassin C, François P, Piffaretti J, Köster W, Schrenzel J, Egli T: Comparative genomic hybridization and physiological characterization of environmental isolates indicate that significant (eco)-physiological properties are highly conserved in the species *Escherichia coli*. *Microbiology (Reading, Engl)* 2007, **153**:2052-2066.
- King T, Ishihama A, Kori A, Ferenci T: A regulatory trade-off as a source of strain variation in the species *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2004, **186**:5614-20.
- Large TM, Walk ST, Whittam TS: Variation in acid resistance among shiga toxin-producing clones of pathogenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:2493-2500.
- Bhagwat AA, Tan J, Sharma M, Kothary M, Low S, Tall BD, Bhagwat M: Functional heterogeneity of RpoS in stress tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains. *Appl Environ Microbiol* 2006, **72**:4978-4986.
- Ochman H, Selander RK: Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* 1984, **157**:690-3.
- Notley-McRobb L, King T, Ferenci T: *rpoS* mutations and loss of general stress resistance in *Escherichia coli* populations as a consequence of conflict between competing stress responses. *J Bacteriol* 2002, **184**:806-811.
- Mulvey MR, Loewen PC: Nucleotide sequence of *katF* of *Escherichia coli* suggests KatF protein is a novel sigma transcription factor. *Nucleic Acids Res* 1989, **17**:9979-9991.
- Kotewicz ML, Brown EW, Eugene LeClerc J, Cebula TA: Genomic variability among enteric pathogens: the case of the *mutS-rpoS* intergenic region. *Trends Microbiol* 2003, **11**:2-6.
- LeClerc JE, Li B, Payne WL, Cebula TA: Promiscuous origin of a chimeric sequence in the *Escherichia coli* O157:H7 genome. *J Bacteriol* 1999, **181**:7614-7617.
- Culham DE, Wood JM: An *Escherichia coli* reference collection group B2- and uropathogen-associated polymorphism in the *rpoS-mutS* region of the *E. coli* chromosome. *J Bacteriol* 2000, **182**:6272-6276.

37. Bhagwat AA, Chan L, Han R, Tan J, Kothary M, Jean-Gilles J, Tall BD: Characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* strains based on acid resistance phenotypes. *Infect Immun* 2005, **73**:4993-5003.
38. Waterman SR, Small PL: Characterization of the acid resistance phenotype and *rpoS* alleles of shiga-like toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1996, **64**:2808-2811.
39. Atlung T, Nielsen HV, Hansen FG: Characterisation of the allelic variation in the *rpoS* gene in thirteen K12 and six other non-pathogenic *Escherichia coli* strains. *Mol Genet Genomics* 2002, **266**:873-81.
40. Hengge-Aronis R: Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma(S) (*RpoS*) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* 2002, **66**:373-95.
41. Ferenci T, Zhou Z, Betteridge T, Ren Y, Liu Y, Feng L, Reeves PR, Wang L: Genomic sequencing reveals regulatory mutations and recombinational events in the widely used MC4100 lineage of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 2009, **191**:4025-4029.
42. Metzger S, Schreiber G, Aizenman E, Cashel M, Glaser G: Characterization of the *relA1* mutation and a comparison of *relA1* with new *relA* null alleles in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1989, **264**:21146-21152.
43. Murray KD, Bremer H: Control of *spoT*-dependent ppGpp synthesis and degradation in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 1996, **259**:41-57.
44. Hansen MT, Pato ML, Molin S, Fill NP, von Meyenburg K: Simple downshift and resulting lack of correlation between ppGpp pool size and ribonucleic acid accumulation. *J Bacteriol* 1975, **122**:585-91.
45. Ferenci T: Sensing nutrient levels in bacteria. *Nat Chem Biol* 2007, **3**:607-608.
46. Gruber TM, Gross CA: Multiple sigma subunits and the partitioning of bacterial transcription space. *Annu Rev Microbiol* 2003, **57**:441-466.
47. Magnusson LU, Farewell A, Nystrom T: ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*. *Trends Microbiol* 2005, **13**:236-242.
48. Braeken K, Moris M, Daniels R, Vanderleyden J, Michiels J: New horizons for (p)ppGpp in bacterial and plant physiology. *Trends Microbiol* 2006, **14**:45-54.
49. 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. *Mol Microbiol* 2006, **61**:194-205.
50. Levert M, Zamfir O, Clermont O, Bouvet O, Lespinats S, Hipeaux MC, Branger C, Picard B, Saint-Ruf C, Norel F, Balliau T, Zivy M, Le Nagard H, Cruvellier S, Chane-Woon-Ming B, Nilsson S, Gudeli I, Phan K, Ferenci T, Tenaillon O, Denamur E: Molecular and evolutionary bases of within-patient genotypic and phenotypic diversity in *Escherichia coli* extraintestinal infections. *PLoS Pathog* 2010, **6**.
51. Laffler T, Gallant J: *spoT*, a new genetic locus involved in stringent response in *E. coli*. *Cell* 1974, **1**:27-30.
52. Cooper TF, Rozen DE, Lenski RE: Parallel changes in gene expression after 20,000 generations of evolution in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:1072-1077.
53. Jiang M, Sullivan SM, Wout PK, Maddock JR: G-protein control of the ribosome-associated stress response protein SpoT. *J Bacteriol* 2007, **189**:6140-6147.
54. Raskin DM, Judson N, Mekalanos JJ: Regulation of the stringent response is the essential function of the conserved bacterial G protein CgtA in *Vibrio cholerae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:4636-4641.
55. Traxler MF, Zacharia VM, Marquardt S, Summers SM, Nguyen H, Stark SE, Conway T: Discretely calibrated regulatory loops controlled by ppGpp partition gene induction across the 'feast to famine' gradient in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 2011, **79**:830-845.
56. Pikis A, Hess S, Arnold I, Erni B, Thompson J: Genetic requirements for growth of *Escherichia coli* K12 on methyl-alpha-D-glucopyranoside and the five alpha-D-glucosyl-D-fructose isomers of sucrose. *J Biol Chem* 2006, **281**:17900-17908.
57. Miller JH: *A Short Course In Bacterial Genetics: A Laboratory Manual And Handbook For Escherichia Coli And Related Bacteria* Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.; 1992.
58. Svitil AL, Cashel M, Zyskind JW: Guanosine tetraphosphate inhibits protein synthesis in vivo. A possible protective mechanism for starvation stress in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 1993, **268**:2307-11.
59. 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*. *Mol Microbiol* 1992, **6**:1877-1886.
60. Spira B, Ferenci T: Alkaline phosphatase as a reporter of sigma(S) levels and *rpoS* polymorphisms in different *E. coli* strains. *Arch Microbiol* 2008, **189**:43-47.
61. Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R: *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol* 2007, **189**:8746-8749.
62. Oyvind H, Harper DAT, Ryan PD: Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica* 2001, **4**:9.
63. Subbarayan PR, Sarkar M: A stop codon-dependent internal secondary translation initiation region in *Escherichia coli rpoS*. *RNA* 2004, **10**:1359-1365.

doi:10.1186/1471-2180-11-62

Cite this article as: Ferenci et al.: The constancy of global regulation across a species: the concentrations of ppGpp and RpoS are strain-specific in *Escherichia coli*. *BMC Microbiology* 2011 **11**:62.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit