MEIRE AGUENA

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DO OPERON *pst* DE
*Escherichia coli***

**Tese apresentada ao Instituto de
Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de
Doutora em Ciências
(Microbiologia)**

São Paulo

2007

MEIRE AGUENA

**ANÁLISE TRANSCRICIONAL DO OPERON *pst* DE
*Escherichia coli***

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

**Área de concentração:
Microbiologia**

Orientador: Profº Drº Beny Spira

São Paulo

2007

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

©reprodução total

Aguena, Meire

Análise transcricional do operon *pst* de *Escherichia coli* / Meire
Aguena. - - São Paulo, 2007.

Orientador: Beny Spira

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

Versão do título para o inglês: Transcriptional analysis of *pst* operon
of *Escherichia coli*.

Descritores: 1. *Escherichia coli* 2. RNA mensageiro 3 operon *pst*
4. Sequências REP 5. RNase E 6. Biologia molecular I. Spira Beny
II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. III. Título.

Aos meus pais e familiares pelo apoio moral e emocional;
pelo incentivo e apoio constante durante
todo o processo de minha formação.

AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro sem o qual este projeto não seria possível;

Ao Prof. Dr. Beny Spira pela oportunidade e pela orientação sempre disponível;

Aos colegas de laboratório André, Eduardo, Gerson, Juliana, Natália e Viviane pela amizade, pelos conselhos, pela ajuda durante a realização dos ensaios de bancada e pelas discussões científicas;

À Íris, Marlene e Alice pela amizade, pelo apoio técnico indispensável durante a realização deste trabalho e principalmente pelos conselhos e incentivo;

Aos professores e colegas do ICB que sempre incentivaram a pesquisa e ajudaram com a disponibilização de equipamentos, salas e reagentes;

Ao pessoal do grupo de seminário, pelos conselhos e sugestões;

Aos amigos Hiromi, Cássia, Tati Rondini, Dona Maria, Mara & Renato e Miki pela paciência, pelo incentivo e principalmente pelos conselhos tão necessários nas horas de estresse (tenha calma...!!!! não surte ainda... !!!);

Ao Chan pela compreensão e pela paciência (pesquisa é assim, às vezes a gente se empolga e não pára nem de final de semana...).

Enfim a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste trabalho.

RESUMO

O operon *pst* de *Escherichia coli* é formado pelos genes *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB* e *phoU*. Os quatro primeiros genes codificam proteínas que compõem um sistema de transporte do tipo ABC denominado Pst. O sistema Pst, junto com a proteína PhoU participa da repressão dos genes do regulon PHO. A transcrição dos genes do operon *pst* é induzida pela carência de fosfato inorgânico (Pi).

Neste trabalho, o padrão de transcrição do operon *pst* foi analisado. A existência de um transcrito primário instável foi comprovada através de uma nova técnica de RT-PCR. O papel da RNase E na degradação do mRNA de *pst* foi demonstrado.

A análise das seqüências intergênicas do operon revelou a importância da seqüência REP (Repetitive Extragenic Palindrome) localizada na região intergênica entre *pstS* e *pstC* na estabilização da mensagem de *pstS*. As seqüências localizadas a 5' dos genes *pstC*, *pstB* e *phoU* também foram analisadas e demonstraram uma atividade promotora fraca, que resulta na síntese de transcritos dos genes distais de *pst*.

ABSTRACT

The *pst* operon of *Escherichia coli* consists of the genes *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB* and *phoU*. The four proximal genes of the operon encode the proteins of the ABC-type Pi phosphate (Pi) transporter Pst. The Pst system, together with the PhoU protein, also acts as a negative regulator of the PHO regulon. Transcription of the *pst* genes is induced by Pi starvation.

The present study describes the transcription pattern of the *pst* operon. The existence of an unstable primary transcript was confirmed by using an improved RT-PCR protocol. The role of RNase E in *pst* transcript decay was demonstrated.

Analysis of the operon intergenic regions revealed the role of a REP sequence (Repetitive Extragenic Palindrome) located between *pstS* and *pstC* in *pst* mRNA stability. The regions upstream of *pstC*, *pstB* and *phoU* displayed promoter activity. Transcription from these internal promoters resulted in a small amount of mRNAs corresponding to the *pst* distal genes.

Lista de Ilustrações

Figura 1.	Promotores de genes pertencentes ao regulon PHO.....	20
Figura 2.	Sistema regulatório PhoB-PhoR	21
Figura 3.	Transporte de fosfato durante a carência de Pi	27
Figura 4.	Esquema representativo do operon <i>pst</i> de <i>E.coli</i>	28
Figura 5.	Esquema ilustrando a estabilização do mRNA por seqüências REP.....	36
Figura 6.	Seqüência REP localizada na região não codificadora entre <i>pstS</i> e <i>pstC</i>	37
Figura 7.	Estratégia de RT-PCR utilizada para identificar o transcrito primário de <i>pst</i>	51
Figura 8.	Estratégia de deleção da seqüência REP.....	56
Figura 9.	Análise de hibridização northern do operon <i>pst</i>	61
Figura 10.	Representação das sondas de DNA e dos transcritos do operon <i>pst</i> detectados através de hibridizações northern.....	62
Figura 11.	Detecção do transcrito primário do operon <i>pst</i>	64
Figura 12.	Efeito da RNase E sobre o padrão de transcrição de <i>pst</i>	68
Figura 13.	Efeito de mutações <i>rnc</i> sobre o padrão de transcrição de <i>pst</i>	69

Figura 14.	Efeito da mutação $\Delta mazEF$ sobre o padrão de transcrição de <i>pst</i>	70
Figura 15.	Atividade promotora a partir das seqüências intergênicas de <i>pst</i>	72
Figura 16.	Padrão de transcrição dos genes distais de <i>pst</i> a partir de promotores internos.....	75
Figura 17.	Deteção dos transcritos de <i>pst</i> a partir de promotores internos através de EXACT RT-PCR modificado.....	77
Figura 18.	Complementação de mutantes <i>pst</i> com o plasmídio pBS10...	78
Figura 19.	Atividade de FA de mutantes e seus respectivos transformantes contendo cada um dos genes de <i>pst</i> clonados isoladamente.....	80
Figura 20.	Reação de extensão de oligonucleotídeo do gene <i>pstC</i> sob carência de Pi.....	82
Figura 21.	Reação de extensão de oligonucleotídeo do gene <i>pstB</i>	83
Figura 22.	Reação de extensão de oligonucleotídeo do gene <i>phoU</i>	84
Figura 23.	Avaliação da função terminadora da seqüência localizada a 3' do gene <i>pstS</i>	87
Figura 24.	Análise da função estabilizadora da seqüência regulatória localizada entre os genes <i>pstS</i> e <i>pstC</i>	89

Figura 25.	Esquema das seqüências de <i>pstS</i> clonadas em pKK232-8 utilizadas para determinar a função estabilizadora da região intergênica <i>pstS-C</i>	90
Figura 26.	Estabilização de <i>pstS</i> pela seqüência regulatória REP.....	91
Figura 27.	Avaliação da meia-vida do transcrito de <i>pstS</i>	92
Figura 28.	Efeito da seqüência REP sobre o nível de proteínas PstS.....	93
Figura 29.	Esquema das seqüências de <i>pst</i> clonadas no vetor pGB2.....	95
Figura 30.	Estabilidade do transcrito de <i>pstS</i> clonado em pGB2.....	95
Figura 31.	Produção de PstS a partir dos vetores derivados de pGB2.....	96
Figura 32.	Complementação <i>in trans</i> da mutação <i>pstS</i>	98
Figura 33.	Esquema de deleção da seqüência REP em pMA7.....	110

Lista de tabelas

Tabela 1.	Cepas de <i>Escherichia coli</i> , vetores e construções plasmidiais utilizados neste estudo	41
Tabela 2.	Oligonucleotídeos utilizados na amplificação de fragmentos...	42
Tabela 3.	Atividade de FA da cepa MG1655 e de seus mutantes <i>phoB23</i> e Δ <i>pstSCAB-phoU</i>	59
Tabela 4.	Comparação da atividade promotora das seqüências internas de <i>pst</i> e o promotor principal do operon.....	73
Tabela 5.	Meia-vida do mRNA de <i>pstS</i> transcrito a partir do cromossomo e dos vetores utilizados neste trabalho.....	92
Tabela 6.	Capacidade de complementação de <i>pstS</i> $\pm$ REP em mutantes <i>pstS</i> constitutivos.....	97

Lista de Abreviações e Siglas

- Pi – carência de fosfato	CRP – proteína de regulação catabólica
% – porcentagem	DMSO – dimetil sulfóxido
~ – aproximadamente	DNA – ácido desoxirribonucléico
+Pi – excesso de fosfato	DNase – desoxirribonuclease
μCi – microcurrie	dNTP - desoxirribonucleotídeos
μF – microfarad	DO ⁵⁴⁰ – densidade óptica a 540 nanômetros
μg – micrograma	DTNB – 5,5' ditiobis-2 ácido nitrobenzóico
μM – micromolar	DTT – ditioneitol
A – adenina	EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
A ⁴¹⁰ – absorvância a 410 nanômetros	Eo ⁷⁰ – RNA polimerase holoenzima associada ao fator sigma 70
ABC – ABC binding cassette	EXACT – exclusive amplification of cDNA templete
ADP – adenosina difosfato	FA – fosfatase alcalina
ams – mutante RNase E termossensível (altered mRNA stability)	FPM – força proton motriz
AppA – fosfatase ácida	G – guanina
ATP – adenosina 5' trifosfato	G3P – glicerol 3' fosfato
BIME – bacterial interspersed mosaic elements	G6P – glicose 6' fosfato
BSA – albumina bovina	GpT – glutamic pyruvic transaminase
Ca – cálcio	GTP – guanosina 5' trifosfato
cAMP – AMP cíclico	h – horas
CAT – cloranfenicol acetil transferase	Kb – quilobase
cDNA – DNA complementar	Kv – quilovolts
Ci – currie	M – molar
CoA – coenzima A	
CPM – counts per minutes	

MeHPO₄ – íons metálicos ligado a fosfato

Mg – magnésio

min – minuto

mL – mililitro

mM – milimolar

mmole – milimol

mRNA – RNA mensageiro

ng – nanogramas

nm – nanômetro

nt – nucleotídeo

°C – graus Celsius

OH – hidroxil

ORF – sequência codificadora (open reading frame)

PAGE – gel de eletroforese de poliacrilamida

PAP – poli-A polimerases

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia pela polimerase

pH – potencial hidrogeniônico

PhoB-P – PhoB fosforilada

Pi – fosfato inorgânico

Pit – Pi transporte

pmol – picomol

pNPP – para nitrofenil fosfato

Poli-Pi – polifosfato

ppGpp – guanosina 3', 5'-bispirofosfato

PPK – polifosfato quinase

Pst – Phosphate Specific Transport

PU – unidades palindromicas (Palindromic Units)

RBS – sítio de ligação ribossomal (ribosome binding site)

REP – seqüências de repetições palíndromes (Repetitive Extragenic Palindromic)

RNA – ácido ribonucléico

RNase – ribonuclease

RT-PCR – transcrição reversa seguida de PCR

SDS – dodecil sulfato de sódio

SSC – Sodium Chloride / Sodium Citrate

T – timina

TBE – tris borato EDTA

Tm – temperatura de anelamento (melting temperature)

TRIS – hidroxometil aminometano

ts – termossensível

U – uracil

UE – unidades enzimáticas

Zn – zinco

α -³²P – fosfato radioativo marcado na posição alfa

σ^{70} – subunidade sigma 70

σ^S – fator sigma S

Ω – ohm

Sumário

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	Regulon PHO	19
1.2	Captação de Moléculas Fosforadas.....	23
1.2.1	Porinas.....	23
1.2.2	Enzimas Periplasmáticas Envolvidas na Clivagem de Compostos Fosforados.....	23
1.2.3	Transporte de Pi e outras moléculas fosforadas através da membrana citoplasmática.....	24
1.2.4	O Transportador Pit	24
1.2.5	O sistema Pst de Transporte de Fosfato.....	25
1.3	Degradação de mRNA em procariotos.....	29
1.3.1	Ribonucleases envolvidas na degradação de mRNA.....	30
1.3.1.1	Endonucleases.....	30
1.3.1.1.1	RNase E.....	30
1.3.1.1.2	RNase III.....	32
1.3.1.1.3	O Módulo de Vício MazF-MazE.....	33
1.3.1.2	Exonucleases.....	33
1.3.1.3	Outras Enzimas Envolvidas na Degradação de mRNA.....	34
1.3.1.4	Degradossomo.....	35
1.4	Estruturas Estabilizadoras de mRNA – seqüências REP.....	35
2	OBJETIVOS	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS	41
3.1	Cepas e Plasmídios.....	41
3.2	Oligonucleotídeos	42
3.3	Meios de cultura.....	43
3.4	Ensaio enzimático de Fosfatase Alcalina (FA).....	44

3.4.1	Ensaio de Fosfatase Alcalina Quantitativo.....	44
3.4.2	Ensaio Qualitativo de Fosfatase Alcalina.....	45
3.5	Condições de crescimento de bactérias para indução de carência de Pi.....	45
3.5.1	Condições de crescimento das bactérias para extração de RNA	46
3.5.1.1	Cultivo de mutantes RNase.....	46
3.5.1.2	Cultivo de células para a medição da meia-vida do mRNA de <i>pstS</i>	46
3.6	Extração de RNA.....	47
3.7	Northern-Blot	47
3.8	Preparação de Sondas	48
3.9	PCR.....	48
3.10	Extração de Plasmídios	49
3.11	Transformação	49
3.12	Reações de RT-PCR	49
3.12.1	RT-PCR convencional.....	49
3.12.2	RT-PCR modificado.....	50
3.13	Ensaio de CAT	52
3.14	Quantificação de Proteínas	53
3.15	Testes de Complementação de FA de mutantes constitutivos.....	53
3.16	Extração e eletroforese de proteínas periplasmáticas	53
3.17	Ensaio de extensão de oligonucleotídeo (<i>primer extension</i>)..	54
3.18.1	Construções Plasmidiais.....	55
3.18.2	Mutação sítio dirigida para deleção da estrutura REP localizada abaixo do gene <i>pstS</i>	55
3.19	Cálculo da meia-vida de mRNAs.....	57
4	RESULTADOS	59
4.1	PADRÃO DE TRANSCRIÇÃO E DEGRAGAÇÃO DO OPERON <i>pst</i>	59
4.1.1	Padrão de Transcrição do operon <i>pst</i>	59

4.1.2	Detecção do Transcrito Primário do operon <i>pst</i>	63
4.1.3	Degradação do Transcrito primário de <i>pst</i>	67
4.1.3.1	Papel da RNase E na degradação da mensagem de <i>pst</i>	67
4.1.3.2	RNase III e a estabilidade do mRNA de <i>pst</i>	69
4.1.3.3	Efeito da ribonuclease MazF sobre <i>pst</i>	70
4.2	ATIVIDADE REGULATÓRIA DAS SEQUÊNCIAS NÃO CODIFICANTES DO OPERON <i>pst</i>	71
4.2.1	Detecção de atividade promotora nas seqüências a 5' das regiões codificadoras dos genes de <i>pst</i>	71
4.2.2	Detecção dos transcritos originados a partir da atividade dos promotores internos.....	74
4.2.3	Ensaio para detecção de transcritos derivados de pBS10 através de RT-PCR modificado.....	76
4.2.4	Testes de complementação <i>in trans</i> de mutações <i>pst</i>	78
4.2.5	Localização dos inícios de transcrição de <i>pstC</i> , <i>pstB</i> e <i>phoU</i> a partir dos promotores internos.....	81
4.3	ANÁLISE DO POTENCIAL REGULATÓRIO DA SEQUÊNCIA NÃO CODIFICANTE LOCALIZADA A 3' DO GENE <i>pstS</i>	86
4.3.1	Análise da função de terminação durante a transcrição.....	86
4.3.2	Estabilização da mensagem de <i>pstS</i>	87
4.3.3	O efeito de REP sobre a produção de PstS.....	93
4.3.4	Papel da Sequência REP a 3' de <i>pstS</i> na Repressão de PHO.....	97
5	DISCUSSÃO	101
5.1	O transcrito primário de <i>pst</i>	101
5.2	Seqüências internas de <i>pst</i>	105
5.3	Seqüência REP a 3' de <i>pstS</i>	108
6	CONCLUSÕES	114
	REFERÊNCIAS	116
	ANEXOS	126

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Fósforo tem um importante papel na constituição e metabolismo de organismos vivos; ele faz parte da composição de fosfolipídios de membrana, carboidratos complexos, ácidos nucleicos e ATP. Na natureza, quase todas as fontes de fósforo estão disponíveis em sua forma oxidada conhecida como fosfato.

O ortofosfato também conhecido como fosfato inorgânico (Pi) é a forma preferencial de captação e assimilação de fosfato pela maioria das bactérias. Na ausência de Pi, organismos como *Escherichia coli* utilizam mecanismos capazes de captar e assimilar fontes alternativas de fosfato, tais como organofosfatos e fosfanatos [WANNER, 1996].

Moléculas como organofosfatos e fosfanatos precisam ser clivados para liberar Pi e serem efetivamente assimilados [WANNER e METCALF, 1992; WANNER, 1996], conseqüentemente há um maior consumo de energia para utilizar fontes alternativas de Pi. A maioria dos genes associados à captação e assimilação de Pi a partir de moléculas orgânicas fosforiladas é ativamente expressa somente quando a disponibilidade de Pi no meio é extremamente baixa. A maior parte destes genes faz parte do regulon PHO, cuja principal característica é sua indução exclusivamente durante a carência de Pi [WANNER, 1996, RAO e TORRIANI, 1990, STOCK, 1989].

O operon *pst* pertence ao regulon PHO e 4 dos 5 genes que o compõem codificam proteínas que fazem parte de um sistema de transporte específico para Pi.

1.1 Regulon PHO

O Regulon PHO de *Escherichia coli* é composto por mais de 30 genes e operons envolvidos na captação e assimilação de diversas formas de fosfato. Todos os genes pertencentes a este regulon respondem ao estímulo externo de carência de Pi. O operon *pst*, tema deste trabalho, pertence ao regulon PHO e além de codificar proteínas que formam um transportador de Pi, ele possui

um papel repressor sobre os genes de PHO, impedindo sua expressão quando o organismo encontra-se em um ambiente contendo excesso de Pi [WANNER, 1996]. Outros exemplos de genes pertencentes à PHO são o gene *phoA* que codifica para uma proteína periplasmática cuja principal função é clivar moléculas orgânicas contendo Pi e liberando-o para a assimilação como fonte de fosfato, o gene *phoE* que codifica para uma porina responsável pela difusão de ânions pela membrana externa, o operon *ugp* que codifica para um sistema de transporte do tipo ABC responsável pela captação de glicerol-3-fosfato (G3P) e o operon *phoBR* que codifica para proteínas regulatórias de PHO.

Seqüência consenso para pho-box : CTGTCAT A(AT)A(TA)CTGT(CA)A(CT)

Figura 1 - Promotores de genes pertencentes ao regulon PHO. Nestes genes a seqüência -35 é substituída pelo PHO-box destacado pelos retângulos. Alguns genes podem conter mais de uma seqüência PHO-box, como é o caso de *pstS*. A localização da seqüência -10 convencional está representada pela barra sobre os nucleotídeos e +1 representa o início da região codificadora.

Todos os genes de PHO são ativados em resposta a baixa concentração de Pi. O ativador transcricional do regulon, a proteína PhoB, liga-se às regiões promotoras dos genes iniciando a transcrição [SHINAGAWA et al, 1983]. Os promotores dos genes de PHO possuem seqüências -10 convencionais e PHO-boxes no lugar da seqüência -35 (Figura 1). O PHO-box é caracterizado por uma seqüência consenso de 18 pb, formada por duas repetições da seqüência CTGTCAT, separadas por uma seqüência de 4 A/Ts [WANNER, 1996]. Alguns genes possuem mais de uma seqüência PHO-box na região promotora e, segundo alguns trabalhos, estas seqüências adicionais podem proporcionar

uma maior expressão do gene durante a fase de carência de Pi [MAKINO et al, 1988].

Figura 2 - Sistema regulatório PhoB-PhoR. Quando o meio externo apresenta uma concentração de Pi abaixo de $4 \mu M$, a proteína de membrana PhoR se autofosforila assumindo sua forma ativada, posteriormente ela transfere o grupo fosfato para PhoB que após a fosforilação liga-se às seqüências PHO-box interagindo com $E\sigma^{70}$ para iniciar a transcrição dos genes pertencentes ao regulon PHO.

A regulação de PHO é efetuada por um sistema do tipo “dois componentes” formado pelo ativador transcricional PhoB e pela histidina-quinase PhoR (Figura 2). Quando a concentração de Pi no meio externo é inferior a $4 \mu M$ a proteína de membrana PhoR, que possui um domínio sensor extracelular, percebe de forma ainda não esclarecida, a escassez de Pi e autofosforila-se. PhoR fosforilada promove a transferência do grupo fosfato ao ativador transcricional PhoB [MAKINO et al, 1989]. Esta proteína por sua vez, quando fosforilada (PhoB-P), liga-se ao PHO-box e interage com o fator σ^{70} associado a RNA polimerase ($E\sigma^{70}$) iniciando a transcrição dos genes de PHO [MAKINO et al, 1993].

As proteínas PhoB e PhoR são codificadas por genes homônimos que formam um operon localizado no minuto 9 do cromossomo de *E.coli*. Assim como os demais genes de PHO, sua transcrição é induzida pela carência de Pi, caracterizando um processo de auto-regulação [MAKINO et al, 1986 a,b]. Em condições de excesso de Pi, PhoR assume a forma repressora apresentando atividade de fosfatase e desfosforilando PhoB-P [CARMANY et al, 2003].

Embora a carência de Pi seja o principal sinal regulatório de PHO, é necessário notar que a maior parte do Pi captado pela célula é utilizado na produção de ATP, conseqüentemente, há evidências de que intermediários do metabolismo energético podem afetar a expressão de um ou mais genes deste regulon [WANNER, 1996].

Um exemplo é o gene *psiE* que é regulado positivamente pela carência de Pi e negativamente pela ausência de glicose. Há evidências de que o promotor de *psiE*, que contém duas PHO-boxes, possa ser bloqueado pelo complexo AMP cíclico - Proteína de Regulação Catabólica (cAMP-CRP) quando a bactéria é cultivada em meio contendo glicerol como fonte de carbono. Nestas condições, a concentração de cAMP-CRP aumenta e este liga-se ao sítio promotor de *psiE* cobrindo uma das seqüências PHO-box, bloqueando parcialmente a ligação de PhoB à região promotora [KIM et al, 2000].

Há ainda evidências de que o regulon PHO possa ser regulado por acetil fosfato, um intermediário do metabolismo energético. De acordo com esta hipótese, acetil fosfato pode fosforilar diretamente PhoB na ausência de PhoR. A fosforilação de PhoB por acetil fosfato foi testada *in vitro* e demonstrou ser tão eficaz quanto a fosforilação por PhoR, ou seja, a proteína fosforilada por acetil fosfato é capaz de ligar-se nas regiões promotoras e interagir com E σ^{70} para iniciar a transcrição dos genes de PHO [HIRATSU et al, 1995].

1.2 Captação de moléculas fosforadas

1.2.1 Porinas

Moléculas orgânicas contendo fosfato atravessam a membrana externa através de poros formados por proteínas integrais. Em *E. coli* observa-se a produção de 3 porinas inespecíficas, OmpF, OmpC e PhoE. Durante o crescimento em excesso de Pi, somente as duas primeiras são sintetizadas [LUGTENBERG e VAN ALPHEN, 1983]. PhoE é expressa exclusivamente durante a carência de Pi [OVERBEEKE e LUGTENBERG, 1980] estando sob controle de PHO [TOMMASSEN e LUGTETENBERG, 1980]. O poro formado pela proteína PhoE transporta essencialmente ânions devido a presença de vários resíduos de lisina com carga positiva na sua estrutura primária [STRUYVÉ et al 1993]. Por esta característica, PhoE é eficaz no transporte de moléculas contendo resíduos de fosfato como organofosfatos, polifosfatos (Poli-Pi) e Pi (Figura 3, item 1).

1.2.2 Enzimas Periplasmáticas Envolvidas na Clivagem de Compostos fosforados

Ao atravessar a parede celular, as moléculas fosforadas alcançam o espaço periplasmático onde são clivadas por fosfatases (Figura 3, item 2). Uma das principais enzimas induzidas durante a fase de carência de Pi é a fosfatase alcalina (FA). Esta enzima é uma fosfomonoesterase com pH ótimo em torno de 8,0 [COLEMAN, 1992 apud WANNER, 1996]. Em *E.coli*, esta enzima apresenta-se como um homodímero de 449 resíduos por monômero possuindo dois íons Zn^{2+} e um íon Mg^{2+} no sítio ativo de cada monômero [KIM e WYCKOFF, 1990].

Outra fosfatase presente no periplasma é a fosfatase ácida (AppA), produto do gene *appA*, com pH ótimo em torno de 2,5. A síntese de AppA é induzida durante a entrada da célula na fase estacionária sob condições de anaerobiose e carência de Pi; seu substrato preferencial é o poli-Pi.

E.coli possui ainda outras fosfatases periplasmáticas cujo pH ótimo varia de 4,0 à 6,0, são elas a glicose-1-fosfatase, produto do gene *agg* [PRADEL et al, 1990 apud WANNER, 1996]; a uridina 5'-difosfoglicose hidrolase, produto do gene *ushA* [BURNS e BEACHAM, 1986 apud WANNER, 1996]; a hexose-6-fosfatase [DVORAK et al, 1967 apud WANNER, 1996] e a 2',3'-ciclo fosfodiesterase, produto do gene *cpdB*, cujo pH ótimo é 7,5 [LIU e BEACHAM, 1990 apud WANNER, 1996]. Todas estas enzimas contribuem para o fornecimento de Pi à célula sob circunstâncias específicas, mas com exceção da FA nenhuma destas fosfatases faz parte do regulon PHO [Wanner, 1996].

1.2.3 Transporte de Pi e outras moléculas fosforadas através da membrana citoplasmática

E.coli possui dois sistemas de transporte específicos para Pi denominados Pit (Pi transport) e Pst (Phosphate Specific Transport). O sistema Pit pode transportar tanto Pi quanto seu análogo arsenato, já o sistema Pst transporta exclusivamente Pi [ROSENBERG, 1977]. O sistema Pit é composto por uma única proteína e é sintetizado constitutivamente, enquanto Pst é composto por 4 proteínas e está sob regulação de PHO.

Além dos transportadores de Pi, existem transportadores adicionais que captam moléculas organofosforadas específicas que adentram a célula sem sofrer clivagem por fosfatases periplasmáticas. O sistema Glp e o sistema Ugp transportam moléculas de sn-glicerol-3-fosfato, o sistema UhpT transporta a glicose 6 fosfato. Os sistemas GlpT e UhpT são compostos por uma única proteína e não são regulados pela disponibilidade de Pi [VAN VEEN, 1997 e WANNER, 1996]. Já o sistema Ugp é formado por múltiplas proteínas cujos genes formam um operon regulado por PHO [ARGAST e BOOS, 1980].

1.2.4 O transportador Pit

O transportador Pit possui baixa afinidade por Pi quando comparado ao sistema Pst [WILLSKY e MALAMY, 1980]. Este transportador é movido pela força-próton-motriz (FPM) e é formado por uma única proteína que transporta, através de um sistema simporte, complexos de íons fosfato ligado a metais

(MeHPO_4), principalmente os cátions divalentes Ca^{2+} e Mg^{2+} [VAN VEEN, 1997; RUSSELL e ROSENBERG, 1980].

Recentemente foi demonstrada a presença de uma seqüência cromossomal com 81% de homologia à seqüência de aminoácidos codificada por *pit*. Este gene, denominado *pitB*, encontra-se geralmente inativo podendo ser ativado através de um evento de recombinação cromossômica [HOFFER et al, 2001]. Quando ativo, PitB transporta complexos de MeHPO_4 de forma idêntica ao sistema Pit original, que passou a ser denominado PitA. O sistema PitB é expresso predominantemente em condições de excesso de Pi e parece sofrer repressão pelo regulon PHO por um mecanismo ainda desconhecido [HARRIS et al, 2001].

1.2.5 O sistema Pst de Transporte de Fosfato.

O sistema Pst pertence à família dos transportadores do tipo ABC (Figura 3, item 3) e é o principal responsável pelo fornecimento de Pi para a célula em condições de baixa concentração externa desta molécula. Este sistema é formado por uma proteína periplasmática captadora de fosfato (PstS), duas proteínas de membrana que formam um canal (PstC e PstA) e uma ATPase que energiza o transporte (PstB). Os genes que codificam as proteínas do sistema Pst (*pstS*, *pstC*, *pstA* e *pstB*) formam um operon juntamente com um quinto gene, *phoU*, cujo produto tem função desconhecida.

PstS, codificado pelo primeiro gene do operon, é formada por uma cadeia polipeptídica com dois domínios globulares e um sítio de ligação entre eles; a proteína liga-se a ânions monovalentes (H_2PO_4^-) e divalentes (HPO_4^{2-}) [LUECKE e QUIOCHO, 1990]; sua função é captar moléculas de Pi que eventualmente adentrem o periplasma ou que sejam liberadas pela ação de fosfatases e direcioná-las ao canal aquoso formado por PstC e PstA. Estas proteínas possuem 6 hélices cada e formam um canal que atravessa a membrana citoplasmática [WEBB et al, 1992]. A proteína citoplasmática PstB fornece energia ao sistema através da hidrólise de ATP [CHAN e TORRIANI, 1996].

De acordo com o modelo proposto para o transportador de maltose, também pertencente à família ABC, a hidrólise de ATP é seguida por

mudanças na conformação das proteínas de canal que, uma vez modificado, permite a passagem do substrato [DAVIDSON e CHEN, 2004]. De forma análoga, a interação de PstS com PstC e PstA pode, por sua vez, sinalizar para PstB hidrolizar ATP dando seguimento ao transporte ativo de Pi.

Mutações em qualquer um dos genes do operon, inclusive *phoU* que não tem papel no transporte de Pi, causam a constitutividade de todos os genes de PHO, levando a sua transcrição indiscriminada sob circunstâncias de excesso ou carência de Pi [WANNER, 1996]. Desta forma, a repressão dos genes de PHO em condições de excesso de Pi é efetivamente realizada por *pst*, mas o mecanismo de regulação ainda é desconhecido.

O operon *pst*, formado pelos genes *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB* e *phoU*, está localizado no min 84 do cromossomo, sendo transcrito nesta ordem (Figura 4). O promotor do operon está localizado acima do primeiro gene – *pstS* – e é composto por uma seqüência –10 convencional e duas PHO-boxes (Figura 1). Ambas as PHO-boxes são importantes para a ligação de PhoB-P, sendo que cada seqüência liga-se ao ativador de forma independente, proporcionando uma expressão máxima de *pst* durante a fase de carência de Pi [KIMURA et al, 1989].

Transporte de Fosfato Durante a Carência de Pi

Figura 3 – Transporte de fosfato durante a carência de Pi. Captação de Pi pelo sistema Pst. 1) moléculas fosforadas difundem para o periplasma através da porina PhoE. 2) No espaço periplasmático, as moléculas fosforadas são clivadas pela FA, liberando Pi. 3) Moléculas de Pi livres são transportadas pelo sistema Pst: a proteína captadora de fosfato (PstS) liga-se ao grupo Pi e o direciona até o canal formado pelas proteínas PstC e PstA, o transporte é energizado pela hidrólise de ATP catalisada por PstB.

Figura 4 - Esquema representativo do operon *pst* de *E.coli*. As duas PHO-boxes e seqüência -10 localizadas na região promotora estão indicadas. A região codificadora de cada gene está representada pelos retângulos e as estruturas secundárias putativas presentes no mRNA estão representadas pelas haste-laços localizados nas regiões não codificadoras.

O seqüenciamento do operon *pst* revelou a existência de três regiões internas não codificantes [AMEMURA et al, 1985]. Estas regiões estão localizadas entre os genes *pstS-pstC*, *pstA-pstB* e *pstB-phoU* e podem ter funções regulatórias sobre a expressão de *pst*. Foi postulada a existência de um possível terminador transcricional na região intergênica entre *pstS* e *pstC* [MAGOTA et al, 1984] e um possível promotor convencional (seqüências -10 e -35) entre os genes *pstA* e *pstB* [AMEMURA et al, 1985]. A presença de uma possível seqüência repetitiva com estrutura de haste-laço também foi observada na região intergência entre *pstA* e *pstB*.

1.3 Degradação de mRNA em procariotos

A maioria dos organismos procariotos é capaz de responder rapidamente aos diferentes estímulos ambientais adaptando-se eficazmente às novas condições do meio. Esta capacidade adaptativa provém de uma rápida mudança no padrão de expressão de determinadas proteínas. Desta forma, o ritmo de degradação de mRNA tem um importante papel na regulação da expressão gênica; pois através deste mecanismo, a célula pode aumentar ou diminuir a concentração de uma determinada espécie de mRNA e conseqüentemente modular o nível de tradução de sua proteína correspondente conforme sua necessidade.

A estabilidade do mRNA está condicionada a dois fatores: o primeiro é a existência de seqüências não codificadoras (cis-acting RNA elements) como por exemplo seqüências de repetição invertidas (REP) que têm o potencial de estabilizar a mensagem produzida [NEWBURY et al, 1987]; e o segundo fator inclui a ação de nucleases específicas (trans-acting proteins) que efetuam a degradação do transcrito [MANAGO, 1999].

Em procariotos, a organização dos genes em operons facilita a regulação conjunta dos genes que o compõem. Desta maneira, genes que respondem a um determinado estímulo ambiental são induzidos e/ou reprimidos conjuntamente. Embora o nível de transcrição dos genes que formam o operon seja o mesmo, estes podem ser traduzidos em diferentes concentrações molares. Estas diferenças estão relacionadas à capacidade do ribossomo em ligar-se aos sítios de ligação ribossomal (RBS) presentes acima de cada seqüência codificadora (ORF) de mRNA e também a estabilidade do mRNA de um gene específico. Neste contexto, seqüências estabilizadoras nas regiões internas do operon, estabilizam algumas regiões do mRNA proporcionando maior nível de tradução de determinadas proteínas.

1.3.1 Ribonucleases envolvidas na degradação do mRNA

A degradação do mRNA é realizada por uma série de processos dos quais participam endo e exonucleases. As endonucleases são enzimas que clivam ligações fosfodiéster nas seqüências internas de moléculas de RNA. Já as exonucleases iniciam a degradação a partir de uma das extremidades da fita de RNA gerando mononucleotídeos ou pequenas cadeias contendo até 5 nucleotídeos dependendo da enzima. Em procariotos a ação de exonucleases ocorre exclusivamente na direção 3' → 5' da cadeia de RNA enquanto que em eucariotos as exonucleases também podem agir na direção 5' → 3' [para uma revisão veja NICHOLSON, 1999 e RAUHUT e KLUG, 1999].

Em *E.coli* há aproximadamente 11 endonucleases e 8 exonucleases envolvidas na degradação e maturação de moléculas de RNA. O início da degradação de transcritos ocorre geralmente através da ação de endonucleases, as principais enzimas envolvidas neste processo são a RNase III e a RNase E.

Após a clivagem interna, segue-se a degradação através de exonucleases. Neste processo participam principalmente as enzimas PNPase, RNase II e RNase R. Em *E.coli*, a RNase E e a PNPase formam um complexo protéico conhecido como degradossomo, que juntamente com outras enzimas participam da degradação de mRNA [MICZAK et al, 1996 apud MANAGO, 1999]. Através destes processos degradativos, *E.coli* pode, além de reciclar nucleotídeos e proporcionar a maturação de moléculas de RNA, controlar parte da sua expressão gênica adaptando-se rapidamente aos diferentes estímulos ambientais.

1.3.1.1 Endonucleases

1.3.1.1.1 RNase E

A RNase E é uma endonuclease de 1061 aminoácidos codificada pelo gene essencial *rne* localizado no minuto 24,6 do cromossomo. Ela foi primeiramente descoberta em *E.coli* como uma enzima envolvida no

processamento de rRNA e tRNA [MISRA e APIRION, 1979 apud MANAGO, 1999]. Posteriormente foi reconhecida como a principal enzima envolvida no início da degradação do mRNA; fazendo parte da composição estrutural e funcional do degradossomo [CARPOSIUS et al, 1994].

O sítio de clivagem proposto para a RNase E possui um consenso de 5 nucleotídeos (A/G)AUU(A/U) seguidos por uma estrutura secundária em forma de laço [EHRETSMANN et al, 1992]. Contudo, alguns trabalhos alegam que a RNase E não possui sítios de clivagem específicos, tendo apenas afinidade por seqüências de RNA, cujas extremidades 5' são formadas por adeninas e uracilas [MACKIE e GENEREAUX, 1993]. Para iniciar sua ação, a RNase E liga-se a extremidades 5' do RNA, preferindo extremidades monofosforiladas às trifosforiladas [MACKIE, 1998]. Após a clivagem, a RNase E gera extremidades 5'-OH e extremidades 3' -Pi [CANNISTRARO e KENNEL, 1993].

A primeira evidência de que a RNase E participa de processos degradativos de mRNA surgiu através de estudos realizados com mutantes condicionais *ams* (altered mRNA stability). Nestes mutantes, o aumento da temperatura para 42°C, inativou a ação da enzima, resultando na estabilização de determinados transcritos [ARRIANO et al, 1988]. Em alguns modelos propostos, a RNase E iniciaria a degradação do mRNA ligando-se primeiramente à extremidade 5' e clivando o transcrito em vários sítios, originando pequenos oligonucleotídeos que servem como substrato para exonucleases. Outras propostas de modelos baseiam-se no fato de que a enzima tem preferência por extremidades 5' monofosforiladas; desta forma a clivagem do RNA estaria limitada a regiões próximas a estas extremidades, produzidas anteriormente pela ação da RNase III [KUSHNER, 2002].

O mecanismo de regulação da expressão de RNase E ainda não está completamente esclarecido. Em mutantes *ams*, o transcrito do gene *rne* têm sua estabilidade aumentada 5 vezes em relação a cepa selvagem, sugerindo um processo de autorregulação [JAIN e BELASCO, 1995 apud MANAGO 1999]. Sabe-se que a enzima interage com uma seqüência na região 5' não codificante de seu transcrito, que forma uma estrutura secundária e pode conter um sítio de clivagem, mas alguns trabalhos sugerem que o mecanismo de autoregulação não depende exclusivamente desta região, mas envolve também a ação de três promotores independentes [OW et al, 2002].

1.3.1.1.2. RNase III

A RNase III é uma endonuclease codificada pelo gene *rnc* que faz parte de um operon juntamente com os genes *era* e *recO* que codificam, respectivamente, uma proteína ligante de GTP com função de GTPase e uma proteína que participa de processos de recombinação e reparo de DNA. O operon está localizado no minuto 58,2 do cromossomo de *E.coli* e *rnc* é o primeiro dos três genes que o compõem [MARCH, 1985 apud MANAGO, 1999].

A principal importância da RNase III consiste em sua participação nos processos de maturação de RNA ribossomal, sendo sua função clivar transcritos primários dos operons de rRNA, originando os precursores das subunidades 16S e 23S. Não há relatos de seqüência consenso para o sítio de clivagem da RNase III, mas a endonuclease cliva principalmente estruturas secundárias de RNA em forma de haste-laço, contendo de 15 a 20 pb [ROBERTSON, 1982 apud NICHOLSON, 1999].

Sua importância na degradação de mRNA está no fato de que a clivagem realizada nas regiões 5' não codificantes de determinados transcritos pode preparar a mensagem para a degradação subsequente pela RNase E. Em alguns casos específicos, ela pode agir na maturação de mRNA: em *E.coli*, o mRNA do gene *adhE* que codifica a álcool desidrogenase encontra-se inativo até ser clivado na região 5' não codificante pela RNase III [ARISTARKHOV, 1996 apud NICHOLSON, 1999].

O gene *rnc* é transcrito constitutivamente e o controle do nível enzimático é realizado através de um mecanismo de regulação pós-transcricional. A própria RNase III cliva estruturas que formam grampos e laços localizados nas seqüências não codificadoras do transcrito do operon *rnc*. A clivagem permite o início da degradação do mRNA seguida pela ação de outras nucleases proporcionando um mecanismo de autorregulação [CONRAD e RAUHUT, 2002].

1.3.1.1.3 O modulo de vício MazF-MazE

MazE e MazF são conhecidas por seu papel na regulação da morte celular programada em bactérias [KULKA et al, 2005]. Os genes homônimos que codificam estas proteínas formam um operon juntamente com o gene *relA*, que codifica para a ppGpp sintetase I [METZGER et al, 1988].

MazF possui atividade endoribonucleolítica que cliva sítios ACA em moléculas de mRNA de fita simples, impedindo a tradução da mensagem e iniciando o processo de morte celular programada [ZHANG et al, 2003].

MazE é uma antitoxina instável cuja função é degradar MazF. A expressão de *mazEF* é negativamente regulada por ppGpp (guanosina-3',5'-bispirofosfato), que é sintetizada pela proteína RelA sob condições de carência de aminoácidos e pela proteína SpoT em outras condições de estresse [AIZENMAN et al, 1996].

Por sua ação endoribonucleolítica expressa durante condições de estresse, é possível que Maz F esteja envolvida na degradação de mRNA durante a carência de Pi.

1.3.1.2 Exonucleases

A ação de exonucleases em procariotos ocorre exclusivamente na direção 3' → 5'. As principais exonucleases envolvidas na degradação de mRNA são a polinucleotídeo fosforilase (PNPase) e a RNase II. Em *E.coli*, a atividade destas duas enzimas pode ser compensada uma pela outra; pois mutantes deficientes em PNPase, apresentam expressão de RNase II aumentada. Em contrapartida, a superexpressão de PNPase reduz o nível de transcritos de RNase II [ZILHAO et al, 1995b].

PNPase é uma exonuclease codificada pelo gene *pnp* localizado no min 71,3 do cromossomo de *E.coli* e cuja atividade catalítica produz mononucleotídeos difosfatados. A PNPase normalmente liga-se a extremidade 3' do mRNA originado pela clivagem por RNase III [revisado em Manago, 1999 e Rauhut & Klug, 1999].

RNase II é codificada pelo gene *rnb* localizado no min 29 do cromossomo de *E.coli* [ZILHAO et al, 1995a]. A enzima possui atividade de

exonuclease hidrolisando o mRNA e liberando extremidades 5' monofosforadas [revisado em Manago, 1999].

Outra exonuclease envolvida nos processos de degradação de mRNA é a RNase R. Ela participa do processamento de rRNA e tRNA, sendo capaz de clivar moléculas de mRNA dupla fita [CHENG e DEUTSCHER, 2002]. Para iniciar este processo, ela necessita apenas de uma extremidade de fita simples. Devido a esta característica, a RNase R é uma exonuclease que participa da degradação de transcritos contendo estruturas secundárias em forma de haste-laço que bloqueiam a ação de outras exonucleases [CHENG e DEUTSCHER, 2005].

1.3.1.3 Outras Enzimas Envolvidas na Degradação de mRNA

A adenilação dos transcritos pode representar um importante mecanismo para o acesso de exonucleases à fita de RNA, que somente podem exercer sua função catalítica nas extremidades que possuem nucleotídeos não pareados [Rauhut & Klug, 1999]. Em *E.coli*, cerca de 1 a 2% dos transcritos são adenilados; as duas poli-A polimerases (PAP) identificadas neste processo são a PAPI, codificada pelo gene *pcnB* localizada no min 3,4 [CAO et al, 1992 apud MANAGO, 1999] e a PAPII codificada pelo gene *f310* localizada no min 87 do cromossomo [CAO et al, 1996 apud MANAGO, 1999].

A Polifosfato quinase (PPK), que catalisa a conversão reversível de poli-Pi e ADP em ATP [KORNBERG, 1995], também está envolvida nos processos de degradação de RNA. Ela faz parte do degradossomo e sua função neste complexo parece ser remover moléculas de Pi de nucleotídeos difosfatados e moléculas de poli-Pi que possam ter efeito inibitório sobre a degradação do mRNA [revisado em RAUHUT e KLUG, 1999 e MANAGO, 1999].

A principal helicase envolvida em processos de degradação de mRNA é a Rh1B, ela pertence a família da DEAD-box e assim como a PPK também faz parte do degradossomo. Sua função é separar a dupla fita presente em estruturas secundárias de RNA, facilitando a atividade da PNPase [RAUHUT e KLUG, 1999].

1.3.1.4 Degradossomo

O degradossomo é um complexo multienzimático formado pela RNase E, PNPase, Rh1B, PPK e enolase. A RNase E é responsável pela estruturação física do complexo; a Rh1B, a enolase e a PNPase ligam-se à porção C-terminal da enzima, enquanto o sítio catalítico da RNase E permanece na outra extremidade.

Especula-se que este complexo esteja envolvido no processo inicial de degradação do RNA, pois o degradossomo possui todas as enzimas necessárias para degradar uma molécula de RNA em pequenos oligonucleotídeos. Em um dos modelos propostos, a degradação inicia-se com a poliadenilação do transcrito pela PAPI, posteriormente a PNPase do complexo enzimático liga-se a cauda de poli-A enquanto a RNase E liga-se a extremidade 5' ou em alguma região interna do mRNA para iniciar sua clivagem. Desta forma o degradossomo liga-se em ambas as extremidades do transcrito para iniciar a degradação. As estruturas secundárias que poderiam impedir a ação da PNPase seriam desestruturadas pela ação da Rh1B e os fragmentos produzidos pela ação da RNase E são posteriormente processados pela própria PNPase ou por outras exonucleases presentes na célula concluindo a degradação do transcrito [KUSHNER, 2004].

A associação das enzimas no degradossomo poderia em princípio promover uma maior eficácia na degradação de mRNA, mas deleções na porção C-terminal do gene *rne* que desestruturaram somente a montagem do degradossomo não afetaram o nível de degradação de mRNA destas cepas, demonstrando que a ação catalítica das enzimas pode não depender de sua interação física [OW et al, 2000 e KUSHNER, 2004].

1.4 Estruturas Estabilizadoras de mRNA – seqüências REP

Seqüências REP (Repetitive Extragenic Palindromic) também conhecidas como PU (Palindromic Units) são repetições invertidas localizadas em regiões intergênicas, normalmente situadas logo após a região codificadora de um determinado gene [STERN et al, 1984]. Estas seqüências fazem parte de uma família denominada BIME que foi inicialmente encontrada no genoma

de *E.coli* e de *Salmonella typhimurium*. A família BIME possui cerca de 10 subtipos diferentes de seqüências caracterizadas por pequenas repetições extragênicas que são transcritas junto ao mRNA do gene ou operon [BACHELIER et al, 1996].

Figura 5 - Esquema ilustrando a estabilização do mRNA por seqüências REP. As exonucleases têm sua ação bloqueada por RNA dupla fita, desta forma, a estrutura secundária formada pela seqüência REP conserva a mensagem localizada a 5'.

As seqüências REP ocupam cerca de 1% do genoma de *E.coli* e podem ocorrer isoladamente ou em seqüências de até 4 repetições. Depois de transcritas estas seqüências têm a habilidade de formar estruturas secundárias em forma de haste-laço proporcionando uma barreira física para a ação de exonucleases [NEWBURY et al, 1987] (Figura 5). A PNPase e a RNase II são as duas exonucleases que tem sua ação comprovadamente bloqueada por estas estruturas, pois não podem degradar RNA dupla fita [PLAMANN e STAUFFER, 1990].

A seqüência consenso para a formação de seqüências REP é: 5' - GCC GAUGGCG CGCGCUUAUCGGCCUAC – 3'.

Figura 6. Seqüência REP localizada na região não codificadora entre *pstS* e *pstC*. Esta seqüência em forma de haste-laço pode estar relacionada à estabilização do transcrito de *pstS*.

A análise da seqüência de *pst* mostra que o operon *pst* possui duas seqüências REP, uma delas está localizada entre os genes *pstS* e *pstC* (Figura 6) e outra entre os genes *pstA* e *pstB*. A funcionalidade destas seqüências não foi ainda avaliada, mas é provável que elas estejam envolvidas na estabilização dos transcritos de *pstS* e *pstA*, respectivamente.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo analisar o padrão de transcrição do operon *pst* de *E.coli* e investigar a função regulatória das seqüências não codificantes presentes no operon.

MATERIAIS E MÉTODOS

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Cepas e Plasmídios

As cepas e plasmídios utilizados neste estudo estão listadas na Tabela

1.

Tabela 1. Cepas de *Escherichia coli*, vetores e construções plasmidiais utilizados neste estudo.

Cepa	Descrição	Referência
MG1655	<i>Escherichia coli</i> K-12 selvagem	Coleção do laboratório
BS1	MG1655 <i>phoB23 proC::Tn10</i>	Coleção do laboratório
BS7	MG1655 $\Delta(pstSCAB-phoU)560::Km^R$	Coleção do laboratório
SK5665	<i>thyA715 rne</i>	Arriano et al (1988)
SK7662	<i>thyA715 Δrnc 38 Km^R</i>	Babitzke et al (1993)
MC4100 mazEF	MC4100 $\Delta mazEF$	Kulka et al (2005)
MA1	MG1655 $\Delta pstSCABU phoB23 proC::Tn10$	Este estudo
BS10	MG1655 <i>pstS1::Tn5</i>	Coleção do laboratório
JV31	mutante <i>pstS</i> K-10	Coleção do laboratório
GMF198	MG1655 <i>pstS ::KmR</i>	Coleção do laboratório
JV19	MG1655 <i>pstC</i>	Coleção do laboratório
AN346	<i>pstA2</i>	Coleção do Laboratório
AN1403	AN346 <i>pstB401 unc449 srl::Tn10 recA</i>	Coleção do laboratório
BW17142	DE3(lac)X74 del <i>phoU599::kan</i>	Steed e Wanner (1993)
plasmídio	Características	Referência
pBS10	<i>pstCABphoU</i> clonado em pKK232-8	Coleção do Laboratório
pBS11	região promotora de <i>pstS</i> sintetizada por PCR e digerida com DraI e BstI e ligada a pKK232-8 com SmaI e BamHI	Coleção do laboratório
pBS12	região promotora de <i>pstC</i> clonada nos sítios SmaI e BamHI em pKK232-8	Coleção do Laboratório
pBS13	região promotora de <i>pstA</i> clonada nos sítios SmaI e BamHI em pKK232-8	Coleção do laboratório
pBS14	região promotora de <i>pstB</i> clonada nos sítios BamHI e Sall em pKK232-8	Coleção do Laboratório
pBS15	região promotora de <i>phoU</i> clonada nos sítios SmaI e PstI em pKK232-8	Coleção do laboratório
pBS16	região intergênica de <i>pstSC</i> com 1380 bp clonado em pKK232-8	Coleção do Laboratório

plasmídio	Características	Referência
pBS6	Operon <i>pst</i> clonado nos sítios BamHI e HindII em pGB2	Coleção do laboratório
pEU720	Vetor de clonagem , cópia única, Sp ^R	Froehlich e Scott (1991)
pEY37	<i>pstSCAB-phoU</i> clonado em pBR322	Coleção do laboratório
pGB2	Vetor de clonagem, Sp ^R	Churchward et al (1984)
pGEM T-Easy	Vetor de clonagem, Amp ^R	Promega
pJV11	Fragmento de 2501 pb englobando o gene <i>pstC</i> e sua região promotora clonado em pKK232-8	Coleção do laboratório
pJV12	Fragmento de 1408 pb contendo o gene <i>pstA</i> e sua região promotora clonado em pKK232-8	Coleção do Laboratório
pJV9	Fragmento de 994 pb englobando o gene <i>phoU</i> e sua região promotora clonado em pKK232-8	Coleção do laboratório
pKK232-8	Vetor de clonagem, Amp ^R	Amersham Pharmacia-Biotech
pMA3	Contém o gene <i>pstS</i> sem a sequência REP clonado em pGEM	Este estudo
pMA6	Contém o gene <i>pstS</i> subclonado de pMA3 no sítio EcoRI em pKK232-8	Este estudo
pMA7	Operon <i>pst</i> sem a região intergênica de <i>pstS</i> clonado em pGB2	Este estudo
pMA9	<i>pstS</i> clonado em pEU720	Este estudo
pMA10	<i>pstS</i> +REP clonado em pEU720	Este estudo
pMA11	Fragmento de PCR contendo <i>pstB</i> e sua região promotora clonados em pKK232-8	Este estudo

3.2 Oligonucleotídeos

Os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho estão listados na tabela 2:

Tabela 2 - Oligonucleotídeos utilizados na amplificação de fragmentos

Nome	Seqüência 5' – 3'	Utilização
pstS +	5' CTT CCC TGC GCC GGT GTA TGC 3'	Síntese de sonda <i>pstS</i>
pstS -	5' TCA GCG GAG ATC AGT TTG GTG T 3'	Síntese de sonda <i>pstS</i>
pstC +	5' CTG GCG GCG CTG ATT GTG CTA T 3'	Síntese de sonda <i>pstC</i>
pstC -	5' ATG CGG CGA GGA CGA TGA AGG 3'	Síntese de sonda <i>pstC</i>
pstA +	5' CAC TGC GGC GCT GGC TGA AT 3'	Síntese de sonda <i>pstA</i>
pstA -	5' TCT CGG TGG TGC GGA TAA CAA T 3'	Síntese de sonda <i>pstA</i>
pstB +	5' CGG CGC TCG ACC CTA TCT CTA C 3'	Síntese de sonda <i>pstB</i>
pstB -	5' TTG TTT CTT CGC TGG CTT GGT G 3'	Síntese de sonda <i>pstB</i>
phoU +	5' CCG CGA TGC ATA ACC AGG ACA G 3'	Síntese de sonda <i>phoU</i>

Nome	Seqüência 5' – 3'	Utilização
phoU -	5' GGT ATG ACG GCC CAG CGA CTC 3'	Síntese de sonda <i>phoU</i>
Pst +	5' TCA TCT TCG GCT ACT TTT TCT C 3'	Síntese de sonda <i>pstSCABphoU</i>
Pst -	5' AAG TTA TTG GGA TTT GTC TGG T 3'	Síntese de sonda <i>pstSCABphoU</i>
pstS1333 (-) PstI	5' GCC TGC AGT TTT ATT AGT AC 3'	PCR para construção de pMA6
REP-reverse	5' GGA GTT TTA TTA GTA CAG CGG CTT ACC GCT ACT GTC 3'	Construção de pMA7
REP-forward	5' GCC GCA TCC GGC ATT ACA AAA TGA CTT TGT AAA CGC G 3'	Construção de pMA7
Pst1300 forward	5' AGC GGT AAG CCG CTG TAC TA 3'	Confirmação da deleção de REP
Pst1403 reverse	5' GCT TGG TTG CAG CCA TAA GT 3'	Confirmação da deleção de REP
RT iniciador	5' AGT GGT ACA CGC AGA GTA CTT TAC CTG CGT GCG GAT ACT TT 3'	RT-PCR
iniciador reverso ancorado	5' AGT GGT ACA CGC AGA GTA CTT 3'	RT-PCR
pstCpr +	5' AGA TGC ATG GCC TAT TAC CTC 3'	RT-PCR
pstApr +	5' GGC GTA TCG TTC TTC CGT TCA 3'	RT-PCR
pstBpr+	5' TAT TGA TCA TTA CCC TGT G 3'	RT-PCR
phoUpr+	5' CTA CCG GGC GTA TTG AAG AGC 3'	RT-PCR
pstCpr -	5'ATT ATG TCG CCC TTT TTA CCC 3'	Extensão de iniciador, PCR
pstApr -		Extensão de iniciador, PCR
pstBpr -	5' GAA CCT GAA TTT TAC TCG 3'	Extensão de iniciador, PCR
phoUpr -	5' TCA CCT GCG TGC GGA TAC TTT 3'	Extensão de iniciador, RT-PCR, PCR

3.3 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados neste trabalho estão descritos abaixo:

- LB (Luria Bertani) – [MILLER, 1992] 1% triptona, 0,5% extrato de levedura e 0,17 M NaCl pH 7,5;
- TB (Terrific Broth) – 1,2% triptona, 2,4% extrato de levedura, 0,4% glicerol, 17 mM KH₂PO₄ e 72 mM K₂HPO₄;

- GYT – [TUNG e CHOW, 1995] 10% glicerol, 0,125% extrato de levedura e 0,25% triptona;
- SOC – [HANAHAAN, 1985] 2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 10 mM MgSO₄, 10mM MgCl₂;
- Meio A [LEVINTHAL et al, 1962] – 0.12 M Tris, 80 mM NaCl, 20 mM KCl, 20 mM NH₄Cl, 3 mM Na₂SO₄, 1 mM MgCl₂, 0.2mM CaCl₂, 2 µM ZnCl₂, 0.5% Glicose, 0.5% Bacto-peptona, pH 7,5;
Meio A é um meio de cultura semi-rico com baixa concentração de Pi. Quando acrescido de 1 mM de KH₂PO₄ é denominado meio A +Pi. Na ausência de qualquer acréscimo de KH₂PO₄, é denominado meio A -Pi.
- T-salts [ECHOLS et al, 1961] – 0,8 M NaCl; 0,2 M KCl; 0,2 M NH₄Cl; 1,19 M Tris-base; 9,8 mM MgCl 6H₂O; 24,6 mM Na₂SO₄; 2 mM CaCl₂, 20 µM FeCl₃, 20 µM ZnCl₂, 0,9 M HCl; 0.2% Glicose, pH7,5.

Quando necessário, antibióticos foram adicionados nas seguintes concentrações: ampicilina (100 µg/ml), canamicina (50 µg/ml), cloranfenicol (20 µg/ml) e espectinomicina (100 µg/ml). A rifampicina utilizada em ensaios de determinação da meia-vida de transcritos foi utilizada na concentração de 500 µg/ml.

3.4 Ensaio enzimático de Fosfatase Alcalina (FA)

Duas metodologias foram utilizadas para testar a atividade da FA. O ensaio de FA quantitativo utilizado em culturas líquidas e o ensaio qualitativo utilizado somente para testar a constitutividade das cepas em placas de meio sólido.

3.4.1 Ensaio de Fosfatase Alcalina Quantitativo

A concentração celular foi previamente monitorada através da medição de turbidez da cultura no comprimento de onda 540 nm. Alíquotas de 100-200 µl da cultura foram incubadas à 37°C com 800-900 µl do substrato p-nitrofenil fosfato (pNPP) dissolvido em 1 M Tris pH 8,0 na concentração de 1 mg/ml até

atingirem coloração amarela. A reação foi interrompida com a adição de 250 µl de 1 M Na₂HPO₄. O produto da reação foi centrifugado para precipitar as células e a absorbância do sobrenadante medida em espectrofotômetro em A⁴¹⁰. A atividade específica da reação foi calculada segundo a fórmula:

$$UE = \frac{A^{410} \times \text{Fator de Diluição}}{DO^{540} \times \text{tempo de reação}}$$

Onde, UE são as unidades enzimáticas, A⁴¹⁰ é a absorbância do produto da reação a 410 nm e DO⁵⁴⁰ é densidade ótica da cultura de células a 540 nm.

3.4.2 Ensaio Qualitativo de Fosfatase Alcalina

Um volume de alpha-naphthyl phosphate (2 mg/ml dissolvido em 1 M Tris pH 8,0) foi adicionado ao mesmo volume de 20 mM Fast blue (o-dianisidine tetrazotized dissolvido em água). A mistura foi gotejada sobre a colônia a ser analisada. A coloração escurecida adquirida pela colônia define sua constitutividade para fosfatase alcalina.

3.5 Condições de crescimento de bactérias para indução de carência de Pi

Para a indução da carência de Pi foram utilizados os meios de cultura T-salts ou Meio A.

2-3 ml de bactérias foram cultivados durante a noite à 37°C em meio T-salts, suplementado com 0,4% glicose e 1 mM KH₂PO₄. No dia seguinte, as células foram ressuspendidas em 10-50 ml do mesmo meio e cultivadas à 37°C com aeração até a fase exponencial de crescimento monitorada através de medição da turbidez da cultura (DO⁵⁴⁰ ~0,5). A cultura foi então centrifugada e lavada com T-salts (sem suplementação) e as células foram ressuspendidas em T-salts contendo 0,4% de glicose e 50 µM de KH₂PO₄. A cultura foi cultivada até a fase de carência de Pi, monitorada através de ensaios de FA quantitativos.

Para a indução de carência de Pi em meio A, bactérias foram cultivadas durante a noite em meio A suplementado com 1 mM KH_2PO_4 (meio A +Pi) e no dia seguinte foram diluídas 100 vezes no mesmo meio sem suplementação adicional de Pi (meio A -Pi) para induzir a carência (o meio possui uma concentração não-definida limitante de Pi), a cultura foi incubada sob aeração e a carência de Pi foi monitorada através de ensaios quantitativos de FA.

3.5.1 Condições de crescimento das bactérias para extração de RNA

3.5.1.1 Cultivo de mutantes RNase⁻

A cepa termossensível SK5665 (mutante *rne*) foi incubada em meio A +Pi e em meio A -Pi suplementado com 50 µg/ml de timidina. A cepa foi cultivada com aeração à 37°C e ao atingir a $\text{DO}^{540} \sim 0,5$ foram realizados ensaios de FA quantitativos para verificar se as bactérias cultivadas em meio A -Pi encontravam-se na fase de carência de Pi. Metade do volume de cada cultura foi então centrifugado e procedeu-se a extração de RNA, conforme descrito no item 3.6. A outra metade foi exposta à temperatura de 44° C por 45 min para inativar a RNase E e, em seguida procedeu-se a extração de RNA desta amostra. Portanto, foram obtidas quatro amostras de RNA: bactérias cultivadas à 30°C em excesso e em carência de Pi e bactérias cultivadas à 44°C em excesso e carência de Pi.

A cepa SK7622 (RNase III negativa) foi cultivada em meio A +Pi e em meio A -Pi, ambos suplementados com 50 µg/ml de timidina. Amostras de RNA foram extraídas de cepas carentes e não carentes de Pi, monitoradas através de ensaios de FA quantitativos.

O mutante *mazEF* foi cultivado em meio A com e sem suplementação de Pi, a carência de Pi foi monitorada através de ensaios de FA qualitativos e as amostras de RNA foram extraídas conforme descrito no item 3.6.

3.5.1.2 Cultivo de células para a medição da meia-vida do mRNA de *pstS*

Culturas de MG1655 e dos transformantes Δpst carregando os plasmídios pBS6, pBS16, pMA6 ou pMA7 foram ressuspensas em meio A

sem suplementação de Pi e cultivadas até a entrada na fase de carência. Neste momento, retirou-se uma alíquota para imediata extração de RNA e em seguida adicionou-se 500 µg/ml de rifampicina ao meio de cultura. Amostras foram retiradas nos intervalos de tempo 2, 4, 6, 8 e 10 minutos após a adição de rifampicina para imediata extração de RNA. O mesmo procedimento foi realizado para os transformantes Δpst contendo pBS16 e pMA6 e para a cepa selvagem MG1655.

3.6 Extração de RNA

RNA foi extraído pelo método de passo único [CHOMCZYNSKI e SACCHI, 1987]. As culturas de bactérias foram centrifugadas e as células foram ressuspensas em 1 ml de RNAZOL (1,9M guanidina isotiocianato; 12 mM citrato de sódio; 90,4 mM tampão acetato de sódio pH 4,0; 50% fenol pH 4,0; 3,7% sarcosil e 0,3% 2-mercaptoetanol) para cada 10 ml de cultura original. As amostras foram incubadas 5 minutos à 65°C e em seguida foram acrescentados 0,4 ml de clorofórmio por cada 1 ml de RNAzol. A mistura foi centrifugada e a fase aquosa foi precipitada com 1 volume de isopropanol. O RNA precipitado foi lavado com etanol 70% e ressuspendido em formamida.

Para quantificar as amostras, 1-2 µL de RNA foi diluído em 2 mM de Na₂HPO₄ [WILFINGER, 1997] e medido em espectrofotômetro à 260 nm. A qualidade da amostra de RNA foi monitorada através da razão A^{260} / A^{280} .

3.7 Northern-Blot

Alíquotas contendo 20 µg de RNA foram resolvidas em gel de agarose 1% contendo 7% de formaldeído e tampão MOPS (200 mM MOPS, 50 mM NaOAc, 10 mM EDTA), que foi utilizado também com o tampão de corrida. Após a eletroforese, o gel foi visualizado e fotografado para confirmar a integridade do RNA. Em seguida, o gel foi lavado três vezes por 30 min com água destilada sob leve agitação e incubado por 30 min em 10X SSC (3 M NaCl e 0,3 M citrato de sódio).

O RNA resolvido no gel foi então transferido para uma membrana de nylon (Hybond N+, GE Healthcare ou GeneScreen Plus, NEN) por capilaridade

utilizando 10X SSC como tampão de transferência e fixado por aquecimento à 80°C por 2h [SAMBROOK e RUSSELL, 2001].

As hibridizações foram realizadas incubando a membrana com cerca de 10^6 CPM de sonda marcada por pelo menos 16h à 42°C, na presença da solução de hibridização High Efficiency Hybridization System (MCR). A membrana foi lavada com a solução de lavagem (1X SSC, 1% SDS) e exposta a um filme de raios-X.

3.8 Preparação de Sondas

As sondas utilizadas para os ensaios de hibridização foram preparadas a partir de fragmentos de DNA, obtidos por PCR, correspondentes a genes de *pst*, conforme descrito no item 3.9. O plasmídio pEY37 foi utilizado como molde para a reação. O produto de PCR foi resolvido em gel de agarose, isolado e purificado com o Kit de Purificação de DNA Pure Link Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen).

O fragmento de PCR purificado serviu como molde para a síntese de sondas marcadas radioativamente pela técnica de “random primer labeling”, conforme descrito em Sambrook e Russel [2001]: 100 a 200 ng de DNA e 150 ng de hexanucleotídeos aleatórios (Promega) foram misturados e aquecidos a 100°C por 5 min. Acrescentou-se 1 µl de uma mistura de 10 mM de dATP, dGTP e dTTP; 5U de Klenow (Fermentas) com seu respectivo tampão e 50 µCi de α - ^{32}P dCTP. A reação de polimerização foi realizada por 2h a temperatura ambiente e terminada pela adição de 0,1M de EDTA. A sonda marcada foi purificada utilizando o Kit de purificação de DNA GFX (GE-Healthcare). A quantidade de radiação incorporada pela sonda foi medida em um cintilador (LS6500-Beckman).

3.9 PCR

As reações de PCR foram efetuadas utilizando plasmídios como moldes, em cada reação adicionou-se 1 mM de MgCl_2 , 0,5 mM de dNTPs, 2,5 U de Taq Polimerase (Invitrogen) com seu respectivo tampão e 0,6 pmol de cada iniciador (*forward* e reverso) de acordo com o fragmento de DNA sintetizado. As reações de PCR foram realizadas por 40 ciclos com a temperatura de

anelamento e tempo de extensão variando conforme a T_m dos oligonucleotídeos e o tamanho do fragmento a ser sintetizado, respectivamente.

3.10 Extração de Plasmídios

As cepas contendo os plasmídios de interesse foram cultivadas em meio TB na presença dos respectivos antibióticos. A extração de plasmídios foi realizada de acordo com o método de lise alcalina, descrito em Ausubel et al. (1987) ou através da utilização do Kit de Extração de DNA plasmidial Quick Plasmid Miniprep Kit (Invitrogen).

3.11 Transformação

As transformações foram realizadas por eletroporação em cubetas de 0,1 ml à 1,8 kV, 25 μ F e 200 Ω seguidas de incubação por 1h a 37°C em 1 ml de meio SOC para expressar os genes de resistência a antibióticos. Em seguida, 1/10 da cultura foi semeado em placa de meio LB acrescido do respectivo antibiótico para a seleção dos transformantes.

Para preparar células eletro-competentes, as cepas de interesse foram cultivadas em LB por 16h à 37°C. Após este período, a amostra foi diluída 100 vezes no mesmo meio e cultivada até a fase exponencial de crescimento. Neste momento, as células foram transferidas ao gelo por 30 min, centrifugadas e em seguida lavadas duas vezes com glicerol 10% gelado. As células foram em seguida ressuspensas em meio GYT e preservadas a -80°C até o momento da eletroporação.

3.12 Reações de RT-PCR

3.12.1 RT-PCR convencional

A reação de transcrição reversa foi efetuada utilizando como molde 2 μ g de RNA extraído de bactérias carentes de Pi e tratada com DNase I (Promega) conforme especificações do fabricante.

A alíquota contendo RNA foi incubada com 2 pmoles do iniciador reverso phoUpr- por 3 min à 85°C e em seguida transferida ao gelo. Adicionou-se 200 U de Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), o tampão que acompanha a enzima, 0,5 mM de dNTPs e 0,5 mM de DTT totalizando um volume final de 20 µl. A reação foi realizada à 42°C por 1 hora, seguida de incubação a 75°C por 10 min para inativar a enzima. 1/10 da amostra de cDNA serviu de molde para os 40 ciclos de PCR realizados em seguida utilizando o iniciador reverso phoUpr- e um dos iniciadores *forward*, de acordo com o gene de *pst* analisado. Para analisar o transcrito contendo os genes *pstB-phoU* foi utilizado o iniciador phoUpr+; o transcrito contendo *pstA-pstB-phoU* foi obtido utilizando o iniciador pstBpr+, o transcrito contendo *pstC-pstA-pstB-phoU* foi obtido utilizando o iniciador pstApr+ e o transcrito contendo todos os genes do operon foi obtido utilizando o iniciador pstCpr+.

3.12.2 RT-PCR modificado

Uma modificação da técnica de EXACT RT-PCR [SMITH et al, 2001] permitiu excluir a necessidade de tratamento das amostras de RNA com DNase I, eliminando totalmente a ocorrência de resultados falso-positivos resultantes da presença de DNA nas amostras de RNA. A estratégia consiste em utilizar na reação de transcrição reversa um iniciador de 41 nt em que metade de sua seqüência é homóloga ao gene alvo e a outra metade não apresenta qualquer homologia com seqüências pertencentes ao cromossomo do organismo analisado (Figura 7). Desta maneira, todas as moléculas de cDNA sintetizadas durante a reação de transcrição reversa possuem uma cauda de cDNA fita simples de 21 nt. As reações de PCR foram realizadas utilizando iniciadores *forward* homólogos ao gene alvo analisado e um iniciador reverso cuja seqüência tem homologia apenas com a cauda do cDNA sintetizada anteriormente. Assim, todas as moléculas amplificadas durante as reações de PCR provém exclusivamente do molde de cDNA.

Figura 7 - Estratégia de RT-PCR utilizada para identificar o transcrito primário de *pst*. As setas indicam os iniciadores utilizados no ensaio e as barras indicam o tamanho do produto de PCR sintetizado de acordo com cada gene analisado. O iniciador RT tem 42 nt sendo que 21 nt de sua extremidade 5' não têm qualquer homologia com seqüências de *E.coli* e os outros 21 resíduos são homólogos a região 5' do gene *phoU*. Desta forma todo cDNA sintetizado com este iniciador carrega uma cauda na sua extremidade 3'. O iniciador ancorado, cuja seqüência é idêntica aos 21 nt da região 5' do iniciador RT e um iniciador forward específico para um dos genes de *pst* foram utilizados nas reações de PCR.

A reação de transcrição reversa foi efetuada conforme descrito no item 3.11.1, mas neste caso foi utilizado o iniciador reverso híbrido RT e o tratamento com DNase I foi excluído.

O produto da transcrição reversa foi tratado com 2U de RNase H (GE Healthcare) por 20 minutos à 37°C. Para inativar a enzima, as amostras foram incubadas por 15 minutos a 75°C. O tratamento com RNase H é necessário para liberar iniciadores RT hibridizados com RNA que não foram incorporados em moléculas de cDNA. Após este procedimento a amostra foi diluída e filtrada em filtros Microcon PCR (Millipore) conforme especificações do fabricante. A ultrafiltração é importante para eliminar os iniciadores RT não incorporados na reação de transcrição reversa liberados pelo tratamento com RNase H. Caso contrário, estes poderiam anelar-se a seqüências de DNA genômico durante o PCR resultando em produtos falso-positivos.

1/10 da amostra de cDNA foi utilizada como molde para os 40 ciclos de PCR realizados com o iniciador reverso ancorado e um dos iniciadores *forward*, de acordo com o gene de *pst* analisado

1/5 do produto final de PCR foi resolvido em gel de agarose 1 % e corado com brometo de etídio. Como controle negativo, todos os procedimentos acima foram realizados, com exceção da inclusão da enzima transcriptase reversa durante a síntese da primeira fita de cDNA.

3.13 Ensaio de CAT

Os plasmídios derivados de pKK232-8 contendo a seqüência promotora de cada um dos genes de *pst* foram inseridos em MG1655. Todas as cepas utilizadas neste ensaio foram cultivadas em meio A +Pi e meio A -Pi até o início a fase exponencial. A carência de Pi foi verificada através de ensaios de FA. Em seguida, a cultura foi centrifugada e o *pellet* foi congelado a -20°C. As células foram ressuspensas em 0,1M Tris pH 7,5 e sonificadas por 20 min a pulsos de 9 segundos em amplitude 10%, intercalados com intervalos de também 9 segundos. O extrato contendo as células lisadas foi centrifugado e o sobrenadante foi congelado a -80°C até o momento do ensaio (24h, no máximo).

Os ensaios de CAT foram realizados conforme descrito em Shaw (1975). Neste ensaio, a acetilação de cloranfenicol libera um grupo CoA sulfidril que reage com o substrato 5,5' ditiobis-2 ácido nitrobenzóico (DTNB) liberando 5-tio-2-nitrobenzoato. Este último possui um coeficiente de extinção de 13.600 no comprimento de onda de 412 nm. Desta forma, é possível observar indiretamente o ritmo de acetilação de cloranfenicol. Os extratos de células foram incubados com 0,4 mg de DTNB e 0,5 mM de acetil-CoA diluídos em 0,1M de Tris pH 7,5. A reação foi iniciada com a adição de 2 mM de cloranfenicol e a atividade foi monitorada através do aumento da absorbância a 412 nm a 37°C. A atividade enzimática foi calculada pela fórmula:

$$\text{Atividade} = \frac{\text{taxa de aumento de } A^{412} \times 1000}{13,6 \times \text{mg proteína} \times \text{min}}$$

3.14 Quantificação de Proteínas

A concentração de proteínas foi medida através do método de Bradford (1976). A absorbância do produto da reação foi medida no comprimento de onda 595 nm. A concentração de proteínas foi calculada de acordo com a fórmula obtida através de curva de calibração com albumina bovina (BSA):

$$y = (0,0045x + 0,108)$$

Onde: y = absorbância a λ^{595} e x = concentração de proteínas ($\mu\text{g/ml}$).

3.15 Testes de Complementação de FA de mutantes constitutivos

Construções plasmidiais foram introduzidas em mutantes *pst* por eletroporação. As cepas mutantes e seus respectivos transformantes foram cultivados durante a noite em meio A +Pi. A atividade de FA das culturas foi medida pelo método quantitativo.

3.16 Extração e eletroforese de proteínas periplasmáticas

Bactérias cultivadas durante a noite em meio A +Pi foram diluídas 50 vezes no mesmo meio e em meio A –Pi. As culturas foram cultivadas até a entrada das células na fase de carência de Pi, monitorada através de ensaios de FA. A cultura foi centrifugada e lavada duas vezes em tampão 0,1M Tris-HCl pH 8,0 acrescido de 30 mM de NaCl. As células foram ressuspensas em 100 μl de solução 0,1M Tris-HCl pH 8,0 contendo 20% de sacarose. Foi adicionado 1mM de K_2HPO_4 à cultura de células não carentes para evitar que estas entrem na fase de carência de Pi durante a incubação subsequente. Em seguida, as bactérias foram incubadas por 1h à 37°C na presença de 20 μg de lisozima. O produto da digestão foi centrifugado e as proteínas periplasmáticas contidas no sobrenadante foram resolvidas em gel desnaturante contendo 1% de SDS,

poliacrilamida 12,5% e tampão TBE (45 mM Tris-ácido bórico, 1 mM EDTA). Após a eletroforese o gel foi corado com Comassie-brilliant-blue.

3.17 Ensaio de extensão de iniciador (*primer extension*)

Para marcar as extremidades dos iniciadores, 700 pmol de oligonucleotídeos foram incubados com 2 µl de α -³²P-ATP (6000 Ci/mmol) e 10 U de T4 polinucleotídeo quinase (Fermentas) por 2h a 37°C. Após a incubação, os produtos da reação foram extraídos duas vezes com 1 volume de solução de fenol-clorofórmio 1:1 pH 8,0. As amostras foram precipitadas com etanol e ressuspensas em água deionizada. O nível de radioatividade foi medido em um cintilador.

Para as reações de extensão de iniciadores, RNA foi extraído da cepa MA2 (pBS10 transformado em MG1655 Δ *pst*) e, como controle positivo, foi utilizado RNA extraído de BS7 contendo o plasmídeo pEY37 (*ppst*^r). As amostras de RNA foram extraídas de células no início da fase de carência de Pi cultivadas em T-salts.

A reação de extensão foi realizada de acordo com Sambrook e Russel (2001). 50µg de RNA foram precipitados junto com 10⁶ cpm do oligonucleotídeo marcado e ressuspensos em seguida em uma solução contendo 1U/µl de Superscript III (Invitrogen) e tampão (10 mM MgCl₂; 1,6 mM de dNTPs; 50 µg/ml de actinomicina D; 0,1 U/µl de inibidor de RNase (Invitrogen); 10mM DTT e 20 mM Tris-HCl pH 8,4), e incubado por 2 h a 50°C. O produto da reação de extensão foi extraído com fenol/clorofórmio 1:1 pH 8,0, novamente extraído com um volume de clorofórmio, precipitado com etanol, ressuspendido em tampão de corrida (80% formamida; 10mM EDTA pH8,0; 1mg/ml xileno cianol; 1mg/ml azul de bromofenol) e resolvido em gel desnaturante de poliacrilamida 8% juntamente com o produto de sequenciamento de M13 que foi utilizado como marcador de peso molecular. Após a eletroforese, o gel foi seco e exposto a filme de raios-X por pelo menos 24h, dependendo da intensidade do sinal.

O sequenciamento de M13 foi realizado utilizando o kit Thermo Sequenase Cycle Sequencing Kit – USB, conforme especificações do fabricante.

3.18.1 Construções Plasmidiais

O plasmídio pMA3 foi construído a partir da ligação do gene *pstS* (amplificado por PCR com os iniciadores *pst+* e *pstS1333*) com o vetor pGEM T-easy (Promega), conforme recomendações do fabricante. Para construir pMA6, o plasmídio pMA3 foi digerido com EcoRI (Fermentas) e o fragmento de DNA correspondente a *pstS* foi extraído do gel e purificado utilizando o de kit de purificação PureLink Quick Gel Extraction Kit (Invitrogen). O fragmento *pstS* foi então subclonado no sítio EcoRI de pKK232-8. Para a construção de pMA9, o fragmento de *pstS* de pMA3 foi subclonado em pEU720 no sítio EcoRI.

O vetor pMA4 contém *pstS* mais a seqüência REP clonadas em pGEM T-easy a partir de um fragmento de PCR utilizando os iniciadores *pst+* e *pstCpr-*. A seqüência clonada em pMA4 foi subclonada em pEU720 no sítio EcoRI, originando o vetor pMA10.

Para construção de pMA11, o gene *pstB* foi amplificado através de PCR com os iniciadores *pstBpr+* e *phoUpr-* clonado em pGEM T-easy e subclonado em pKK232-8 no sítio EcoRI.

3.18.2 Mutação sítio dirigida para deleção da estrutura REP localizada abaixo do gene *pstS*

Foi utilizada uma adaptação do método descrito por WANG e WILKINSON (2001) para deletar a seqüência REP localizada abaixo do gene *pstS*. A estratégia consistiu em amplificar o plasmídio pBS6 (*pstSCAB-phoU⁺* clonado em pGB2) em sua totalidade excetuando-se a seqüência REP. Posteriormente, o produto de PCR foi circularizado originando um novo plasmídeo que contém uma deleção de REP na seqüência de *pst* (Figura 8).

A reação de PCR foi realizada com 50 ng de pBS6, utilizado como molde, 150 ng de cada um dos iniciadores REP-forward e REP-reverse, 200 µM de dNTPs, 5% de DMSO e 2,5 U de Taq polimerase Pfx (Invitrogen). O

DNA foi amplificado por 30 ciclos de 1 min de desnaturação a 94°C; 1 min de anelamento à 60°C e 18 min de extensão à 68°C. Após a amplificação, o fragmento de DNA foi incubado por 2h a 37°C com a enzima DpnI, para eliminar o molde pBS6 (DpnI digere somente seqüências de DNA metiladas, não afetando, portanto, o produto de PCR). Posteriormente, a amostra foi purificada, precipitada e o DNA foi recircularizado através de reação de ligação com 1U de T4 DNA ligase por 20h a 4°C. O produto da ligação, denominado pMA7, foi transformado em células competentes DH10B.

Figura 8 - Estratégia de deleção da seqüência REP. O plasmídeo pBS6, contendo o operon *pst*, foi amplificado através de PCR excetuando-se a seqüência REP localizada na região não codificante entre os genes *pstS* e *pstC*. O produto de PCR foi tratado com DpnI para eliminar vestígios pBS6 utilizado como molde. Os fragmentos de DNA produzidos pela PCR foram então purificados e circularizados para formar o novo vetor denominado pMA7 que contém todo operon *pst*, excetuando a seqüência REP.

A deleção da sequência REP foi confirmada através de PCR com os iniciadores *pst1300 forward* e *pst1403 reverso* e através de sequenciamento.

3.19 Cálculo da meia-vida de mRNAs

Os autorradiogramas foram escaneados e a intensidade de bandas de RNA foi analisada pelo programa Image J; o cálculo da meia-vida de mRNAs foi feito através da comparação entre as bandas obtidas em diferentes intervalos segundo a fórmula:

$$S=S_0 \cdot e^{-kt} \text{ e } T_m = \ln 2/k$$

Onde, S é a densidade da banda no último tempo em que ainda é visível;

S_0 é a densidade da banda no tempo 0;

k é a taxa de decaimento do sinal;

t é o tempo decorrido entre a primeira e a última medição;

t_m é a meia vida do mRNA

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 PADRÃO DE TRANSCRIÇÃO E DEGRAGAÇÃO DO OPERON *pst*

4.1.1 Padrão de Transcrição do operon *pst*

Para determinar o padrão de transcrição do operon *pst*, foram realizados ensaios de hibridização northern utilizando RNA extraído da cepa MG1655 de *E. coli* K-12 e de seus mutantes isogênicos BS1 (*phoB23*) e BS7 (Δ *pstSCAB-phoU*), cultivados em excesso e em concentração limitante de Pi. As hibridizações foram realizadas com sondas de DNA correspondentes a seqüência de cada um dos cinco genes de *pst* separadamente e com uma sexta sonda que continha a seqüência de todo o operon.

Bactérias cultivadas exponencialmente foram ressuspensas em meio T-salts contendo 0,05 mM de Pi. Amostras foram coletadas após 10 min (bactérias não carentes) e 60 min (bactérias carentes de Pi) de incubação. A indução do regulon PHO foi monitorada através de ensaios de FA, conforme indicado na Tabela 3.

Tabela 3 - Atividade de FA da cepa MG1655 e de seus mutantes *phoB23* e Δ *pstSCAB-phoU*. Os dados representam a atividade específica de FA antes e após a entrada das células na fase de carência de Pi.

Cepa	Genótipo	Atividade de Fosfatase Alcalina	
		Excesso de Pi	Carência de Pi
MG1655	Cepa selvagem	0,07	0,65
BS1	<i>phoB23</i>	0,04	0,02
BS7	Δ <i>pstSCAB-phoU</i>	5,15	6,03

O nível de produção de FA na cepa selvagem carente de Pi é mais de 9 vezes superior ao da cultura não carente, indicando que os genes do regulon PHO estão plenamente induzidos nestas condições. Conforme esperado, o mutante *phoB23*, que não produz o ativador transcricional de PHO, manteve

apenas um nível basal de FA enquanto o mutante constitutivo $\Delta pstSCAB-phoU$ demonstrou alta atividade de FA mesmo em condições de excesso de Pi.

Amostras de RNA extraídas das culturas acima foram utilizadas em ensaios de hibridização northern (Figura 9). Somente as amostras provenientes da cepa selvagem carente de Pi hibridizaram com as sondas marcadas, indicando especificidade nos sinais de hibridização.

A sonda correspondente a *pstS* hibridizou com duas bandas principais, uma de 0,95 Kb e a outra de 1,2 Kb; uma terceira banda com cerca de 2,6 Kb pôde ser visualizada após uma exposição mais prolongada. Os transcritos de menor tamanho podem corresponder a duas formas distintas da mensagem de *pstS*. Outra possibilidade seria a presença de dois sítios de início de transcrição em *pstS*, mas MAKINO et al (1988) demonstraram que há somente um sítio promotor acima da ORF do gene. Portanto, a presença de duas formas de *pstS* deve-se possivelmente a digestão do mRNA de *pstS* em dois sítios específicos logo após sua síntese.

O transcrito de 2,6 Kb corresponde a um mRNA contendo além de *pstS*, a mensagem dos genes *pstC* e *pstA*. Embora o tamanho esperado para o transcrito correspondente aos três genes seja cerca de 2974 pb, há um sítio contendo repetições invertidas entre os nucleotídeos 2848 e 2887 dentro da sequência de *pstA* (nº de acesso da sequência de *pst* K01992). Tais sequências têm a capacidade de formar uma estrutura secundária em forma de alça que poderia agir como sítio de clivagem para a ribonuclease E. Se o mRNA for clivado neste local, o tamanho esperado para o transcrito seria de 2,6 Kb.

As hibridizações com as sondas *pstC* e *pstA* apresentaram sinais de hibridização similares: uma banda mais expressiva de 2,6 Kb, representando um transcrito englobando os três primeiros genes do operon - *pstS*, *pstC* e *pstA*- e uma segunda banda mais fraca com 1,5 Kb, que provavelmente corresponde a um transcrito contendo *pstC* e a parte de *pstA* acima do sítio de repetições invertidas.

A hibridização com a sonda correspondente ao gene *pstB* detectou 3 bandas distintas: de 2,6 Kb; 1,7 Kb e 0,9 Kb. A banda de 2,6 Kb representa o transcrito englobando os genes *pstA*, *pstB* e *phoU*, cujo tamanho é 2573 pb. A

banda de 1,7 Kb corresponde a um transcrito contendo *pstB* e *phoU* com 1570 pb e a banda menor de 0,9 Kb corresponde ao mRNA de *pstB* com 829 pb.

A sonda *phoU* também hibridizou com 3 bandas: uma com 2,6 Kb englobando *pstA*, *pstB* e *phoU*, outra de 1,7 Kb correspondendo aos genes *pstB* e *phoU* e uma banda de 0,9 Kb que corresponde ao mRNA de *phoU* somente.

Na hibridização com uma sonda contendo a seqüência de todo operon *pst* revelaram-se três bandas: duas principais com 0,95 Kb e 1,2 Kb e um sinal mais fraco de 2,6 Kb. O padrão de bandas detectado aqui é praticamente idêntico ao apresentado pela hibridização com a sonda correspondente a *pstS*.

Figura 9 - Análise de hibridização northern do operon *pst*. As sondas utilizadas nas hibridizações estão indicadas na parte superior de cada figura. RNA foi extraído de MG1655 (cepa selvagem), BS1 (*phoB23*) e BS7 ($\Delta pstSCAB-phoU$) cultivadas em concentração excedente (+) ou limitante (-) de Pi. Os tamanhos em Kb das bandas estão indicados pelas setas.

A Figura 10 ilustra as sondas utilizadas, o tamanho das bandas detectadas e a provável identidade dos transcritos observados.

Em todas as hibridizações efetuadas, os sinais indicaram a presença de vários transcritos de *pst* com tamanhos variando entre 0,9 e 2,6 Kb, mas uma banda de aproximadamente 4,7 Kb, correspondente ao transcrito contendo a seqüência do operon inteiro não pôde ser detectada. Isto sugere que o transcrito primário de *pst* é consideravelmente instável ou que *pst* não constitui um verdadeiro operon, pois seus genes não seriam transcritos conjuntamente. Outra observação importante é que o transcrito correspondente ao primeiro gene do operon – *pstS* – é o mais abundante entre os demais, pois a hibridização com uma sonda englobando a seqüência de todos os genes do operon apresentou um padrão idêntico àquele observado com a sonda correspondente a *pstS*.

Figura 10 - Representação das sondas de DNA e dos transcritos do operon *pst* detectados através de hibridizações northern. Os retângulos representam as regiões codificadoras dos genes do operon. A seqüência promotora está representada pelas duas pho-boxes e pela seqüência -10. As potenciais estruturas secundárias formadas após a transcrição estão representadas pelas hastes-laço em preto. As barras acima do operon representam as sondas utilizadas nas hibridizações e as linhas pontilhadas abaixo representam a posição e o tamanho em Kb dos sinais detectados com cada uma das sondas utilizadas.

4.1.2 Detecção do Transcrito Primário do operon *pst*

Se a ausência de um sinal correspondente ao transcrito primário de *pst* nas hibridizações northern deve-se a instabilidade do transcrito, seria possível detectá-lo utilizando uma técnica mais sensível. Com esta finalidade, foram realizados ensaios de RT-PCR com RNA extraído da cepa selvagem MG1655 cultivada sob condições de carência de Pi.

Nos ensaios preliminares, as amostras de RNA foram previamente tratadas com DNase I para eliminar contaminações com DNA genômico. A reação de transcrição reversa foi feita com o iniciador reverso phoUpr- cuja sequência é similar a extremidade 5' do último gene do operon – phoU. As reações de PCR foram realizadas com o mesmo iniciador reverso associado a cada um dos iniciadores “forward” pstCpr+, pstApr+, pstBpr+ ou phoUpr+.

A reação de PCR feita com o iniciador pstCpr+ detectaria o transcrito contendo a sequência de todo operon; o iniciador pstApr+ detectaria o transcrito englobando quatro genes (*pstCAB-phoU*); a reação feita com o iniciador pstBpr+ detectaria o transcrito englobando os 3 genes distais *pstAB-phoU* e o iniciador phoUpr+ detectaria o transcrito englobando *pstB-phoU*.

Num primeiro ensaio foram detectados transcritos correspondentes a *pstC-pstA-pstB-phoU* (2250 pb), *pstA-pstB-phoU* (1123 pb) e *pstB-phoU* (302 pb), Figura 11A linhas 3, 5 e 7, respectivamente. Os controles das respectivas amostras (linhas 4, 6 e 8) demonstraram-se negativos, evidenciando a especificidade da reação. Todavia, nenhum produto para o transcrito que englobasse todos os genes do operon foi detectado (Figura 11A, linha 1).

A

B

C

Figura 11 - Detecção do transcrito primário do operon *pst*. **A** – RT-PCR convencional usando RNA tratado com DNaseI, o iniciador utilizado na reação de transcrição reversa foi phoUpr-, na reação de PCR foi utilizado o mesmo iniciador reverso associado a pstCpr+ (linhas 1 e 2), pstApr+ (linhas 3 e 4), pstBpr+ (linhas 5 e 6) e phoUpr+ (linhas 7 e 8). Em **B** – RT-PCR convencional utilizando RNA sem tratamento com DNase I, os iniciadores utilizados nestas reações foram os mesmos utilizados no item A. Em **C** – EXACT RT-PCR modificado, na reação de transcrição reversa foi utilizado RNA sem tratamento com DNaseI e o iniciador RT, nas reações de PCR foram utilizados o iniciador reverso ancorado juntamente com os iniciadores pstCpr+ (linha 1 e 2), pstApr+ (linha 3 e 4), pstBpr+ (linha 5 e 6) e phoUpr+ (linha 7 e 8). As linhas indicadas com número ímpares representam 1/10 das amostras de PCR enquanto os números pares são os respectivos controles. M representa 150 ng do marcador padrão DNA ladder plus (Fermentas).

Apesar de diversas tentativas, a falta de êxito na detecção do transcrito correspondente a *pstSCAB-phoU* sugeriu novamente a instabilidade do transcrito primário de *pst*. Esta molécula instável degradada em etapas que antecedem a reação de transcrição reversa, ou seja, durante o tratamento com DNase I. Nesta etapa, a presença de cátions divalentes no tampão da reação em conjunto com quantidades minúsculas de contaminação por RNases provenientes de soluções utilizadas no tratamento com DNase I ou do ambiente de trabalho, fazem com que moléculas de RNA (especialmente as mais longas) acabem sofrendo algum tipo de degradação [WIAME et al, 2000]. Contudo, em reações de RT-PCR convencional o tratamento com DNase I é imprescindível para a eliminação de produtos falso-positivos resultantes de amplificação de DNA genômico ou plasmidial. Na ausência de tratamento com DNase I, todas as amostras controle apresentaram bandas resultantes da amplificação de contaminação (Figura 11 B, linhas 2, 4, 6 e 8).

Para solucionar este problema, a técnica de EXACT RT-PCR [SMITH et al, 2001] foi adaptada para a síntese e amplificação de cDNA a partir de RNA de procariotos.

Para amplificar o transcrito de *pst* através desta técnica, a reação de transcrição reversa foi realizada com um iniciador especial (iniciador RT com 42 pb), nos quais metade de sua sequência na extremidade 3' possui similaridade com uma sequência do gene *phoU* e a outra metade na extremidade 5' não se assemelha a nenhuma sequência do genoma de *E. coli*. Desta forma, a fita de cDNA sintetizada a partir deste iniciador passa a conter uma cauda incorporada em sua extremidade 3' que não possui similaridade com *pst* e nem com nenhuma sequência do genoma.

A cauda incorporada no cDNA serve como sítio de anelamento para o iniciador reverso ancorado cuja sequência é complementar somente a cauda do cDNA. Durante a PCR, o iniciador reverso ancorado juntamente com um dos iniciadores “forward” correspondente aos genes *pstS*, *pstC*, *pstA* ou *pstB* são utilizados para amplificar os transcritos de *pst* (Figura 7- Materiais e Métodos).

Com esta técnica, o produto do transcrito primário de *pst* (*pstSCAB-phoU*) com 3229 pb pôde ser detectado (Figura 11 C, linha 1). Conforme

esperado, transcritos menores correspondentes as mensagens de *pstCAB-phoU* com 2271 pb (linha 3); *pstABphoU*, com 1144 pb (linha 5) e *pstBphoU* com 323 pb (linha 7) também foram observados. Os controles negativos apresentaram-se totalmente limpos (linhas 2, 4, 6 e 8).

Em conclusão, a existência de uma molécula de mRNA contendo a seqüência dos cinco genes de *pst* pôde ser comprovada somente através da técnica de EXACT RT-PCR modificado. A dificuldade em detectar o transcrito primário de *pst* em ensaios de hibridização northern e RT-PCR convencional indica sua extrema instabilidade, sugerindo um processo de degradação do mRNA imediatamente após a conclusão de sua transcrição.

4.1.3 Degradação do Transcrito primário de *pst*

4.1.3.1 Papel da RNase E na degradação da mensagem de *pst*

A seqüência consenso para o sítio de clivagem da RNase E ainda é objeto de discussão, mas sabe-se que a endorribonuclease cliva preferencialmente seqüências ricas em adeninas e uracilas seguidas de uma estrutura secundária em forma de alça [ERHETSMANN et al, 1992].

A análise da seqüência de nucleotídeos de *pst* mostra que seu transcrito tem potencial para formar pelo menos três estruturas secundárias. Elas estariam localizadas na região não codificante entre os genes *pstS* e *pstC* (posição 1332 à 1352 pb na seqüência de número de acesso K01992); em uma região interna ao gene *pstA* (2848 à 2887 pb) e na região não codificante entre *pstA* e *pstB* (3288 à 3310 pb).

Para verificar o papel da RNase E na degradação do transcrito primário de *pst* foi utilizado um mutante condicional termossensível (ts). A atividade da RNase E foi inibida através do aumento de temperatura de cultivo de 37°C para 44°C. As hibridizações northern foram realizadas com RNA extraído do mutante cultivado em condições de excesso e limitação de Pi antes e após a elevação da temperatura para 44°C. A cepa de *E.coli* selvagem MG1655 recebeu o mesmo tratamento. As hibridizações foram realizadas com uma sonda de DNA correspondente a seqüência do gene *pstS* (Figura 12).

Na amostra de RNA do mutante termossensível carente de Pi cultivado à 44°C é possível observar uma banda de 4,7 Kb. Este resultado demonstra que o transcrito primário de *pst* é viável e que a RNase E participa da degradação desta molécula. Resultados similares foram observados quando o RNA do mutante termossensível foi hibridizado com uma sonda de DNA referente ao gene *pstC* (dados não apresentados).

Figura 12 - Efeito de um mutante RNase E⁻ sobre o padrão de transcrição de *pst*. O mutante *rne* e a cepa selvagem MG1655 foram cultivados em condições de excesso (+) ou carência (-) de Pi à 37°C ou à 44°C por 40 min. Amostras de RNA extraídas destas culturas foram transferidas para uma membrana de nylon e hibridizadas com sonda de DNA correspondente ao gene *pstS*. As setas indicam o tamanho das bandas em Kb.

Embora o transcrito primário tenha sido estabilizado pela inativação da RNase E, bandas menores, referentes ao transcrito de *pstS* (Figura 12) puderam ser observados mesmo em bactérias cultivadas à 44°C. Isto sugere que a RNase E pode não ter sido totalmente inativada ou que outras endorribonucleases participam da degradação do transcrito de *pst*. Para testar a segunda hipótese, o efeito de mutações em outras ribonucleases sobre a degradação de *pst* foi investigado.

4.1.3.2. RNase III e a estabilidade do mRNA de *pst*

A RNase III é reconhecida como uma endorribonuclease que inicia o processo de degradação de mRNA por clivagem de RNA dupla fita [ROBERTSON, 1982 apud NICHOLSON, 1999]. Como o transcrito de *pst* possui potencial para formar estruturas secundárias, o efeito que um mutante *rnc* teria sobre o padrão de transcritos de *pst* foi testado.

Figura 13 - Efeito de mutações *rnc* sobre o padrão de transcrição de *pst*. O crescimento das bactérias em excesso (+) ou carência (-) de Pi está indicado. MG1655 é a cepa selvagem utilizada como controle do experimento. O mutante *rnc* (cepa SK7622) não produz a RNase III. A hibridização foi realizada com sonda *pstS*. O tamanho das bandas obtidas está indicado pelas setas.

Análises de hibridização northern foram realizadas com amostras de RNA extraídas da cepa SK7622 (mutante *rnc*, RNase III negativo) cultivado em condições de excesso e limitação de Pi. A hibridização foi feita com uma sonda de DNA referente ao gene *pstS* (Figura 13).

Não foi observada nenhuma alteração no padrão de bandas dos mutantes *rnc* quando comparados à cepa selvagem. A banda de ~2,6 Kb corresponde ao transcrito contendo *pstSCA* e a banda de ~1,0 Kb representa um transcrito contendo o gene *pstS*. Nenhuma banda contendo um transcrito de 4,7 Kb foi detectada, indicando que a RNase III não está envolvida na degradação do transcrito primário de *pst*.

4.1.3.3 Efeito da ribonuclease MazF sobre o transcrito de *pst*

A carência de Pi representa um estresse nutricional para a célula; nestas circunstâncias a toxina MazF, que possui atividade ribonucleolítica e acumula-se no citoplasma, poderia participar da degradação do transcrito de *pst*. Para testar o efeito de MazF sobre o transcrito primário de *pst* foram realizados ensaios de hibridização northern utilizando RNA extraído de um mutante que possui o operon *mazEF* deletado.

RNA extraído de bactérias cultivadas em condições de excesso e limitação de Pi foi hibridizado com sonda referente ao gene *pstS* (Figura 14). Observa-se uma banda forte de aproximadamente 1,0 Kb e outra mais fraca de 2,6 Kb. A banda maior corresponde ao transcrito *pstSCA* e a banda menor corresponde ao transcrito contendo somente o gene *pstS*, conforme observado em outras hibridizações (Figura 9).

O padrão de transcritos dos mutantes e do controle selvagem é idêntico, não sendo observado um transcrito de 4,7 Kb. Estes resultados indicam que a ribonuclease Maz F não deve estar envolvida na degradação do mRNA de *pst*.

Figura 14 - Efeito da mutação $\Delta mazEF$ sobre o padrão de transcrição de *pst*. RNA foi extraído do mutante *mazEF* e da cepa selvagem MG1655 cultivados em excesso (+) ou carência (-) de Pi e hibridizado com uma sonda referente ao gene *pstS*. As setas à direita indicam os tamanhos dos transcritos.

4.2 ATIVIDADE REGULATÓRIA DAS SEQÜÊNCIAS NÃO CODIFICANTES DO OPERON *pst*

O operon *pst* possui três seqüências intergênicas (Figura 4), que podem exercer alguma atividade regulatória sobre os genes de *pst*. A análise da seqüência de nucleotídeos indica a possibilidade de formação de estruturas secundárias após a transcrição das regiões localizadas entre os genes *pstS-pstC* e entre os genes *pstA-pstB*. Existe ainda a possibilidade de existência de um promotor convencional localizado na região anterior a *pstB* [AMEMURA, 1985]. Neste capítulo são descritos diversos ensaios realizados para determinar a atividade promotora em regiões internas do operon *pst*.

4.2.1 Detecção de atividade promotora nas seqüências a 5' das regiões codificadoras dos genes de *pst*

A atividade promotora das seqüências internas de *pst* foi testada utilizando fusões com o gene reporter *cat*, que codifica para a cloranfenicol acetil transferase.

As seqüências localizadas na região anterior as ORFs dos genes *pstC*, *pstA*, *pstB* e *phoU* foram clonadas no vetor pKK232-8 criando fusões com o gene *cat*. A presença de terminadores de transcrição acima do sítio de clonagem e abaixo do gene *cat* faz deste vetor um bom veículo para a detecção de promotores de baixa expressão, pois evita a transcrição do gene repórter na ausência de uma seqüência promotora ligada ao sítio de clonagem.

Os plasmídios construídos foram introduzidos na cepa selvagem MG1655 e os transformantes cultivados em condições de excesso ou limitação de Pi. A atividade de CAT foi medida através de espectrofotômetro e está ilustrada na Figura 15.

Figura 15 - Atividade promotora a partir das seqüências intergênicas de *pst*. Bactérias foram cultivadas em excesso (+) ou carência (-) de Pi e testadas quanto à atividade do gene repórter *cat*. O nome do gene no eixo X (*pstC*, *pstA*, *pstB* e *phoU*) indica a fusão da sua região promotora potencial com o gene *cat* e pKK232-8 representa o vetor no qual nenhuma seqüência foi clonada. A atividade específica de CAT indicada no eixo Y refere-se aos valores de 3 experimentos independentes.

Os resultados dos ensaios para detecção do gene repórter mostram que as seqüências localizadas acima dos genes *pstC*, *pstB* e *phoU* demonstraram atividade promotora funcional significativa. A maior atividade de CAT foi verificada para a seqüência localizada acima de *phoU*, sendo um pouco maior durante a carência de Pi e 7,6 vezes maior do que a atividade do controle (pKK232-8). A seqüência localizada acima da ORF de *pstC* apresentou uma atividade 4,8 vezes maior do que a do controle negativo (pKK232-8), independentemente do estado de carência de Pi. Em contrapartida, a seqüência de *pstB* demonstrou atividade de CAT significativa somente em células carentes de Pi, e mesmo assim, bem menor do que a atividade registrada para as seqüências de *pstC* ou *phoU*.

A seqüência de *pstA* não demonstrou atividade de CAT significativa, sugerindo que não há nenhuma seqüência promotora acima de *pstA*, conforme esperado, pois acima da ORF de *pstA* não há região intergênica.

A atividade promotora das seqüências localizadas na região anterior as ORFs de *pstC*, *pstB* e *phoU* sugere que estes genes podem ser transcritos em pequena escala a partir de promotores próprios além de serem transcritos a partir do promotor principal do operon.

O promotor interno de *pstC* não foi significativamente afetado pela carência de Pi, indicando que este não é regulado pelo sistema PhoB-PhoR.

A seqüência promotora de *phoU* apresentou um ligeiro aumento no nível de atividade em condições de carência de Pi. Contudo, comparando-se a indução na atividade do promotor principal do operon (Tabela 4), este aumento é insignificante. Além do mais, não há seqüências consenso do tipo PHO-box acima de *phoU*.

Amemura *et al*, 1985 postularam a presença de um promotor convencional (– 10 e – 35) na região anterior a *pstB*, mas surpreendentemente, esta região apresentou uma atividade promotora bastante fraca, que pôde ser detectada somente em condições de carência de Pi, embora não haja indícios da presença de seqüências PHO-box nesta região.

Tabela 4 - Comparação da atividade promotora das seqüências internas de *pst* e o promotor principal do operon. A média da atividade das seqüências promotoras foi subtraída do valor correspondente ao controle (pKK232-8) e comparada a atividade de PpstS em condições de excesso (+Pi) e limitação de Pi (-Pi).

Fusões das regiões promotoras putativas com o gene <i>cat</i>	Atividade de CAT (+Pi)	Relação PpstS/Ppst (+Pi)	Atividade de CAT (- Pi)	Relação PpstS/Ppst (– Pi)
<i>pstS</i>	78,15	-	3407,02	-
<i>pstC</i>	17,35	4,5	19,6	173
<i>pstA</i>	-	-	-	-
<i>pstB</i>	-	-	6,9	494
<i>phoU</i>	23,95	3,2	34,1	100

Quando comparado ao promotor de *pstS*, a atividade promotora das regiões acima de *pstC*, *pstB* e *phoU* chega a ser centenas de vezes menor em condições de carência de Pi e de 3 a 4 vezes menor em condições de excesso de Pi (Tabela 4).

Estes dados indicam que *PpstS*, mesmo quando não induzido, possui uma atividade basal maior do que a dos promotores internos do operon. Todavia, as seqüências analisadas possuem uma atividade detectável e de acordo com outros experimentos relatados a seguir, elas são capazes de transcrever os genes relacionados. Os resultados também indicam que a transcrição a partir dos promotores de *pstC* e *phoU* deve ter relevância somente durante o crescimento em concentração não-limitante de Pi.

4.2.2 Detecção dos transcritos originados a partir da atividade dos promotores internos

Os ensaios de CAT sugerem a presença de função promotora significativa nas regiões anteriores aos genes *pstC*, *pstB* e *phoU*. Para testar se estas seqüências promotoras originam transcritos, foram realizados ensaios de hibridização northern utilizando RNA extraído do mutante BS7 ($\Delta pstSCAB-phoU$) transformado com pBS10 e da cepa selvagem MG1655 utilizada como controle.

O vetor pBS10 contém os 4 genes distais do operon *pst* (*pstCABphoU*) clonados em pKK232-8. O promotor principal e a porção 5' de *pstS* foram deletados de forma que somente transcritos originados a partir de seqüências promotoras internas a *pst* pudessem ser produzidos.

Amostras de RNA extraído de culturas cultivadas em excesso e em limitação de Pi foram tratadas com DNase I e hibridizadas com sondas contendo cada uma das seqüências dos genes analisados (Figura 16). O tratamento com DNase I foi necessário para eliminar resíduos de DNA plasmidial das amostras de RNA.

A hibridização com a sonda *pstC* mostra a existência de um transcrito com 2,6 Kb que deve conter a informação de pelo menos três genes (*pstC*, *pstA* e *pstB*). O transcrito menor com 1,5 Kb refere-se provavelmente ao mRNA contendo *pstC* e *pstA*. Estes transcritos são igualmente visíveis em condições de excesso ou carência de Pi.

Os produtos da hibridização com a sonda *pstA* são muito similares aos observados com a sonda *pstC*, ou seja, bandas de 2,6Kb e 1,5 Kb que caracterizam um mRNA englobando *pstCAB* e *pstCA*, respectivamente. A falta de atividade promotora na sequência acima de *pstA* (Figura 15) e a similaridade entre o padrão de transcritos de *pstC* e *pstA* sugere que os sinais detectados devem ser resultado da transcrição efetuada a partir do promotor de *pstC*.

Figura 16 - Padrão de transcrição dos genes distais de *pst* a partir de promotores internos. RNA extraído do transformante BS7 ($\Delta pstSCABphoU$) contendo pBS10 e de MG1655 cultivados em condições de excesso (+) ou limitação (-) de Pi foi hibridizado com sondas de DNA referentes aos genes *pstC*, *pstA*, *pstB* ou *phoU*. O tamanho dos transcritos detectados está indicado pelas setas.

O sinal detectado durante a hibridização com o gene *pstB* demonstrou ser significativamente mais forte em condições de carência de Pi, apresentando uma banda de 1,5 Kb referente ao transcrito contendo os genes *pstB-phoU*. Este resultado corrobora os dados obtidos nos ensaios para detecção de CAT que mostraram atividade de PpstB somente em condições de limitação de Pi (Figura 15). Uma molécula de 1,5 Kb também aparece nas hibridizações com a sonda *phoU*, que adicionalmente apresentou uma banda de 1,0 Kb, referente a mensagem deste gene produzida a partir do promotor *PphoU*.

A existência de várias espécies de mRNA detectadas nos ensaios de hibridização northern sugere que os genes mais distais do operon podem ser transcritos por um ou mais promotores internos. Aparentemente, *pstC* e *pstA* são transcritos a partir do promotor localizado acima de *pstC*. Já *pstB* e *phoU* podem ser transcritos a partir de promotores próprios e, em adição, *phoU* também pode ser transcrito a partir de PpstB.

4.2.3 Ensaio para detecção de transcritos derivados de pBS10 através de RT-PCR modificado

Para confirmar a transcrição dos genes de *pst* a partir de promotores internos e determinar quais genes seriam transcritos em uma mesma molécula de mRNA, foram realizadas análises de EXACT RT-PCR modificado. RNA foi extraído de BS7 ($\Delta pstSCABphoU$) e MA1 ($\Delta pstphoB$) transformados com pBS10 (*pstCABphoU*).

Amostras de RNA extraído de culturas carentes de Pi serviram de molde para a reação de transcrição reversa. Os iniciadores utilizados foram os mesmos usados nos ensaios para detecção do transcrito primário de *pst* (vide Figura 7 e item 4.1.2). O iniciador híbrido RT foi utilizado para a síntese da fita de cDNA e nas reações de PCR foram utilizados o iniciador reverso ancorado associado a um dos iniciadores “forward” *pstApr+*, *pstBpr+* ou *phoUpr+*, referentes aos genes *pstC*, *pstA* ou *pstB*, respectivamente.

Foi detectado um fragmento de DNA de 2271 pb correspondente ao produto de amplificação do transcrito *pstCAB-phoU* (Figura 17 linhas 1 e 4), indicando que a partir do promotor de *pstC* são transcritos, além de *pstC*, os

genes *pstA*, *pstB* e *phoU*. Conforme esperado, os produtos de RT-PCR correspondentes aos transcritos *pstAB-phoU* (linhas 2 e 5) e *pstB-phoU* (linhas 3 e 6) também foram detectados. Os produtos de amplificação puderam ser detectados também em um mutante *phoB*⁻, indicando que a transcrição a partir dos promotores internos é independente da presença do ativador transcricional PhoB. Entretanto, a reação de RT-PCR não é quantitativa e, portanto, não informa sobre o nível de transcrição dos genes de *pst* a partir de promotores internos. Na ausência de transcriptase reversa (controle negativo) nenhum produto de PCR foi observado (dados não apresentados).

Figura 17 - Detecção dos transcritos de *pst* a partir de promotores internos através de EXACT RT-PCR modificado. O plasmídio pBS10 foi transformado em BS7 ($\Delta pstSCABphoU$) e MA1 ($\Delta pstphoB$). O iniciador RT foi utilizado na reação de transcrição reversa; nas reações de PCR foram utilizadas o iniciador reverso ancorado junto ao iniciador *pstApr*⁺, linhas 1 e 4; *pstBpr*⁺, linhas 2 e 5 e *phoUpr*⁺, linhas 3 e 6.

4.2.4 Testes de complementação *in trans* de mutações *pst*

Os genes pertencentes ao regulon PHO são ativados somente em situações de carência de Pi, permanecendo reprimidos durante o cultivo em excesso de Pi. A repressão de PHO é efetuada por Pst através de um mecanismo ainda desconhecido, sabe-se apenas que quase todas as mutações em genes de *pst* causam a constitutividade de todos os genes do regulon [Wanner, 1996].

O gene *phoA*, que codifica para a FA, é constitutivamente expresso em mutantes *pst*. Devido à facilidade de detecção da FA através de ensaios bioquímicos, estes foram utilizados para determinar o grau de complementação de mutantes *pst* com plasmídios contendo a forma selvagem do gene analisado.

Mutantes para os genes *pstC*, *pstA*, *pstB* e *phoU* foram transformados com pBS10, que contém toda a sequência de *pst* com exceção do gene *pstS* e do promotor principal do operon. Os mutantes *pst* e seus transformantes foram cultivados durante a noite em meio LB e a atividade de FA das culturas foi mensurada (Figura 18).

Figura 18 - Complementação de mutantes *pst* com o plasmídio pBS10. Mutantes *pstC*, *pstA*, *pstB* e *phoU* e seus respectivos transformantes contendo pBS10 foram cultivados durante a noite em meio LB e testados em relação ao nível de FA. As barras representam a média e desvio padrão de 3 experimentos independentes.

De acordo com os dados obtidos, o nível de FA apresentado pelo mutante *pstC* foi reduzido em apenas uma vez e meia quando transformado com pBS10. No mutante *pstA*, o nível de FA foi reduzido quase na mesma proporção (1,8 vezes). Embora não haja sequência promotora na região anterior ao gene *pstA*, a complementação parcial se justifica, pois *pstA* seria transcrito a partir do promotor localizado acima de *pstC*.

A mutação *pstB* também foi parcialmente complementada, a atividade de FA no transformante foi reduzida 3,6 vezes, enquanto que em *phoU*, pBS10 chegou a reduzir em 20 vezes o nível de FA do mutante.

Os transformantes contendo pBS10 foram capazes de realizar a complementação parcial de todas as mutações *pst* analisadas. Contudo, os genes mais distais do operon também são transcritos a partir de promotores localizados acima de outros genes, como é o caso de *pstA* cuja transcrição é efetuada por *PpstC*. Os genes *pstB* e *phoU* também devem se beneficiar da atividade de outros promotores localizados ao longo do operon, uma vez que transcritos *pstCAB-phoU* ou combinações menores foram observados (vide Figuras 16 e 17).

Para determinar o grau de complementação proporcionado por cada sequência promotora isolada foram utilizados plasmídios nos quais as sequências codificadoras de *pstC*, *pstA*, *pstB* e *phoU* junto às suas respectivas regiões promotoras putativas foram clonadas individualmente em pKK232-8. Os vetores originados foram denominados pJV11 (*pstC*⁺), pJV12 (*pstA*⁺), pMA8 (*pstB*⁺) e pJV9 (*phoU*⁺).

Cada mutante *pst* foi transformado com o plasmídio contendo o respectivo gene selvagem e o grau de complementação da mutação foi verificado através de ensaios de atividade de FA, conforme descrito acima para os transformantes contendo pBS10.

Nestes testes, a mutação *pstC* foi complementada 1,6 vezes por pJV11 (*pstC*⁺), atividade semelhante a observada na complementação com pBS10. Este fenômeno era previsto, pois há apenas uma sequência promotora potencial acima de *pstC* presente no plasmídio pBS10.

A diferença entre o nível de FA do mutante *pstA* e de seu respectivo transformante é mínima, cerca de 1,1 vez; mesmo assim, os valores desta

redução estão dentro do desvio padrão apresentado pelo mutante e, portanto, pJV12 (*PpstA*⁺) não complementou a mutação *pstA*.

O transformante contendo pMA8 (*pstB*⁺) reduziu o nível de FA de seu mutante pela metade (1,94 vezes), esta atividade foi menor do que a do transformante contendo pBS10 (3,5 vezes), ressaltando a hipótese de que *pstB* seria transcrito por seu promotor e também por PpstC.

O grau de complementação do mutante transformado com pJV9 (*phoU*⁺) foi de 3,1 vezes, bem abaixo da forte complementação observada com pBS10. Isto sugere, que apesar do promotor de *phoU* ter a maior atividade promotora interna (Figura 15), uma parte considerável de sua transcrição provém dos promotores localizados acima das ORFs de *pstC* e *pstB*.

Figura 19 - Atividade de FA de mutantes e seus respectivos transformantes contendo cada um dos genes de *pst* clonados isoladamente. As cepas foram cultivadas em meio LB durante a noite. Os dados apresentados correspondem a média aritmética e desvio padrão de 3 ensaios independentes.

Os dados apresentados nos ensaios de complementação demonstram que *pstC*, *pstB* e *phoU* podem ser transcritos a partir de promotores internos ao operon. Entretanto, o nível de transcrição deve ser bastante discreto, pois o vetor de clonagem pKK232-8 possui cerca de 15 cópias/células, mas em nenhum caso foi observada a complementação total das mutações.

4.2.5 Localização dos inícios de transcrição de *pstC*, *pstB* e *phoU* a partir dos promotores internos

Os sítios de início de transcrição de *pstC*, *pstB* e *phoU* a partir de promotores internos ao operon *pst* foram localizados através de ensaios de extensão de oligonucleotídeo (*primer extension*). O mutante BS7 ($\Delta pstSCABphoU$) transformado com o plasmídeo pBS10 foi utilizado como fonte de mRNA.

As bactérias foram cultivadas em T-salts contendo 1 mM Pi até o início da fase exponencial, neste momento a cultura foi ressuspendida em T-salts contendo 0,05 mM Pi. RNA foi extraído de amostras de cultura cultivadas por 10 min (excesso de Pi) e 60 min (carência de Pi).

As amostras de RNA foram utilizadas como molde nas reações de extensão de oligonucleotídeos utilizando iniciadores localizados na região 5' de cada gene analisado. O produto da reação foi resolvido em gel de poliacrilamida ao lado do produto de seqüenciamento do fago M13 que serviu como marcador de peso molecular.

A extensão do iniciador de *phoU* (Figura 22) mostra a presença de 2 produtos obtidos em condições de carência de Pi. A banda de maior intensidade remete a uma guanina localizada na posição 4164 da sequência de *pst*. A sequência promotora proposta tem 50% de similaridade com as sequências -10 típicas de reconhecimento do fator σ^{70} enquanto a sequência -35 proposta tem apenas duas substituições em comparação com o consenso.

A investigação do sinal de menor intensidade não revelou uma sequência promotora potencial, indicando que esta banda pode ser resultado de uma terminação prematura da reação de transcrição reversa.

Figura 22 - Reação de extensão de oligonucleotídeo do gene *phoU*. O seqüenciamento foi realizado utilizando DNA de M13 e o local de início de transcrição foi indicado de acordo com o tamanho do produto comparado à distância percorrida pelo oligonucleotídeo utilizado na reação. Os produtos obtidos e o início de transcrição proposto estão indicados.

Nas três análises de extensão de oligonucleotídeos, as bandas de baixa intensidade obtidas a partir dos genes *pstC*, *pstB* e *phoU* indicam níveis de transcrição discretos a partir dos promotores internos. As seqüências promotoras propostas possuem apenas 50% de similaridade com o consenso para promotores dependentes de σ^{70} . A baixa similaridade com as seqüências consenso está de acordo com a expressão fraca observada a partir destes promotores. Apesar das bandas aparecerem somente em situação de carência de Pi, não foram encontrados PHO boxes nas regiões.

4.3 ANÁLISE DO POTENCIAL REGULATÓRIO DA SEQÜÊNCIA NÃO CODIFICANTE LOCALIZADA A 3' DO GENE *pstS*

4.3.1 Análise da função de terminação durante a transcrição

Baseados na análise de seqüências de nucleotídeos MAGOTA et al, 1984 postularam a existência de uma região regulatória localizada a 3' do gene *pstS*, esta seqüência seria responsável pela formação de um terminador transcricional independente de Rho.

Para determinar a atividade terminadora desta região, foram construídas fusões de *pstS* com o gene repórter *cat* em pKK232-8. As construções resultaram nos plasmídios pBS11 e pBS16; o primeiro engloba a maior parte da ORF de *pstS* e o último inclui, além de *pstS*, toda a região intergênica abaixo da ORF. Os dois vetores foram transformados na cepa selvagem MG1655 e ensaios para detecção da atividade do gene repórter foram efetuados com culturas cultivadas em excesso e em concentração limitante de Pi.

Conforme esperado, a transcrição a partir do promotor de *pstS* é fortemente induzida pela carência de Pi. Ambos os transformantes apresentaram apenas um nível basal de atividade durante o cultivo em excesso de Pi (Figura 23).

A atividade de CAT a partir de pBS16 mostra que a seqüência localizada abaixo de *pstS* diminuiu a transcrição do gene repórter em cerca de 15%, sugerindo que a estrutura secundária do mRNA formada a 3' de *pstS* pode atenuar parcialmente a transcrição dos genes distais do operon. Entretanto, esta atividade demonstra-se baixa para caracterizar esta estrutura como um terminador transcricional.

Uma análise mais aprofundada desta seqüência mostra que ela tem 75% de similaridade com seqüências REP. Estas seqüências contêm repetições invertidas que após a transcrição formam uma estrutura secundária em forma de haste-laço capaz de bloquear a ação de exonucleases [NEWBURY, 1987].

Figura 23 - Avaliação da função terminadora da sequência localizada a 3' do gene *pstS*. Atividade de CAT de transformantes MG1655 contendo pBS11 (*pstS'*) e pBS16 (*pstS* mais a sequência regulatória). O cultivo em excesso (+Pi) ou limitação (- Pi) de fosfato está indicado. Os dados apresentados referem-se à média e ao desvio padrão de 3 ensaios independentes.

Neste contexto, a principal função da sequência localizada a 3' de *pstS* poderia ser a estabilização da mensagem deste gene, tornando o transcrito de *pstS* mais estável do que os demais e aumentando a concentração molar de proteína (veja Figura 5).

4.3.2 Estabilização da mensagem de *pstS*

O potencial estabilizador da sequência localizada a 3' do gene *pstS* foi analisado em ensaios de hibridização northern utilizando RNA extraído de culturas tratadas com rifampicina. Este antibiótico liga-se a subunidade β da RNA polimerase, bloqueando sua atividade [CAMPBELL et al, 2001]. Após a

adição do antibiótico à cultura, a transcrição cessa, desta forma pode-se avaliar a estabilidade do mRNA ao extraí-lo de culturas tratadas com rifampicina em diferentes intervalos de tempo.

Os vetores pBS11 (*pstS*) e pBS16 (*pstS* mais a sequência regulatória) foram inseridos em BS7 ($\Delta pstSCABphoU$) para evitar a hibridização com o mRNA produzido a partir de *pstS* cromossomal; os transformantes expressam *pstS* constitutivamente devido a mutação Δpst .

Rifampicina foi adicionada à cultura no início da fase exponencial e alíquotas da cultura foram retiradas a cada 2 min para extração de RNA. As amostras coletadas antes da adição de rifampicina ao meio de cultura foram designadas como tempo 0'.

A Figura 24 mostra a hibridização northern com a sonda *pstS*. Nas amostras do transformante pBS16, o sinal correspondente a mensagem de *pstS* pode ser visualizada até 4 min após a adição do antibiótico. Em pBS11, o sinal de *pstS* é menos intenso, desaparecendo após 2 minutos de tratamento com o antibiótico.

É necessário notar que mesmo no minuto 0' (antes da adição da rifampicina) a diferença na intensidade da banda do transcrito de *pstS* entre os dois vetores já é grande. A alta instabilidade do mRNA de pBS11 ocorre devido a pronta digestão por ribonucleases e mesmo havendo síntese *de novo* de mRNA de *pstS*, esta não seria capaz de repor o “pool” de mensagens de *pstS*.

Figura 24 - Análise da função estabilizadora da seqüência regulatória localizada entre os genes *pstS* e *pstC*. Amostras de RNA foram extraídas dos transformantes antes da adição de rifampicina (tempo 0') e a cada dois minutos após a adição de 500 µg/ mL do antibiótico conforme indicado. A hibridização foi efetuada com sonda de DNA referente ao gene *pstS*. A seta a esquerda indica o transcrito de 1,0 Kb referente a *pstS*.

Além do sinal de *pstS*, um a banda de ~2,0 Kb, correspondente a uma possível fusão transcricional entre *pstS* e o gene *cat* presente no vetor também é observada.

Estes resultados demonstram que a seqüência localizada a 3' de *pstS* tem um papel importante na estabilização da mensagem do gene. Entretanto, existe a possibilidade de que a instabilidade do transcrito proveniente de pBS11 seja resultado não somente da ausência da seqüência REP, mas também devido a deleção de 245 bp da extremidade 3' na região codificadora de *pstS* (Figura 25).

1-pBS11

2-pMA6

3-pBS16

Figura 25 - Esquema das seqüências de *pstS* clonadas em pKK232-8 utilizadas para determinar a função estabilizadora da região intergênica *pstS-C*. 1- pBS11, contém uma deleção na extremidade 3' da região codificadora de *pstS*; 2- pMA6, contém toda região codificadora de *pstS* mas sem a seqüência REP; 3- pBS16, contém a região codificadora de *pstS* e a seqüência REP.

Para sanar esta questão, uma nova construção de *pstS* foi realizada. A região codificadora e o promotor do gene *pstS* foi amplificada por PCR e clonada em pKK232-8. Este novo vetor, que recebeu a denominação de pMA6, foi utilizado juntamente com pBS16 em novos ensaios de hibridização northern nos mesmos padrões do ensaio anterior (Figura 26).

Neste novo ensaio, a banda de ~1,0 Kb correspondente a *pstS* também mostrou ser mais estável na presença da seqüência REP; na ausência da região regulatória, a mensagem de *pstS* foi totalmente degradada após 2 minutos de incubação com rifampicina, exatamente como ocorreu com o transformante contendo pBS11.

Figura 26 - Estabilização de *pstS* pela seqüência regulatória REP. Hibridização northern da cepa BS7 ($\Delta pstSCABphoU$) transformada com vetor pMA6 (gene *pstS*) e pBS16 (gene *pstS*+REP). O tempo de incubação com rifampicina está indicado. O transcrito de *pstS* está indicado pela seta.

Estes resultados confirmam que a seqüência REP é responsável pela estabilização do transcrito de *pstS* e que na sua ausência a mensagem de *pstS* torna-se extremamente instável.

Para comparar a meia-vida do transcrito de *pstS* produzido a partir dos plasmídios com o transcrito produzido a partir do gene cromossomal, a estabilidade do mRNA de *pstS* da cepa selvagem MG1655 foi avaliada. Neste caso, RNA foi extraído de bactérias cultivadas em excesso e em condições limitantes de Pi antes de serem tratadas com rifampicina (Figura 27).

Figura 27 - Avaliação da meia-vida do transcrito de *pstS*. Hibridização northern de MG1655 com sonda *pstS*. Bactérias foram cultivadas em excesso (+Pi) ou concentração limitante (- Pi) de Pi. Os números acima de cada linha indicam o tempo de incubação da cultura após a adição de rifampicina. O transcrito de *pstS* está indicado.

A meia-vida do mRNA de *pstS* transcrito a partir do cromossomo de MG1655 e dos plasmídios pBS11, pBS16 e pMA6 foi calculada de acordo com a intensidade dos sinais apresentado nas hibridizações northern. A tabela 5 resume os dados obtidos.

Tabela 5 - Meia-vida do mRNA de *pstS* transcrito a partir do cromossomo e dos vetores utilizados neste trabalho. A meia-vida do mRNA foi calculada a partir da intensidade das bandas exibidas nos ensaios de hibridização northern.

Fonte de transcrição	MG1655 (cromossomo)	pBS16 (<i>pstS</i> + REP)	pBS11 (<i>pstS</i> Δ1072-1317)	pMA6 (<i>pstS</i>)
Meia-vida do transcrito de <i>pstS</i> em minutos	1,8	1,3	0,6	0,6

A meia-vida do mRNA de *pstS* transcrito a partir do cromossomo da cepa selvagem MG1655 foi de 1,8 minutos. Similarmente, pBS16 (*pstS*+REP) apresentou um transcrito de meia-vida de 1,3 minutos. Já na ausência da

seqüência REP (plasmídios pMA6 e pBS11), a meia-vida do transcrito caiu para 0,6 min, demonstrando a importância de REP na estabilização do mRNA.

Portanto, pode-se concluir que a seqüência REP a 3' de *pstS* forma uma estrutura secundária em forma de haste-laço capaz de promover a estabilização da mensagem de *pstS*.

4.3.3 O efeito de REP sobre a produção de PstS

Para avaliar se a estabilidade conferida pela seqüência REP resulta em maior quantidade de proteínas PstS, foram extraídas proteínas periplasmáticas de culturas de transformantes Δpst contendo pBS16 (*pstS* +REP) ou pMA6 (*pstS*). Proteínas da cepa selvagem MG1655 e do mutante BS7 ($\Delta pstSCABphoU$) foram extraídas como controle.

Figura 28 - Efeito da seqüência REP sobre o nível de proteínas PstS. SDS/PAGE de proteínas periplasmáticas extraídas das cepas MG1655, BS7, pMA6 e pBS16 transformados em BS7. As proteínas foram coradas com Comassie Brilliant Blue. A primeira linha equivale ao marcador Prestained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas). Os sinais (+) e (-) indicam o cultivo das cepas em excesso e em concentração limitante de Pi. A seta indica a posição da proteína PstS com 35 kDa.

O conteúdo periplasmático foi extraído de cepas cultivadas em excesso (+) e em concentração limitante (-) de Pi. As proteínas foram resolvidas em gel denaturante e coradas com Coomassie Brilliant Blue. Em todos os casos, a extração de proteínas periplasmáticas foi feita a partir de culturas contendo concentrações iguais de células.

A Figura 28 mostra a banda correspondente a PstS com 35 KDa, nota-se que sua concentração é maior em condições de carência de Pi. Tanto em carência como em excesso de Pi, a expressão de PstS a partir de pBS16 (*pstS* +REP) foi maior do que a verificada para pMA6 (*pstS*). Contudo, mesmo sem a seqüência REP, a produção de PstS a partir de pMA6 é superior à da cepa selvagem MG1655. A diferença na concentração de PstS ocorre porque pMA6 é um plasmídio de ~15 cópias, ao passo que há somente um cópia de *pstS* no cromossomo de MG1655.

No mutante Δpst pode-se observar a existência de uma banda fraca de peso molecular similar ao de PstS. Porém, a possibilidade desta proteína representar o produto de *pstS* fica descartada, pois ela não sofreu indução durante a carência de Pi.

Para evitar a super-expressão de PstS a partir das construções em pKK232-8, foi necessário utilizar outro vetor para clonar *pstS* $\pm$ REP. O vetor pGB2 possui poucas cópias replicativas e foi utilizado para a clonagem de todo o operon *pst* (incluindo a seqüência promotora principal localizada acima do gene *pstS*) originando pBS6. Este novo vetor foi utilizado como molde para a deleção sítio-dirigida da seqüência REP, dando origem ao plasmídio pMA7, conforme representado na Figura 29.

pBS6

pMA7

Figura 29 - Esquema das seqüências de *pst* clonadas no vetor pGB2. pBS6 contém todo o operon *pst* clonado em pGB2. Este vetor foi utilizado como molde para a construção de pMA7, no qual a seqüência REP localizada na região intergênica entre *pstS* e *pstC* foi deletada.

As novas construções foram inseridas em BS7 e a estabilidade do transcrito de *PstS* foi avaliada através de ensaios de hibridização northern.

Figura 30 - Estabilidade do transcrito de *pstS* clonado em pGB2. Hibridização northern com RNA extraído de pMA7 e pBS6 transformados em BS7 ($\Delta pstSCABphoU$) e hibridizados com uma sonda *pstS*. Os tempos marcados indicam os minutos de incubação da cultura após a adição de 500µg/mL de rifampicina. O transcrito de *pstS* está indicado.

Neste ensaio, a mensagem de *pstS* produzida a partir de pMA7 é totalmente degradada após 2 minutos. Contudo, a intensidade da banda de

pstS produzida por pMA7 no minuto zero é tão forte quanto a de pBS6. Nos ensaios anteriores, os transformantes contendo pBS11 e pMA6 (*pstS* sem REP) tiveram a mensagem de *pstS* bastante comprometida já no minuto 0, antes da adição do antibiótico. Esperava-se que o transcrito sem a estrutura estabilizadora fosse rapidamente degradado, apresentando diferenças na quantidade de mRNA já no minuto zero.

Ambos os plasmídios pBS6 e pMA7 carregam todo o operon *pst*, a única diferença é a presença ou não de REP a 3' de *pstS*. É possível que outras estruturas além de REP localizadas ao longo do operon estejam contribuindo para a estabilização do transcrito de *pstS*. Isto explicaria a diferença entre pMA7 e pMA6 em relação à estabilidade do transcrito de *pstS*.

Figura 31 - Produção de PstS a partir dos vetores derivados de pGB2. SDS-PAGE de proteínas periplasmáticas extraídas de MG1655, BS7 e de pBS6 e pMA7 transformados em BS7. As bandas foram coradas com Comassie Brilliant Blue. Os sinais (+) e (-) indicam cultivo das bactérias em excesso ou em limitação de Pi, respectivamente. A primeira coluna equivale ao padrão Prestained Protein Molecular Weight (Fermentas). A proteína PstS com 35 KDa está indicada.

A capacidade de produção da proteína PstS a partir de pBS6 e pMA7 também foi avaliada. Na Figura 31, nota-se que a proteína é fortemente expressa em condições de carência de Pi, conforme esperado. No transformante contendo pBS6 há maior expressão de PstS em relação a pMA7. Todavia, a quantidade de PstS é menor na cepa selvagem MG1655, sugerindo que apesar de *pstS* ter sido clonado em uma vetor de poucas cópias

(~5 cópias/célula), a expressão da proteína ainda é significativamente maior do que na cepa selvagem.

4.3.4 Papel da Sequência REP a 3' de *pstS* na Repressão de PHO

Com o objetivo de testar o papel fisiológico de REP sobre a expressão de PstS, foram efetuados ensaios de complementação de FA com os vetores pBS16 e pMA6. Mutantes defectivos na produção de PstS, e portanto constitutivos para FA, foram transformados com cada um dos vetores e a atividade de FA foi monitorada (Tabela 6).

Tabela 6 - Capacidade de complementação de *pstS* ± REP em mutantes *pstS* constitutivos. Atividade de FA de mutantes e transformantes contendo pBS16 ou pMA6.

Cepas	Atividade de FA		
	mutantes (<i>pstS</i>)	transformantes pBS16 (<i>pstS</i> +REP)	transformantes pMA6 (<i>pstS</i>)
BS10	2,38	0,02	0,06
JV31	2,04	0,03	0,03

Ambas as construções foram capazes de complementar totalmente a constitutividade dos mutantes *pstS*, pois reduziram o nível de FA a valores basais. Este fato causou certa surpresa, pois as hibridações northern mostraram que o nível de mRNA de pBS16 (*pstS*+REP) é superior ao de pMA6 (*pstS*-REP). Em compensação, o nível de proteínas produzido pelos dois vetores demonstrou-se superior a da cepa selvagem (Figura 28).

O vetor pKK232-8, no qual *pstS* foi clonado, possui de 15 a 20 cópias por célula, portanto, pMA6 estaria complementado a mutação *in trans* devido a uma super-expressão de *pstS*.

As construções pBS6 e pMA7 também foram utilizadas em ensaios preliminares de complementação da FA de mutantes *pst*. Ambos os vetores foram inseridos em BS7 ($\Delta pstSCABphoU$) e a FA foi testada através de ensaios qualitativos. Em ambos os transformantes, a constitutividade da FA foi abolida (dados não apresentados), indicando que a presença de REP não foi necessária para repressão dos genes de PHO.

O número de cópias adicionais que um vetor proporciona em relação à cópia única do cromossomo é um fator que pode aumentar artificialmente a concentração de proteínas PstS expressas na célula. Para contornar este problema e verificar o papel de REP na repressão de PHO, *pstS* e *pstSREP* foram clonados no vetor cópia única pEU720 [FROEHLICH e SCOTT, 1991] e transformados em um mutante *pstS*.

Figura 32 - Complementação *in trans* da mutação *pstS*. A atividade de FA foi monitorada em transformantes contendo *pstS* ou *pstSREP* clonados em vetor de cópia única pEU70. Os dados referem-se à média e ao desvio padrão de 3 experimentos independentes.

Ensaio de FA foram realizados com o intuito de monitorar o grau de complementação *in trans* conferido pelos vetores contendo *pstS* ou *pstS* mais a sequência REP.

A complementação foi total em ambos os transformantes (Figura 32), tanto o vetor contendo somente o gene quanto o vetor contendo o gene e a sequência REP foram capazes de reduzir a atividade de FA a níveis basais idênticos aos da cepa selvagem MG1655, demonstrando que a sequência REP localizada a 3' de *pstS*, apesar de aumentar o nível de PstS, não deve estar envolvida na repressão dos genes de PHO.

DISCUSSÃO

5 Discussão

O operon *pst* tem duas funções importantes na fisiologia de *E.coli*: a primeira diz respeito à produção de proteínas transportadoras de Pi pertencentes ao sistema Pst e a segunda está relacionada à repressão dos genes de PHO em condições de excesso de Pi no meio extracelular.

O transporte de Pi através do sistema Pst já foi bem caracterizado, mas o mecanismo de regulação pelo qual *pst* reprime PHO ainda permanece obscuro. Sabe-se, entretanto, que todos os genes de *pst*, inclusive *phoU*, devem estar intactos para que os genes do regulon não sejam ativados em condições de abundância de Pi.

Os experimentos realizados neste trabalho elucidam o padrão de transcrição do operon *pst* e investigam a função regulatória de seqüências não codificantes localizadas entre os genes do operon. Apesar de não responder diretamente a questão da repressão de PHO, os resultados apresentados elevam nosso entendimento sobre a expressão de *pst* e fornecem subsídios para uma futura compreensão dos mecanismos de regulação de PHO via Pst.

5.1. O transcrito primário de *pst*.

Os primeiros experimentos realizados para analisar o padrão de transcrição de *pst* foram as hibridizações northern com a cepa selvagem MG1655. Nestes ensaios, a utilização de sondas correspondentes a cada um dos genes do operon detectou pequenos transcritos cujos tamanhos variavam de 0,9 Kb a 2,6 Kb. Nenhum sinal correspondente a um mRNA com o tamanho de todo operon foi detectado.

Estes dados indicavam que *pst* poderia não constituir um verdadeiro operon e que, portanto, alguns genes distais poderiam ser transcritos a partir de promotores próprios. A presença de pelo menos uma seqüência promotora localizada a 5' de *pstB* foi sugerida [AMEMURA et al, 1985]. Para verificar quais genes poderiam ser transcritos em uma mesma molécula de mRNA foram realizados ensaios de RT-PCR. As análises preliminares demonstraram

que alguns genes proximais poderiam ser transcrito junto a genes distais. Estes dados sugeriam a existência de um transcrito primário, mas esta molécula não pôde ser detectada através de RT-PCR convencional.

A adaptação de um novo protocolo a partir da técnica de EXACT RT-PCR [SMITH et al, 2001] foi fundamental para a detecção do transcrito primário de *pst*. Neste procedimento eliminou-se a necessidade de tratamento com DNase I preservando a integridade do RNA antes da reação. Somente com esta adaptação comprovou-se a existência do transcrito primário de *pst*.

A dificuldade na detecção do transcrito primário através de análises de hibridização northern e RT-PCR convencional levou à conclusão de que esta molécula é extremamente instável, sendo clivada logo após sua síntese. Esta clivagem interna do mRNA policistrônico produziria os vários transcritos detectados nas análises de hibridização northern.

O operon *pst* de outros organismos também é processado pós-transcricionalmente. Em *Bacillus subtilis*, o transcrito primário de *pst* foi detectado em hibridizações northern [ALLENBY et al, 2004].

A meia vida do transcrito primário de *pst* em *B.subtilis* é de menos de 1 minuto, mas o simples fato de ter sido detectado em análises de hibridização northern leva a crer que este transcrito é mais estável do que *pst* de *E.coli*. É interessante especular o motivo pelo qual o *pst* de *B. subtilis* seria mais estável do que *pst* de *E. coli*. Talvez haja uma relação entre a concentração de Pi no ambiente habitado por cada uma destas espécies bacterianas e a estabilidade do transcrito de *pst*. *B.subtilis* é uma bactéria que habita o solo, ambiente em que a escassez de Pi é comum; desta maneira a maior estabilidade do transcrito de *pst* seria uma adaptação para aumentar o nível de captação de Pi do meio ambiente. Outra diferença entre *E.coli* e *B.subtilis* é o fato de que *B.subtilis* é uma bactéria gram-positiva e de maior tamanho do que *E.coli* e necessita de maior quantidade de Pi para a formação da membrana citoplasmática e da parede celular, que contém ácido teicóico.

Há, ainda, diferenças importantes de ordem molecular que podem afetar na estabilidade do transcrito primário de *pst* destas bactérias: o operon *pst* de *B.subtilis* não carrega o gene *phoU*, presente em *E.coli*; e também não possui função regulatória sobre PHO [QI et al 1997]. Portanto, a menor estabilidade do

transcrito de *pst* de *E. coli* pode decorrer do papel regulatório de suas proteínas.

Embora o produto do gene *phoU* esteja anotado como regulador negativo de PHO, esta não deve ser sua única função. STEED e WANNER, 1993 propuseram que PhoU pode estar envolvido na conversão de Pi em ATP, quando este entra na célula via Pst. Outro grupo, baseado na similaridade de estrutura da proteína, propôs que PhoU pode atuar como proteína desfosforiladora de PhoB em condições de excesso de Pi [OGANESYAN et al, 2005].

As especulações sobre a função de PhoU não o colocam como único responsável pela repressão de PHO, pois as demais proteínas de Pst também participam deste processo [WANNER, 1996]. Portanto, a função repressora de Pst pode ser um fator importante na determinação da estabilidade de seu transcrito primário em *E.coli*; sua rápida degradação poderia ajudar a evitar a repressão dos genes de PHO durante a fase de carência de Pi, quando estes devem ser ativamente expressos.

A degradação do transcrito primário de *pst* resulta em transcritos menores correspondendo a espécies de mRNA contendo os genes *pstSCA*, *pstABphoU*, *pstCA* e *pstBphoU*, e aos genes *pstS*, *pstB* e *phoU* isolados. Acreditamos que as clivagens internas ao longo do transcrito de *pst* efetuadas por endorribonucleases podem ser consideradas tanto estágios iniciais na degradação do transcrito primário como eventos de processamento de mRNA.

Há diferenças no conceito de processamento e degradação de RNA. Sabe-se que uma molécula de RNA é processada quando por intermédio de ribonucleases ela torna-se fisiologicamente ativa; o processamento é fundamental para que a molécula desempenhe seu papel na célula, este processo ocorre principalmente em moléculas de RNA que participam da estrutura de ribossomos e tRNA; os transcritos de eucariotos que precisam sofrer “*splicing*” para se tornar ativos também passam por este processo. Em contrapartida, a degradação envolve a destruição da cadeia de RNA para que os nucleotídeos sejam reciclados ou para desativar moléculas de mRNA, rRNA ou tRNA [KUSHNER, 2004; KNNELL, 2002].

Em procaritos, a transcrição e a tradução ocorrem de maneira quase simultânea; a clivagem interna de um mRNA policistrônico resulta num evento

de processamento em que a principal função não é tornar a molécula funcional, mas estabelecer diferentes concentrações de proteínas traduzidas [RAUHUT e KLUG, 1999].

Neste contexto, a clivagem do transcrito primário de *pst* pode ser considerada tanto um evento de processamento pós-transcricional para produzir diferentes níveis de proteínas como um processo de degradação para desativar uma molécula de mRNA com papel regulatório.

Embora os conceitos de processamento e degradação possam divergir, as RNases podem atuar em ambos os processos, não existindo enzimas específicas para cada caso. Qualquer molécula de RNA poderá ser considerada um alvo em potencial para a ação de ribonucleases; o que diferencia a estabilidade de uma molécula de RNA é a acessibilidade que uma RNase tem a ela [DEUTSCHER, 2006]. De acordo com este argumento, algumas moléculas de RNA seriam mais estáveis porque estão protegidas pela formação de estruturas secundárias ou terciárias, pelo bloqueio ao acesso de sua extremidade 3' ou pela ligação aos ribossomos durante a tradução do transcrito.

A principal endorribonuclease envolvida no processo de degradação do transcrito primário de *pst* é a RNase E, que é também um dos principais componentes estruturais do degradossomo. Nos ensaios de hibridização northern com um mutante termossensível para esta enzima, o transcrito primário com ~4,7 Kb pôde ser claramente observado (Figura 12).

Embora o sítio exato de clivagem da enzima na sequência de *pst* não tenha sido definido, considerando o padrão de bandas encontradas nas hibridizações northern, as seqüências adjacentes a estruturas secundárias formadas ao longo de *pst* poderiam ser candidatas para sítios de clivagem da RNase E, pois a RNase E pode clivar em seqüências adjacentes a estruturas secundárias [EHRETSMANN et al, 1992].

Estes possíveis sítios de clivagem estariam localizados na região interna a *pstA*, na região intergênica *pstA-B* e na região intergênica *pstS-C*. Se o mRNA de *pst* for clivado pela RNase E nestes locais, os fragmentos gerados seriam correspondentes aos transcritos *pstSCA*, *pstCA*, *pstBphoU* e as duas formas de *pstS* visualizadas na hibridização northern (Figura 9).

A estrutura secundária formada a 3' do gene *pstS* tem similaridade com seqüências REP, cuja principal função é estabilizar a mensagem da molécula de mRNA localizada a 5' da haste-laço formada. Desta maneira, se a clivagem pela RNase E for a 3' de REP, a estabilidade do transcrito de *pstS* seria aumentada. Outro detalhe interessante é que na hibridização com o mutante RNase E, além da banda correspondendo ao transcrito primário com 4,7 Kb, bandas similares as obtidas com a cepa selvagem também puderam ser visualizadas (Figura 12). Isto sugere que a RNase E não tenha sido completamente inativada ou que outras ribonucleases estariam envolvidas na degradação do transcrito primário de *pst*.

O papel da RNase III e de MazF foi investigado devido as características destas enzimas na degradação de espécies de mRNA, contudo, nenhuma evidência de que estas ribonucleases estejam envolvidas na degradação do transcrito primário de *pst* foi encontrada.

5.2. Seqüências internas de *pst*

Seqüências internas não codificantes localizadas ao longo do operon *pst* demonstraram possuir atividade promotora. Várias metodologias foram utilizadas para testar a força promotora destas seqüências.

As fusões das regiões promotoras internas com o gene repórter *cat* demonstraram que a atividade de *PphoU* é a maior dentre os promotores testados (Figura 15), a atividade deste promotor mostrou ser levemente mais alta em células carentes de Pi, *PpstB* também pareceu ser mais ativo durante a carência de Pi, enquanto *PpstC* mostrou atividade semelhante em excesso e concentração limitante de Pi.

Nas reações de extensão de oligonucleotídeo para a localização do início de transcrição por *PpstC*, *PpstB* e *PphoU* apenas as amostras de RNA extraídas de culturas carentes de Pi apresentaram produto, mas nestas regiões não foram encontradas PHO-boxes (Figuras 20, 21 e 22). Embora estes ensaios tenham sido repetidos inúmeras vezes, é possível que o produto de extensão dos oligonucleotídeos não tenha sido detectado em amostras

extraídas de bactérias cultivadas em excesso de Pi por uma questão técnica ou devido a uma maior estabilização da mensagem em bactérias carentes de Pi.

Em todas as seqüências promotoras propostas a similaridade com as seqüências – 10 e – 35 é baixa, o que proporciona uma menor afinidade com o fator σ^{70} . Este fato explica a atividade discreta apresentada por estas seqüências (Tabela 4). Também é possível que estas seqüências sejam reconhecidas por σ^S , pois este fator mostra-se mais tolerante a variações na seqüência consenso [TYPAS et al, 2007], além de ser ativamente expresso em situações de estresse, como no caso da carência de Pi. Realmente, dentre todos os genes de PHO, o operon *pst* é único cuja transcrição não é negativamente afetada pela presença de σ^S (TASCHNER et al, 2004).

Embora as seqüências promotoras tenham uma atividade fraca, elas foram capazes de promover a complementação parcial de mutações *pst* (Figura 19), reduzindo em média 50% do nível de FA. Além do mais, os ensaios realizados com pBS10 (*ppstSCAB-phoU*⁺) demonstraram que *PpstC* transcreve além de *pstC*, os demais genes do operon e que, portanto, os genes *pstB* e *phoU* poderiam acumular transcritos de seus próprios promotores e de outros localizados acima.

A importância dos promotores internos do operon *pst* para o nível de transcrição geral de *pst* não é clara, uma vez que suas atividades são bastante fracas. Existe a possibilidade de que estas seqüências seriam importantes para a transcrição de alguma molécula regulatória. Schurdell et al (2007) sugeriram que a região intergênica entre *pstA* e *pstB* contém uma seqüência regulatória cujo transcrito liga-se ao mRNA de *rpoS* expondo o sitio de ligação ribossomal e, conseqüentemente, aumentando consideravelmente seu nível de tradução. Isto explica porque um mutante *pstS* constitutivo produz σ^S mesmo na fase exponencial de crescimento (PETERSON et al 2004). A expressão de σ^S durante a carência de Pi seria, portanto, aumentada pela expressão de um pequeno RNA regulatório localizado entre *pstA* e *pstB* e produzido através do processamento do transcrito primário de *pst* ou a partir de um promotor interno.

Através da análise de nucleotídeos, Amemura et al (1985) propuseram uma seqüência promotora para a região intergênica de *pstAB*, embora este promotor tenha similaridade com as seqüências reconhecidas pelo fator σ^{70} , a

região coincide com a seqüência regulatória proposta por Schurdell et al (2007), descartando a possibilidade deste promotor ser responsável pela transcrição desta seqüência. Todavia, nos ensaios de extensão de oligonucleotídeo realizados neste trabalho, foram encontradas seqüências promotoras localizadas a uma distância de 66 nucleotídeos acima do início da região regulatória de *rpoS*. Este promotor interno poderia ser responsável pela expressão do RNA regulatório e explicaria o porquê de sua atividade ser mais intensa durante a carência de Pi (Figura 15), pois nestas condições o nível de σ^S aumenta consideravelmente.

Promotores internos não são raros. Em *Deinococcus radiodurans* o gene *pprI*, responsável pela produção de uma proteína que estimula a produção de RecA e PprA durante a exposição a radiação γ , forma um operon junto aos genes *folP*, *folB* e *folK*. Gao et al (2006) perceberam que uma mutação no gene *pprI* não afetava o metabolismo de folato e através de uma série de experimentos descobriram uma seqüência promotora na região codificadora de *pprI* que era expressa constitutivamente e era capaz de transcrever os demais genes do operon.

O transposon conjugativo responsável pela produção, regulação e conferência de imunidade ao agente bactericida nisina é um exemplo de que promotores internos são importantes: este transposon contém 3 operons *nisABTCIP*, *nisRK* e *nisFEG*; a produção da toxina e imunidade é codificada pelos genes do primeiro operon, cujo promotor é induzido pela presença de nisina no meio extracelular, contudo, a máxima imunidade ocorre quando NisI está presente na célula. Li e O'Sullivan (2006) detectaram a presença de um promotor fraco a 3' da região codificadora de *nisC* capaz de transcrever *nisI* antes que os demais genes do operon sejam expressos. Desta maneira a existência de um promotor interno explica como a célula protege a si mesma da ação da toxina, conferindo uma adaptação evolutiva que aumenta a eficácia da transferência horizontal do transposon.

LeBlanc et al (1999) também relataram a presença de um promotor interno no operon *pucBACDE* de *Rhodobacter capsulatus*. Este operon codifica proteínas que participam de um complexo necessário à fotossíntese e tem um padrão de transcrição com algumas semelhanças a do operon *pst* de *E. coli*: a 3' de *pucA* existe uma seqüência intergênica capaz de formar uma alça que

além de atenuar a transcrição dos demais genes, proporciona maior concentração de transcritos *pucBA*; o transcrito primário do operon também é processado pela RNase E e existe uma sequência promotora a 5' de *pucE* na região codificadora de *pucD*.

Em resumo, os ensaios aqui apresentados demonstraram a existência de atividade promotora nas regiões a 5' de *pstC*, *pstB* e *phoU*. A região promotora localizada a 5' de *pstB* pode ser importante tanto para transcrever *pstB* como a sequência do RNA regulatório responsável pelo aumento da expressão de *rpoS*. Embora a função biológica dos outros promotores internos de *pst* não tenha sido estabelecida, é importante salientar que apesar destas sequências apresentarem uma atividade baixa, elas são capazes de transcrever os genes distais de *pst*.

5.3. Sequência REP a 3' de *pstS*

O transcrito primário de *pst* tem o potencial de formar duas estruturas haste-laço do tipo REP, elas estão localizadas na região intergênica entre *pstS* e *pstC* e na região intergênica entre *pstA* e *pstB*. Neste trabalho, somente a sequência REP de *pstS* foi analisada. A confirmação de uma estrutura REP ativa ou de um terminador a 3' de *pstS* explicaria os resultados dos ensaios de hibridização northern (Figura 9) que mostraram que o transcrito de *pstS* é mais abundante que os demais transcritos do operon. É interessante notar, que os únicos trabalhos que mencionam esta estrutura, postularam que esta sequência seria um terminador transcricional independente de Rho (MAGOTA et al, 1984; AMEMURA et al, 1985).

Nos ensaios para detecção da atividade do gene repórter, verificou-se que a estrutura REP abaixo de *pstS* possui uma atividade terminadora modesta. Na literatura há evidências de que sequências REP podem atuar como atenuadores transcricionais [ESPELI et al, 2001]. Contudo, a principal função desta estrutura não é terminar ou reduzir a transcrição de genes distais, mas estabilizar a mensagem do gene localizado imediatamente acima.

A hipótese de que a estrutura secundária REP é capaz de estabilizar mRNA não é nova. Plamann e Stauffer (1990) demonstraram que a deleção de

seqüências REP no gene *glyA* pode diminuir a meia-vida de seu transcrito em mais de 6 vezes e Merino et al, 1987 mostraram que a deleção de uma das duas seqüências REP existentes no transcrito de *gdhA* diminuiu sua meia-vida em 50%.

A estabilidade conferida pelas seqüências REP provém de sua estrutura em forma de haste-laço, estas estruturas tornam-se barreiras que bloqueiam a ação de exonucleases, estabilizando a mensagem localizada a 5'.

Evidências obtidas pelos ensaios de hibridização northern mostraram que o mRNA de *pstS* seria mais abundante que os demais transcritos do operon (Figura 9), pois uma sonda contendo toda seqüência dos genes de *pst* revelou um padrão de bandas idêntico ao obtido com a sonda *pstS*.

Aqui nós mostramos que a maior quantidade de transcritos de *pstS* é resultado de sua estabilização pela seqüência REP. Nos ensaios para determinação da meia-vida do mRNA de *pstS* transcrito com e sem REP, todos os vetores nos quais o gene *pstS* foi clonado sem REP (pBS11, pMA6 e pMA7) produziram um transcrito de meia-vida inferior ao transcrito contendo REP (Figuras 24, 26 e 30).

Nas hibridizações northern ilustradas na Figura 9, o sinal detectado para *pstS* apresenta duas espécies de mRNA com 0,95 Kb e 1,2 Kb. Por outro lado, os sinais detectados para o mRNA de *pstS* exibido nas Figuras 24, 26, 27 e 30 demonstram uma molécula com 1,0 Kb. Estas diferenças foram provavelmente originadas por diferenças no padrão de resolução do RNA durante a eletroforese, uma vez que a pequena diferença de tamanho entre as duas bandas poderia tê-las deixadas muito próximas no gel e a exposição prolongada dos autorradiogramas teria confundido os dois sinais.

Outra questão que deve ser discutida refere-se às diferenças nos níveis do transcrito de *pstS* nos ensaios de hibridização northern de culturas tratadas com rifampicina (Figuras 24, 26 e 30). No minuto zero teoricamente não deveria existir diferença no “pool” de mensagens de *pstS* e *pstS*+REP, uma vez que a rifampicina não havia sido adicionada à cultura. Entretanto, nos transformantes pBS11 e pMA6, a instabilidade do transcrito sem a seqüência REP apresentou-se tão forte que a banda radioativa produzida pela hibridização mesmo antes da adição de rifampicina já mostrava sinais de degradação do mRNA.

Figura 33. Esquema de deleção da sequência REP em pMA7. A – Estrutura haste-laço formada pela transcrição de REP da região intergênica *pstSC*, as bases em vermelho indicam a sequência deletada em pMA7. B – Sequência de REP remanescente em pMA7 e sua potencial estruturação em forma de laço.

O transformante contendo pMA7 não seguiu este padrão, mas neste vetor todo o operon *pst* foi clonado, deletando-se apenas a sequência REP a 3' de *pstS*. Na seção 4.3.3. dos Resultados especulou-se com a possibilidade de que outras seqüências localizadas a longo do operon estariam contribuindo para a estabilização do transcrito de *pstS* originado a partir deste vetor. Uma explicação alternativa estaria baseada na forma em que a sequência REP foi deletada em pMA7. Foram eliminados 21 bp na porção 5' da sequência REP (5'- CCA GGC CGG GTA CGG TGT TTT ACG CCG CAT CCG GCA TTA). A sequência remanescente de REP (5'- CCG CCG CAT CCG GCA TTA) poderia estar formando uma pequena estrutura secundária que, mesmo não possuindo o mesmo grau de estabilização, atenuaria a degradação do transcrito de *pstS*, conforme esquematizado na Figura 33. A formação desta pequena estrutura secundária poderia ser responsável pela estabilização do mRNA de *pstS* no minuto 0' da cepa transformada com pMA7.

Todos os ensaios confirmaram a importância de REP na estabilização da mensagem de *pstS*, o transcrito contendo REP também foi capaz de produzir proteínas em níveis superiores a do gene sem a estrutura secundária. As Figuras 28 e 32 mostram que os plasmídios pBS16 e pBS6 produzem mais PstS em comparação aos plasmídios pMA6 e pMA7, que não possuem REP.

A maior expressão de *pstS* em relação aos demais genes de *pst* condiz com sua função no sistema de transporte Pst, já que PstS é uma proteína captadora de Pi presente no periplasma. Em sistemas de transporte do tipo ABC de organismos gram-negativos, como é o caso de Pst de *E.coli*, a proteína que capta o substrato é necessária em concentrações molares maiores do que os demais componentes do transportador [DAVIDSON e CHEN, 2004]. Isto ocorre porque as proteínas que formam o canal (PstA e PstC) e a ATPase que interage com estas proteínas (PstB) devem existir na célula em concentrações semelhantes, pois além de interagirem fisicamente entre si, elas ocupam um espaço físico na membrana citoplasmática que acaba limitando sua concentração molar.

Em contrapartida, a proteína captadora de Pi (PstS), localizada no periplasma pode existir em uma concentração superior às demais, pois além de não estar limitada à membrana, várias proteínas captadoras podem interagir ao mesmo tempo com cada canal, tornando o transporte de Pi mais eficiente.

Apesar de REP conservar a mensagem de *pstS*, a meia vida de seu transcrito não ultrapassa 2 minutos (Tabela 5). A meia-vida média dos mRNAs de *E. coli* MG1655 é de ~ 6 minutos (BERNSTEIN et al, 2002), isto evidencia que, mesmo em condições de carência de Pi, a degradação do transcrito de *pstS* ainda é alta.

Uma hipótese levantada para explicar a meia-vida baixa do mRNA de *pstS* baseia-se no fato de que *pst* tem um papel regulatório sobre PHO em condições de excesso de Pi, conforme discutido acima (Capítulo 5.1 da Discussão). REP estaria indiretamente auxiliando na repressão de PHO contribuindo para um aumento nos níveis de PstS. Para testar esta hipótese foram realizados testes de complementação *in trans* com os plasmídios derivados de pKK232-8 pMA6 (*pstS*) e pBS16 (*pstS*+REP), que complementaram totalmente mutações em *pstS* (Tabela 6). Até mesmo os

plasmídios de cópia única pMA9 (*pstS*) e pMA10 (*pstS*+REP), também foram capazes de efetuar a complementação total da mutação *pstS* (Figura 32).

Baseados nestes dados, conclui-se que a estabilização extra do transcrito de *pstS* conferida pela seqüência REP não é importante para a regulação de PHO.

Recentemente foi aventado que apesar de mutações *pstS* causarem a constitutividade de PHO, este não estaria envolvido na repressão dos genes do regulon [HOFFER e TOMMASSEN, 2001]. De acordo com este trabalho, a estabilização de *pstS* por REP não poderia realmente aumentar a função repressora de *pst*.

Por outro lado, uma maior concentração de PstS certamente aumentaria o nível de captação de Pi, aumentando as chances de adaptação da bactéria a ambientes escassos em Pi. A estabilização do mRNA de *pstS* estaria assim contribuindo para aumentar a concentração molar de PstS no periplasma e consequentemente, incrementar o transporte de Pi via Pst.

CONCLUSÕES

6 Conclusões

- O transcrito primário do operon *pst* de *Escherichia coli* é extremamente instável porque sofre processamento pós-transcricional;
- A RNase E é uma das enzimas responsáveis pelo processamento do transcrito primário de *pst*;
- A sequência REP localizada a 3' de *pstS* tem a função de estabilizar o transcrito do primeiro gene do operon;
- As seqüências não codificantes localizadas a 5' da ORF de *pstC*, *pstB* e *phoU* apresentam atividade promotora fraca capaz de transcrever os genes relacionados além de genes mais distais.

REFERÊNCIAS

Referências

- ALLENBY, N.E.E., O'CONNOR, N., PRÁGAI, Z., CARTER, N.M., MIETHKE, M., ENGELMANN, S., HECKER, M., WIPAT, A., WARD, A.C., HARWOOD, C. Post-transcriptional regulation of the *Bacillus subtilis* *pst* operon encoding a phosphate-specific ABC transporter. **Microbiology**. 150: 2619-2628. 2004.
- AIZENMAN, E., ENGELBERG-KULKA, H., AND GLASER, G. An *Escherichia coli* chromosomal 'addiction module' regulated by guanosine-3'5'-bispyrophosphate: a model for programmed bacterial cell death. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93: 6059-6063. 1996.
- AMEMURA, M., MAKINO, K., SHINAGAWA, H., KOBAYASHI, A., NAKATA, A. Nucleotide sequence of the genes involved in phosphate transport and regulation of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.** 184: 241-250. 1985.
- ARGAST, M., BOOS, W. Co-regulation in *Escherichia coli* of a novel transport system for sn-glycerol-3-phosphate and outer membrane protein I_c (e, E) with alkaline phosphatase and phosphate binding protein. **J. Bacteriol.** 143: 142-150. 1980.
- ARISTARKHOV, A., MIKUSLIKIS, A., BELASCO, J.G., LINN, E.C.C. Translation of the *adhE* transcript to produce ethanol dehydrogenase requires RNase III cleavage in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 178: 4324-4332. 1996.
- ARRIANO, C.M., YANCEY, S.D., KUSHNER, S.R. Stabilization of discrete mRNA breakdown products in *ams pnp rnb* multiple mutants of *Escherichia coli* K – 12. **J. Bacteriol.** 170: 4625-4633. 1988.
- AUSUBEL, F., BERNT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDEMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K. Current protocols in molecular biology. In: Anonymous J. Wiley & Sons. 1987.
- BABITZKE, P., GRANGER, L., OLSZEWSKI, J., KUSHNER, S.R. Analysis of mRNA decay and rRNA processing in *Escherichia coli* multiple mutants carrying a deletion in RNase III. **J. Bacteriol.** 175: 229-239. 1993.
- BACHELLIER, S., GILSON, E., HOFNUNG, M., HILL, C.W. Repeated sequences. In: Neidhardt F.C.; Curtis, R. III; Ingraham, J.L.; Lin, E.C.C.; Low, K.B.; Magasanik, B.; Reznikoff, W.F.; Riley, M.; Schaechter, M.; Umberger, H.E. (Ed). *Escherichia coli* e *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington D.C. pp 2012-2040. 1996.
- BERNSTEIN, J.A., KHODURSKY, A.B., LIN, P.H., LIN-CHAO, S., COHEN, S.N. Global analysis of mRNA decay and abundance in *Escherichia coli* at

- single-gene resolution using two-color fluorescent DNA microarrays. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** Jul 23;99(15):9697-702. 2002.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.** 72: 248. 1976.
- BURNS, D. M., BEACHAM, I.R. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *E.coli ushA* gene, encoding periplasmic UDP-sugar hydrolase (5' nucleotidase): regulation of the *ushA* gene, and the signal sequence of its protein product. **Nucleic Acids Res.** 14: 4325-4342. 1986.
- CAMPBELL, E.A., KORZHEVA, N., MUSTAEV, A., MURAKAMI, K., NAIR, S., GOLDFARB, A., DARST, S.A. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. **Cell** 104: 901-912. 2001.
- CANNISTRARO, V.J., KENNEL, D. The 5' ends of RNA oligonucleotides in *Escherichia coli* and mRNA degradation. **Eur. J. Biochem.** 213: 285-293. 1993.
- CAO, G.J., POGLIANO, J., SARKAR, N. Identification of the coding region for a second poly(A) polymerase in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93: 11580-11585. 1996.
- CAO, G.J., SARKAR, N. Identification of the gene for na *Escherichia coli* poly(A) polymerase. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 89: 10380-10344. 1992.
- CARMANY, D.O., HOLLINGSWORTH, K., MCCLEARY, W.R. Genetic and biochemical studies of phosphatase activity of PhoR. **J. Bacteriol.** 185: 1112-1115. 2003.
- CARPOUSIS, A.J., VAN HOUWE, G., EHRETSMAN, C., KRISCH, H.M. Copurification of *E.coli* RNase E and PNPase evidence for a specific association between two enzymes important in RNA processing and degradation. **Cell.** 76: 889-900. 1994,
- CHAN, F.Y., TORRIANI, A. PstB protein of the phosphate-specific transport system of *Escherichia coli* is an ATPase. **J. Bacteriol.** 178: 3974-3977. 1996.
- CHENG, Z.F., DEUTSCHER, M.P. Purification and characterization of the *Escherichia coli* exoribonuclease RNase R. Comparison with RNase II. **J. Biol. Chem.** 277: 21624-21629. 2002.
- CHENG, Z.F., DEUTSCHER, M.P. An important role for RNase Rim mRNA decay. **Molecular Cell** 17:313-318. 2005.
- CHOMCZYNSKI, P., SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Anal. Biochem.** 162: 156-159. 1987.

- CHURCHWARD, G., BELIN, D. NAGAMINE, Y. A pSC101-derived plasmid which shows no sequence homology to other commonly used cloning vectors. **Gene** 31: 165-171. 1984.
- COLEMAN, J.E. Structure and mechanism of alkaline phosphatase. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 21: 441-483. 1992.
- CONRAD, C., RAUHUT, R. Ribonuclease III: New sense from nuisance. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 34 (2): 116-129. 2002.
- DAVIDSON, A.L., CHEN, J. ATP-binding cassette transporters in bacteria. **Annu. Rev. Biochem.** 73: 241-268. 2004.
- DEUTSCHER, M. P. Degradation of RNA in bacteria: comparison of mRNA and stable RNA. *Nucleic Acids Research* 34 (2): 659-666. 2006.
- DVORAK, H.F., BROCKMAN, R.W., HEPPEL, L.A. Purification and properties of two acid phosphatase fractions isolated from osmotic shock fluid of *Escherichia coli*. **Biochemistry** 6: 1743-1751. 1967.
- ECHOLS, A. GAREN, A., GAREN, S., TORRIANI, A. genetic control of repression of alkaline phosphatase in *E.coli*. **J. Mol. Biol.** 3: 425-438. 1961.
- EHRETSMANN, C.P., CARPOUSIS, A.J., KRISCH, H.M. Specificity of *Escherichia coli* endoribonuclease RNase E: *in vivo* and *in vitro* analysis of mutants in a bacteriophage T4 mRNA processing site. **Genes Dev.** 6: 149-159. 1992.
- ESPELI, O., MOULIN, L., BOCCARD, F. Transcription attenuation associated with bacterial repetitive extragenic BIME elements. **J.Mol.Biol.** 314(3): 375-386. 2001.
- FROEHLICH, B.J., SCOTT, J.R. A single-copy promoter-cloning vector for use in *Escherichia coli*. **Gene** 108: 99-101. 1991.
- GAO, G., LE, D., HUANG, L., LU, H., NARUMI, I., HUA, Y. Internal promoter characterization and expression of the *Deinococcus radiodurans* *pprl-folP* gene cluster. **FEMS Microbiol. Lett.** 257: 195-201. 2006.
- HANAHAHAN, D. Techniques for transformation of *E. Coli*. In: Glover, D. M. (ed) DNA cloning techniques: a practical approach, vol. 1. IRL Press. Oxford, 1985. pp 109-135.
- HARRIS, R.M., WEBB, D.C., HOWITT, S.M., COX, G.B. Characterization of PitA and PitB from *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 183: 5008-5014. 2001.

- HIRATSU, K.; NAKATA, A.; SHINAGAWA, H.; MAKINO, K. Autophosphorylation and activation of transcriptional activator PhoB of *Escherichia coli* by acetyl phosphate *in vitro*. **Gene** 161: 7-10. 1995
- HOFFER, S.M., SCHOONDERMARK, P., VAN VEEN, H.W., TOMMASSEN, J. Activation by gene amplification of *pitB*, encoding a third phosphate transporter of *Escherichia coli* K-12. **J. Bacteriol.** 183: 4659-4663. 2001.
- HOFFER, S.M., TOMMASSEN J. The phosphate-binding-protein of *Escherichia coli* is not essential for Pi-regulated expression of the *pho* regulon. **J. Bacteriol.** 183: 5768-5771. 2001.
- JAIN, C., BELASCO, J.G. RNase E autoregulates its synthesis by controlling the degradation rate of its own mRNA in *Escherichia coli*: unusual sensitivity of the *rne* transcript to RNase E activity. **Genes Dev.** 9: 84-96. 1995.
- KIM, E.E., WYCKOFF, H.W. Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis. **J. Mol. Biol.** 218: 449-464. 1991.
- KIM, S.K., KIMURA, S., SHINAGAWA, H., NAKATA, A., LEE, K.S., WANNER, B.L., MAKINO, K. Dual transcriptional regulation of the *Escherichia coli* phosphate-starvation-inducible *psiE* gene of the phosphate regulon by PhoB and the Cyclic AMP (cAMP)-cAMP receptor protein complex. **J. Bacteriol.** 182: 5596-5599. 2000.
- KIMURA, S., MAKINO, K., SHINAGAWA, H., AMEMURA, M., NAKATA, A. Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: Characterization of the promoter of the *pstS* gene. **Mol. Gen. Genet.** 215: 374-380. 1989.
- KORNBERG, A. Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. **J. Bacteriol.** 177: 491-496. 1995.
- KULKA, H.E., HAZAN, R., AMITAI, S. *mazEF*: a chromosomal toxin-antitoxin module that triggers programmed cell death in bacteria. **J. Cell Sci** 118: 4327-4332. 2005.
- KUSHNER, S.R. mRNA decay in *Escherichia coli* comes of age. **J. Bacteriol.** 184: 4658-4665 . 2002.
- KUSHNER, S.R. mRNA decay in prokaryotes and eukaryotes: different approaches to a similar problem. **IUBMB Life** 56 (10): 585-594. 2004.
- LEBLANC, H., LANG, A.S., BEATTY, J.T. Transcript cleavage, attenuation, and an internal promoter in the *Rhodobacter capsulatus* puc operon. **J. Bacteriol.** 181 (16): 4955-4960.1999.

- LEVINTHAL, C., SINGER, E.R., FETHEROL, K. Reactivation and hybridization of reduced alkaline phosphatase. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA.** 48: 1230-1237. 1962.
- LI, H., O'SULLIVAN, D.J. Identification of a *nisI* promoter within the *nisABCTIP* operon that may enable establishment of nisin immunity prior to induction of the operon via signal transduction. **J. Bacteriol.** 188 (24): 8496-8503. 2006.
- LIU, J. BEACHAM, I.R. Transcription and regulation of the *cpdB* gene in *Escherichia coli* K12 and *Salmonella typhimurium* LT2: evidence for modulation of constitutive promoters by cyclic AMP-CRP complex. **Mol. Gen. Genet.** 222: 161-165. 1990.
- LUECKE, H., QUIOCHO, F.A. High specificity of a phosphate transport protein determined by hydrogen bonds. **Nature** 347: 402-406. 1990.
- LUGTENBERG, B., VAN ALPHEN, L. Molecular architecture and functioning of the outer membrane of *Escherichia coli* and other Gram-negative bacteria. **Biochim. Biophys. Acta.** 737: 51-115. 1983.
- MACKIE, G.A., GENEREAUX, J.L. The role of RNA structure in determining RNase E-dependent cleavage sites in the mRNA for ribosomal protein S20 *in vitro*. **J. Mol. Biol.** 234: 998-1012. 1993.
- MACKIE, G.A. Ribonuclease E is a 5' end-dependent endonuclease. **Nature** 395: 720-723. 1998.
- MAGOTA, K., OTSUJI, N., MIKI, T., HORIUCHI, T., TSUNASAWA, S., KONDO, J., SAKIYAMA, F., AMEMURA, M., MORITA, T., SHINAGAWA, H., NAKATA, A. Nucleotide sequence of the *phoS* gene, the structural gene for the phosphate-binding protein of *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 157 (3): 909-917. 1984.
- MAKINO, K., SHINAGAWA, H., AMEMURA, M., NAKATA, A. Nucleotide sequence of the *phoB* gene, the positive regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli* K12. **J. Mol. Biol.** 190: 37-44. 1986a.
- MAKINO, K., SHINAGAWA, H., AMEMURA, M., NAKATA, A. Nucleotide sequence of the *phoR* gene, a regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli*. **J. Mol. Biol.** 192: 549-556. 1986b.
- MAKINO, K., SHINAGAWA, H., AMEMURA, M., KIMURA, S., NAKATA, A., ISHIHAMA, A. Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*. Activation of *pstS* transcription by PhoB protein *in vitro*. **J. Mol. Biol.** 203: 85-95. 1988.
- 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.** 210: 551-559. 1989.

- MAKINO, K., AMEMURA, M., KIM, S.K., NAKATA, A., SHINAGAWA, H. Role of the σ^{70} subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*. **Genes Dev.** 7: 149-160. 1993.
- MANAGO, M.G. Messenger RNA stability and its role in control of gene expression in bacteria and phages. **Annu.Rev.Genet.** 33: 193-227.1999.
- MARCH, P.E., AHNN, J., INOUE, M. The DNA sequence of the gene (*rnc*) encoding ribonuclease III of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* 13: 4677-4685, 1985.
- MERINO, E., BECERRIL, B., VALLE, F., BOLÍVAR, F. Deletion of a repetitive extragenic palindromic (REP) sequence downstream from the structural gene of *Escherichia coli* glutamate dehydrogenase affects the stability of its mRNA. **Gene** 58: 305-309. 1987.
- METZGER, S. I. B., DROR, E., AIZENMAN, G., SCHREIBER, M., TOONE, J. D., FRIESEN, M., CASHEL, GLASER, G. The nucleotide sequence and characterization of the *relA* gene of *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** 263:15699-15704. 1988.
- MICZAK, A., KABERDIN, V.R., WEI, C.L., LIN-CHAO, S. Proteins associated with RNase E in a multicomponent ribonucleolytic complex. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 93: 3865-3869. 1996.
- MISRA, T.K., APIRION, D. RNase E, na RNA processing enzyme from *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.** 254: 1154-1159. 1979.
- NEWBURY, S.F., SMITH, N.H., ROBINSON, E.C., HILES, I.D., HIGGINS, C.F. Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. **Cell** 48: 297-310. 1987.
- NICHOLSON, A.W. Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. **FEMS Microbiol. Rev.** 23: 371-390. 1999.
- OGANESYAN, V., OGANESYAN, N., ADAMS, P.D., JANCARIK, J., YOKOTA, H.A., KIM, R., KIM, S.H. Crystal structure of the “PhoU-like” phosphate uptake regulator from *Aquifex aeolicus*. **J. Bacteriol.** 187 (12): 4238-4244. 2005.
- OVERBEEKE, N., LUGTENBERG, B. Expression of outer membrane protein of *Escherichia coli* K-12 by phosphate limitation. **FEBS Lett.** 112: 229-232. 1980.
- OW, M.C., LIU, Q., KUSHNER, S.R. Analysis of mRNA decay and rRNA processing in *Escherichia coli* in the absence of RNase E-based degradosome assembly. **Mol. Microbiol.** 38: 854-866. 2000.

- OW, M.C., LIU, Q., MOHANTY, B.K., ANDREW, M.E., MAPLES, V.F., KUSHNER, S.R. RNase E levels in *Escherichia coli* are controlled by a complex regulatory system that involves transcription of the *rne* gene from three promoters. **Mol. Microbiol.** 43: 159-171. 2002.
- PETERSON C.N., RUIZ N., SILHAVY T.J. RpoS proteolysis is regulated by a mechanism that does not require the SprE (RssB) response regulator phosphorylation site. **J. Bacteriol** 186 (21):7403-7410. 2004.
- PLAMANN, M.D., STAUFFER, G.V. *Escherichia coli glyA* mRNA decay: The role of 3' secondary structure and the effects of the *pnp* and *rnb* mutations. **Mol. Gen. Genet.** 220: 301-306. 1990.
- PRADEL, E., MARCK, C., BOQUET, P.L. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *Escherichia coli agp* gene encoding periplasmic acid glucose-1-phosphatase. **J. Bacteriol.** 172: 802-807. 1990
- QI, Y., KOBAYASHI, Y., HULETT, M. The *pst* operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate-regulated promoter and is involved in phosphate transport but not in regulation of the PHO regulon. **J. Bacteriol.** 179 (8): 2534-2539.
- RAO, N.N., TORRIANI, A. Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** 4 (7): 1083-1090. 1990.
- RAUHUT, R., KLUG, G. mRNA degradation in bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** 23: 353-370. 1999.
- ROSEMBERG, H., GERDES, R.G., CHEGWIDDEN, K. Two systems for the uptake of phosphate in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 131 (2): 505-511. 1977.
- ROBERTSON, H.D. *Escherichia coli* ribonuclease III cleavage sites. **Cell** 30: 669-672. 1982.
- RUSSELL, L.M., ROSENBERG, H. The nature of the link between potassium transport and phosphate transport in *Escherichia coli*. **Biochem. J.** 188: 715-723. 1980.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual (3^a ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 2001.
- SCHURDELL, M.S., WOODBURY, G.M., MCCLEARY, W.R. Genetic evidence suggests that the intergenic region between *pstA* and *pstB* plays a role in the regulation of *rpoS* translation during phosphate limitation. **J. Bacteriol.** 189(3):1150-1153. 2007.

- SHAW, W.V. Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. **Methods Enzymol.** 43: 737-755. 1975.
- SHINAGAWA, H., MAKINO, K., NAKATA, A. Regulation of the PHO regulon in *Escherichia coli* K-12. **J. Mol. Biol.** 168: 477-488. 1983.
- SMITH, R.D., OGDEN, C.W., PENNY, M.A. Exclusive amplification of cDNA template (EXACT) RT-PCR to avoid amplifying contaminating genomic pseudogenes. **BioTechniques** 31: 776-782. 2001.
- STEED, P.M., WANNER, B.L. Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. **J. Bacteriol.** 175: 6797-6809. 1993.
- STERN, M.J., AMES, G.F.L., SMITH, N.H., RONBINSON, E.C., HIGGINS, C.F. Repetitive extragenic palindromic sequences: a major component of the bacterial genome. **Cell** 37: 1015-1026. 1984.
- STOCK, J. B., NINFA, A. J. & STOCK, A. M. Protein phosphorylation and regulation of adaptative responses in bacteria. **Microbiol. Rev.** 53(4):450-490. 1989.
- STRUYVÉ, M., VISSER, J., ADRIAANSE, H., BENZ, R., TOMMASSEN, J. Topology of PhoE porin: the eyelet region. **Mol. Microbiol.** 7: 131-140. 1993.
- TASCHNER, N.P., YAGIL, E., SPIRA, B. A differential effect of sigma S on the expression of the PHO regulon genes of *Escherichia coli*. **Microbiology** 150: 2985-2992. 2004.
- TOMMASSEN, J., LUGTENBERG, B. Outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* K-12 is coregulated with alkaline phosphatase. **J. Bacteriol.** 143: 151-157. 1980.
- TORRIANI, A. Alkaline phosphatase from *Escherichia coli*. In: Cantoni G.L. Davis DR (eds). Harper & Row. New York.1966. p 224-235.
- TUNG, W. L., CHOW, K. C. A modified medium for efficient electrotransformation of *E.coli*. **Trends Genet** 11(4):128-129. 1985
- TYPAS, A., BECKER, G., HENGGE, R. The molecular basis of selective promoter activation by the δ^S subunit of RNA polymerase. **Mol. Microbiol.** 63 (5): 1296-1306. 2007.
- VAN VEEN, H.W. Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms. **Antonie van Leeuwenhoek** 72: 299-315. 1997.

- WANG, J., WILKINSON, M.F. Deletion mutagenesis of larg (12-kb) plasmids by one-step PCR protocol. **BioTechniques** 31: 722-724. 2001.
- WANNER, B.L., METCALF, W.W. Molecular genetic studies of a 10.9 kb operon in *Escherichia coli* for phosphonate uptake and biodegradation. **FEMS Microbiol Letters** 100: 133-140. 1992.
- Wanner, B.L. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. In: Neidhardt, F.C., Curtiss, R. III., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Magasanik, B., Reznikoff, W.F., Riley, M., Shaechter, M., Umbarger, H.E. (eds). *Escherichia coli* and *Samonella*: celular and molecular biology. ASM Press, Washington D.C., 1996. pp 1357-1381.
- WEBB, D.C., ROSENBERG H., COX, G.B. Mutational analysis of the *Escherichia coli* phosphatase-specific transport system, a member of the traffic ATPase (or ABC) Family of membrane transporters. **J. Biol. Chem.** 267(34): 24661-24668. 1992.
- WIAME, I., REMY, S., SWENNEN, R., SAGI, L. Irreversible heat inactivation of DNase I without RNA degradation. **BioTechniques** 29: 252-256. 2000.
- WILFINGER, W. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. **BioTechniques**. 22: 474-481. 1997.
- WILLSKY, G.R., MALAMY, M.H. Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** 144: 356-365. 1980.
- ZHANG, Y., ZHANG, J., HOEFLICH, K.P., IKURA, M., QING, G., INOUE, M. MazF cleaves cellular mRNAs specifically at ACA to block protein synthesis in *Escherichia coli*. **Molecular Cell.** 12 (4): 913-923. 2003.
- ZILHAO, R., CAILLET, J., RÉGNIER, P., ARRAIANO, C.M. Precise physical mapping of the *Escherichia coli rnb* gene, encoding ribonuclease II. **Mol. Gen.Genet.** 248: 242-246. 1995 a
- ZILHAO, R., RÉGNIER, P., ARRAIANO, C.M. The role of endonucleases in the expression of ribonuclease II in *Escherichia coli*. **FEMS. Microbiol. Lett.** 130: 237-244. 1995 b.

ANEXOS

RT-PCR of long prokaryotic operon transcripts without DNase treatment

Meire Aguenta, Beny Spira*

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

Received 17 February 2003; received in revised form 22 May 2003; accepted 9 June 2003

Abstract

RT-PCR is a powerful technique used in the amplification and detection of rare mRNAs. However, one of the most serious drawbacks of this method is the amplification of false-positive products due to DNA contamination in the RNA samples. This pitfall is particularly hard to overcome when RNA from prokaryotic origin is used. We present here a modification of the EXACT RT-PCR method that was successfully employed in the amplification of the low abundant full-length polycistronic *pst* operon mRNA of *Escherichia coli*. No DNase treatment of the RNA template is required, but unlike the original EXACT RT-PCR, a hybrid primer that is not composed of oligo(dT) was used. A nonhomologous sequence was incorporated at the reverse transcription step into the 5' end of the first-strand cDNA by means of the hybrid primer. For the PCR, a gene-specific primer and a second primer identical to the nonhomologous portion of the hybrid primer were used. To avoid amplification of genomic DNA, the hybrid-primer molecules that were not incorporated into the first-strand cDNA were removed by RNase H treatment followed by ultrafiltration.

© 2003 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: RT-PCR; Operon; DNase; Bacteria

1. Introduction

Qualitative and quantitative analyses of gene expression are made through several techniques such as Northern blotting, RNase protection assay and RT-PCR. RT-PCR is the most sensitive method to detect small amounts of a specific mRNA. However, there are several variables that might affect the accuracy

and reproducibility of the RT-PCR results (Freeman et al., 1999). Among them, the presence of DNA contaminants in the RNA extract may give rise to false-positive results. Even small amounts of DNA might compete with the single-stranded cDNA, affecting the reliability of the RT-PCR (Mutimer et al., 1998). The use of oligo(dT) and the designing of primers spanning a region containing one or more introns can overcome the interference of DNA by producing different size fragments that distinguish between RNA and DNA amplification products. Prokaryotic organisms, however, do not contain introns and RT-PCR of their RNA cannot benefit from the poly(A⁺)

* Corresponding author. Tel.: +55-11-30917347; fax: +55-11-30917354.

E-mail address: benys@usp.br (B. Spira).

tract on their mRNA. In these organisms, the only efficient method to eliminate genomic or plasmid DNA is by exhaustively treating the RNA template with DNase. However, DNase treatment and the subsequent inactivation of the enzyme may cause RNA loss due to the presence of divalent cations in the buffer and/or due to phenol/chloroform extraction (Wiame et al., 2000). This is particularly troublesome when small amounts of RNA, such as those derived from multi-gene polycistronic operons are analyzed. A new approach to RT-PCR called exclusive amplification of cDNA template (EXACT) RT-PCR (Smith et al., 2001), which avoids the amplification of genomic DNA, incorporates a unique sequence that is not present in genomic DNA to the 5' end of the cDNA during reverse transcription by means of an oligo(dT) anchored primer. This unique sequence is then used as the site for reverse primer annealing in PCR. However, an additional step involving either Southern hybridization or nested PCR with internal primers has to be included to visualize the RT-PCR products (Smith et al., 2001). Furthermore, this technique relies on the use of a modified oligo(dT) primer, which cannot be used in RT-PCR of prokaryotic RNA.

This report describes a variation of the EXACT RT-PCR technique adapted for the amplification of prokaryotic mRNA. As with the original method, a unique sequence is introduced into the 5' end of first-strand cDNA during reverse transcription by means of a hybrid primer. However, unlike EXACT RT-PCR, the gene-specific 3' end of the hybrid primer may anneal to genomic DNA contamination during the PCR step, leading to false-positive results. This could be avoided by completely removing the non-incorpo-

rated hybrid-primer molecules after reverse transcription by treating the RT product with RNaseH followed by ultrafiltration. To assess the feasibility of the technique, we analyzed the transcription pattern of the *pst* operon of *Escherichia coli*, which comprises five genes (*pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB*, *phoU*) at min 84 on the bacterial chromosome and is transcribed counter-clockwise (Fig. 1). This technique may be employed both in the analysis of multi-genes operons and in the amplification of single genes.

2. Materials and methods

2.1. Bacteria strains and growth conditions

Logarithmic cells of *E. coli* MG1655 carrying plasmid pEY37 (a pBR322 derivative cloned with the entire *pst* operon between the *EcoRI* and *AvaI* sites) were grown in medium A—an enriched low-Pi minimal medium (Levinthal et al., 1962), at 37 °C.

2.2. RNA extraction

An aliquot of 40 ml was withdrawn from the cell culture and immediately centrifuged. The pellet was homogenized with 4.0 ml acidic phenol/guanidine thiocyanate (Chomczynski and Sacchi, 1987) and incubated at 60 °C for 5 min. Following the addition of 1.6 ml chloroform, samples were centrifuged and 1 volume of isopropanol was added to the upper phase. The precipitated RNA was centrifuged, washed with 70% ethanol and resuspended in 40 µl formamide.

Fig. 1. Schematic representation of the *pst* operon and the RT-PCR strategy. The rectangles depict the open reading frames of the operon and their lengths in base pairs. The arrows represent the primers used in the RT-PCR analyses and their approximate locations. All forward primers are gene-specific. The reverse primer *phoUc* and one half at the 3' end of the hybrid primer correspond to a reverse sequence of *phoU*. The anchored reverse primer and the other half at the 5' end of the hybrid primer (in black) are not homologous to any *E. coli* sequence.

2.3. DNase treatment

RNA (4 µg) was incubated with 5 U DNase (Promega) for 30 min at 37 °C. The reaction was terminated by the addition of EDTA followed by an incubation at 65 °C for 20 min. Then, the RNA sample was extracted with phenol/chloroform (5:1) pH 5, precipitated and resuspended in the same volume of H₂O.

2.4. RT-PCR

RNA (1.5 µg, previously diluted in H₂O to a final concentration of 1 µg/µl) was incubated together with 2 pmol of reverse primer at 85 °C for 3 min and kept on ice. For the RT reaction, a mixture of 200 U of SUPERScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen Life Technologies), 0.5 mM dNTPs, 0.5 mM dithiothreitol (DTT) and 1 × reverse transcriptase reaction buffer was added to a final volume of 20 µl. The samples were incubated at 42 °C for 90 min. The reaction was arrested by incubating the samples at 75 °C for 10 min. When the modified RT-PCR was performed, the RT product was treated with 2 U of RNase H for 20 min at 37 °C followed by 10 min at 75 °C to inactivate the enzyme. H₂O (490 µl) was added to each tube and the diluted products were applied to a microcon® PCR membrane and centrifuged for 15 min at 1000 × g. The concentrate (usually about 10 µl) was the final RT product. The negative controls were performed by omitting reverse transcriptase from the RT reaction.

One tenth of the final RT product (1 µl) was added to a tube containing 2.5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies), 0.2 mM dNTPs, 30 pmol of each primer, 1.5 mM MgCl₂, 1 × PCR buffer in a final volume of 50 µl. The PCR of *pstS-phoU* and *pstC-phoU* fragments consisted of 40 cycles of denaturation at 94 °C for 60 s, annealing at 54 °C at 60 s and elongation at 72 °C for 180 s. PCR amplification of *pstA-phoU* and *pstB-phoU* fragments were done by 40 cycles of denaturation at 94 °C for 60 s, annealing at 52 °C for 60 s and elongation at 72 °C for 60 s. One tenth of the PCR products (5 µl) were resolved by electrophoresis in 1% agarose gels and stained with ethidium bromide.

3. Results and discussion

Expression of the *pst* operon is derepressed when the cells are starved for inorganic orthophosphate (Pi) (Wanner, 1993). However, under these growth conditions, we could not detect the full-length transcript of the *pst* operon (~ 4.7 kb) by Northern blotting hybridization, suggesting that either the *pst* genes are not co-regulated or that the full-length *pstS-phoU* mRNA is unstable and/or low abundant.

To test if the full-length transcript of *pst* could be detected by a more sensitive method, RNA extracted from Pi-starved *E. coli* cells was treated with DNase and subjected to RT-PCR using the gene-specific reverse primer *phoUc* and the forward primer *pstS* (Table 1; Fig. 1). The expected product of 3208 bp, which represents an mRNA of the entire operon (*pstS-phoU*), was not evident (Fig. 2A, lane 1). However, when the forward primers *pstC*, *pstA* or *pstB* were each used, the relevant shorter RT-PCR products that correspond to the *pstC-phoU* (2250 bp), *pstA-phoU* (1123 bp) and *pstB-phoU* (302 bp) transcripts were formed (Fig. 2A, lanes 3, 5 and 7, respectively). The absence of products in the RT-negative lanes (Fig. 2A, lanes 2, 4, 6 and 8) indicates that the DNase treatment successfully removed all traces of DNA contamination, but it may have also degraded the larger and perhaps less abundant *pstS-phoU* transcript. Shortening the incubation time of DNase treatment or lowering the concentration of the enzyme did not efficiently remove DNA contamination (not shown). Accordingly, it has been previously reported that the DNase step often fails to remove all contaminating DNA from total RNA preparations and

Table 1
List of oligonucleotide primers

Primer	Sequence (5' → 3')
<i>Reverse primers</i>	
<i>phoUc</i>	TCACCTGCGTGCGGATACTTT
Hybrid primer	AGTGGTACACGCAGAGTACTTT- CACCTGCGTGCGGATACTTT
Anchored reverse primer	AGTGGTACACGCAGAGTACTT
<i>Forward primers</i>	
<i>pstS</i>	AGATGCATGGCCTATTACCTC
<i>pstC</i>	GGCGTATCGTTCCTCCGTTC
<i>pstA</i>	TATTGATCATTACCTGTG
<i>pstB</i>	CTACCGGGCGTATTGAAGAGC

Fig. 2. RT-PCR analysis of *pst*. (A) Conventional RT-PCR using DNase-treated RNA as template and gene-specific primers. For the reverse transcription, the reverse primer *phoUc* was used and the PCR amplifications utilized the same reverse primer and the forward primers *pstS* (lanes 1 and 2), *pstC* (lanes 3 and 4), *pstA* (lanes 5 and 6) and *pstB* (lanes 7 and 8). In lanes 2, 4, 6 and 8, reverse transcriptase was omitted from the RT reaction (B) RT-PCR using unmodified RNA (not treated with DNase) as a template and the same set of primers as above. Lanes 2, 4, 6 and 8 represent the negative controls that were not reverse-transcribed. (C) EXACT RT-PCR using unmodified RNA as a template. The hybrid primer was used for the reverse transcription. For the PCR amplification, the anchored reverse primer replaced the hybrid primer and the forward primers and negative controls were as above. M, molecular weight markers.

may also negatively affect the quality of the sample, especially when long and rare transcripts are amplified (Wiame et al., 2000; Folz and Nepluev, 2000). When

the RNA template was not treated with DNase prior to RT-PCR, the expected bands corresponding to *pstS-phoU* and to the other smaller *pst* transcripts *pstC-phoU*, *pstA-phoU* and *pstB-phoU* were observed (Fig. 2B, lanes 1, 3, 5 and 7). However, the RT-negative lanes also exhibited the same bands (Fig. 2B, lanes 2, 4, 6 and 8), indicating the presence of DNA contamination in all samples.

To avoid the need to treat the RNA template with DNase prior to the reverse transcription reaction, a modification of the EXACT RT-PCR technique (Smith et al., 2001), adapted for the amplification of prokaryotic transcripts, was devised. Unlike the original EXACT RT-PCR, the present technique does not use an oligo(dT) primer to reverse transcribe the RNA. Instead, a hybrid oligomer (hybrid primer) of 42 bases whose 21 bases on its 3' end are identical to the reverse primer *phoUc* and the other 21 bases on its 5' end correspond to a unique sequence (nested universal primer A from Clontech Laboratories deleted of its four most proximal bases) that is not identical to any sequence of the *E. coli* genome was used (Fig. 1; Table 1). Unmodified RNA (not treated by DNase) extracted from Pi-starved cells was reverse-transcribed using the hybrid primer. For the PCR reactions that followed, the hybrid primer was replaced by the anchored reverse primer. This primer corresponds to the 5' end of the hybrid primer whose sequence does not resemble any portion of the *E. coli* genome. Ideally, only cDNA would be amplified because the anchored reverse primer would anneal to the 21-base tail incorporated in the 3' end of the cDNA during the reverse transcription step. However, since the RT product carried hybrid-primer leftovers, these annealed to the *phoU* sequence on the DNA contaminants giving rise to false-positive results (not shown). For that reason, it was necessary to completely remove hybrid-primer molecules that were not incorporated into cDNA. Several methods were employed to eliminate the non-incorporated hybrid-primer molecules (see below), but the only efficient one was ultrafiltration preceded by RNase H treatment. RNase H released hybrid-primer molecules that annealed to RNA during the RT step but were not incorporated in the first-strand cDNA as a result of prematurely aborted primer extension (Berger et al., 1983). Once released, the free hybrid-primer molecules were removed by ultrafiltration. Both treatments (RNase H and ultrafil-

tration) proved to be essential, indicating that unlike EXACT RT-PCR of eukaryotic RNA, removal of the hybrid primer is needed to avoid genomic or plasmidial DNA amplification. The difference between the two methods resides in the fact that the hybrid primer used for the amplification of eukaryotic RNA is composed of a nonhomologous sequence on its 5' end and an oligo(dT) on its 3' end. On the other hand, the 3' end of the prokaryotic hybrid primer is homologous to a *phoU* sequence, enabling its annealing to DNA contaminants, leading to the amplification of false-positives. Following the hybrid-primer removal step, the cDNA was amplified in four separate reactions as in Fig. 2A and B, except that in each reaction the anchored primer was used as the reverse primer (Fig. 2). This time, a product of 3229 bp that covers all five genes of the operon was formed (Fig. 2C, lane 1). The shorter RT-PCR products of the expected lengths representing *pstC-phoU* (2271 bp), *pstA-phoU* (1144 bp) and *pstB-phoU* (323 bp) were also obtained (lanes 3, 5 and 7). All RT-negative lanes did not show any product, confirming that the bands observed are true amplifications of cDNA. All amplified *pst* transcripts were promptly observed by direct ethidium bromide staining eliminating the need to perform additional steps such as nested PCR or southern blotting.

Other methods aimed at the removal of the hybrid-primer molecules from the RT product, such as exonuclease I digestion, have been tested (not shown). The *pst* transcript (*pstS-phoU*) could not be detected when exonuclease I was employed, most likely due to nonspecific digestion of the *pst* single-stranded cDNA. Replacement of RNase H by RNase A did not eliminate contamination in the negative-control samples, probably because RNase A failed to release the hybrid primer annealed to the RNA template. Application of non-enzymatic method such as heat denaturation of the RT product to release the hybrid primer from the RNA followed by ultrafiltration was also ineffective in avoiding amplification from DNA contamination.

In conclusion, we showed a modification of the EXACT RT-PCR technique that may be useful in the amplification of bacterial RNA that cannot be detected with other methods. The use of a hybrid primer for the

RT reaction and an anchored primer for the PCR avoids the DNase treatment of the RNA template prior to the synthesis of the first-strand cDNA, preserving the integrity of the RNA. The method is particularly useful in the amplification of low abundant mRNA, such as those mRNA originated from the transcription of polycistronic operons.

Acknowledgements

This research was supported by grants 99/09246-3 and 02/04070-9 from Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). We thank Professor Ezra Yagil for very helpful suggestions and Professor Tetsuo Yamane for critical reading of the manuscript.

References

- Berger, S.L., Wallace, D.M., Puskas, R.S., Eschenfeldt, W.H., 1983. Reverse transcriptase and its associated ribonuclease H: interplay of two enzyme activities controls the yield of single-stranded complementary deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 22, 2365–2372.
- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156–159.
- Folz, R.J., Nepluev, I., 2000. Poly(A) cDNA-specific (PACS) RT-PCR: a quantitative method for the measurement of any poly(A)-containing mRNA not affected by contaminating genomic DNA. *BioTechniques* 29, 762764–762768.
- Freeman, W.M., Walker, S.J., Vrana, K.E., 1999. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *BioTechniques* 26, 112–115.
- Levinthal, C., Fetherol, K., Signer, E.R., 1962. Reactivation and hybridization of reduced alkaline phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 48, 1230–1237.
- Mutimer, H., Deacon, N., Crowe, S., Souza, S., 1998. Pitfalls of processed pseudogenes in RT-PCR. *BioTechniques* 24, 585–588.
- Smith, R.D., Ogden, C.W., Penny, M.A., 2001. Exclusive amplification of cDNA template (EXACT) RT-PCR to avoid amplifying contaminating genomic pseudogenes. *BioTechniques* 31, 776–778, 780, 782.
- Wanner, B.L., 1993. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J. Cell. Biochem.* 51, 47–54.
- Wiame, I., Remy, S., Swennen, R., Sagi, L., 2000. Irreversible heat inactivation of DNase I without RNA degradation. *BioTechniques* 29, 252–254, 256.

M. Agüena · E. Yagil · B. Spira

Transcriptional analysis of the *pst* operon of *Escherichia coli*

Received: 7 May 2002 / Accepted: 19 September 2002 / Published online: 29 October 2002
© Springer-Verlag 2002

Abstract The *pst* operon of *Escherichia coli*, which encodes the phosphate-specific transport system, is composed of five genes, *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB* and *phoU*, whose transcription is induced by phosphate starvation. A phosphate-regulated promoter located upstream of the most proximal gene (*pstS*) controls the transcription of the entire operon. Though the full-length *pst* mRNA could be detected by an improved RT-PCR protocol, Northern analysis using several *pst*-specific probes failed to reveal this transcript. Instead, smaller but distinct *pst* mRNA species were evident. Primer-extension experiments localized the 5' ends of *pst* mRNAs within the operon. The data suggest that the full-length mRNA is rapidly processed post-transcriptionally.

Keywords *pst* operon · PHO-regulon · *Escherichia coli*

Introduction

Pst (Phosphate-specific transport) and Pit (Pi transport) are two systems that actively transport inorganic phosphate (Pi) into *Escherichia coli* cells. Pit is a low-affinity, constitutively expressed transporter formed by a single protein, whereas Pst is a complex system composed of four proteins, PstS, PstC, PstA and PstB, that are

induced when the cells undergo starvation for Pi (Rao and Torriani 1990). The Pst system belongs to the superfamily of ABC (ATP-binding cassette) transporters (Webb et al. 1992; Boos and Lucht 1996). The Pst proteins are encoded by the *pst* operon located at minute 84 on the *E. coli* chromosome. This operon contains five genes that are transcribed counterclockwise in the following order: *pstS*, *pstC*, *pstA*, *pstB* and *phoU* (Fig. 1). PstS is a periplasmic Pi-binding protein, PstC and PstA are integral membrane proteins that mediate the translocation of Pi through the inner membrane (Webb et al. 1992) and PstB is an ATPase that energizes the transport (Chan and Torriani 1996). The function of the *phoU* product is not yet clear; it does not participate in the transport of Pi and is presumably related to the synthesis of ATP (Steed and Wanner 1993). The *pst* operon is a part of the PHO regulon, a set of genes and operons that are regulated by the concentration of Pi in the medium. Besides its role as a transporter of Pi, the Pst system acts as a repressor of the PHO regulon, because most mutations in *pst* lead to constitutive expression of all PHO genes (Wanner 1996). The genes and operons of the PHO regulon are co-regulated by a two-component system composed of the regulatory proteins PhoB and PhoR. The control region of *pst* consists of a –10 promoter sequence and two PHO-boxes (Fig. 1) that are recognized by PhoB. When the concentration of Pi in the medium falls below 4 μ M, the sensor protein PhoR phosphorylates PhoB, and the phosphorylated PhoB binds to the PHO-boxes, interacts with the σ^{70} factor of RNA polymerase and initiates transcription (Makino et al. 1993; Wanner 1993).

Based on the sequence analysis of the *pst* operon a transcription terminator in the form of a stem-loop structure was postulated downstream of *pstS* in the non-coding region between *pstS* and *pstC* (Amemura et al. 1985; Surin et al. 1985). A second stem-loop structure that is followed by a conventional promoter site was proposed to be located in the non-coding region between *pstA* and *pstB* (Amemura et al. 1985) (Fig. 1). However, although the promoter at the beginning of the operon has been well characterized, little is known about the operon's

Communicated by W. Goebel

M. Agüena · B. Spira (✉)
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biomédicas
Universidade de São Paulo,
Av. Prof. Lineu Prestes,
1374 São Paulo-SP CEP 05508-900, Brazil
E-mail: benys@usp.br
Tel.: + 55-11-30917347
Fax: + 55-11-30917354

E. Yagil
Department of Biochemistry,
Tel-Aviv University, Tel-Aviv 69978, Israel

Fig. 1 Schematic representation of the *pst* operon. The open rectangles represent the genes of the operon. The two PHO-boxes and the -10 sequence upstream of *pstS*, as well as the proposed -35 and -10 sites upstream of *pstB*, are indicated. The stem-loop symbols show the positions of proposed RNA secondary structures. The bars at the top show the probes used for Northern analysis (see Fig. 2), the letters refer to the genes they represent. The dotted lines at the bottom depict the sections of the mRNA assumed to react with each of the probes (indicated by the letters) in Northern blots. The thickest dotted lines represent the major transcripts observed in each blot. The open arrows show the forward primers used in the RT-PCR analyses (Fig. 3), the bent arrow denotes the RT primer and the shaded arrow the anchored primer. The black arrows depict the primers used in the primer extension reactions (Fig. 4).

transcription pattern. An earlier study from our laboratory showed that a *pstS* probe, when hybridized with RNA extracted from Pi-starved cells, detected a product of ~1 kb rather than the expected 4.7-kb product that would represent the full-length transcript of the entire *pst* operon (Spira and Yagil 1998). In the present work we show that the *pst* operon is transcribed in its entirety and that the full-length mRNA is cleaved at specific sites, yielding distinct mRNA species. The major transcript of the operon is the product of the most proximal gene, *pstS*.

Materials and methods

Bacterial strains and plasmids

The following strains were used in this study: MG1655 (a wild-type *E. coli* K-12 strain); BS1 (MG1655 *phoB23 proC::Tn10*, from our laboratory collection) and BS7 [MG1655 $\Delta(pstSCAB-phoU)560::KmR$; transduced from strain BW17335 (Steed and Wanner 1993)]. The plasmid pEY37 is a pBR322 derivative carrying the entire *pst* operon inserted between the *EcoRI* and *AvaI* sites.

Growth conditions

Cells grown exponentially on minimal T-salts medium (Echols et al. 1961) supplemented with 0.4% glucose and 1 mM KH_2PO_4 at 37 °C were washed with minimal T-salts, and resuspended to a cell density equivalent to an OD_{540} value of 0.5 in T-salts containing 0.4% glucose and 50 μM KH_2PO_4 . Cells were further grown at 37 °C and aliquots for alkaline phosphatase (AP) assays and RNA extraction were collected after 10 min (non-starved cells) and 60 min (Pi-starved cells).

Alkaline phosphatase assay

The assays for alkaline phosphatase were done as described previously (Spira et al. 1995). *p*-Nitrophenyl-phosphate was used as the substrate. Data are given as specific activity (enzyme units divided by the OD_{540} value).

RNA extraction and Northern analysis

Aliquots (40 ml) of culture were withdrawn and immediately centrifuged. The cell pellet was homogenized with 4.0 ml of acidic phenol/guanidine thiocyanate (Chomczynski and Sacchi 1987) and incubated at 60 °C for 5 min. Following the addition of 1.6 ml of chloroform, samples were centrifuged, and 1 vol of isopropanol was added to the upper phase. The precipitated RNA was centrifuged, washed with 70% ethanol and resuspended in 40 μl of formamide. Aliquots containing equal amounts of RNA were fractionated by electrophoresis in a 1.0% agarose gel containing 7% formaldehyde as described by Sambrook and Russell (2001). RNA was then transferred to a nylon-based membrane (Hybond N+, Amersham-Pharmacia Biotech) and probed with biotinylated DNA fragments as described below. Hybridization and detection of the labeled probes was performed using the North2South Chemiluminescent Nucleic Acid Hybridization and Detection Kit (Pierce) as recommended by the manufacturer. The membranes were then exposed to X-ray films.

Preparation of probes

DNA fragments used as templates for probe synthesis were obtained by PCR amplification using the primers listed in Table 1. Biotinylated probes were obtained by random-primer labeling of the PCR fragments using the North2South Biotin Random Prime Kit (Pierce) as recommended by the manufacturer.

RT-PCR

First-strand cDNA was synthesized by incubating 2 μg of RNA extracted from the Pi-starved MG1655 wild-type strain in the presence of 200 U of SuperScript II reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies) and 2 pmol of primer RT (Fig. 1 and Table 1). Following a 60-min incubation at 42 °C, 1/10 of the RT product (2 μl) was used as a template to amplify the specific *pst* fragments in a conventional PCR [2.5 U Taq polymerase (Invitrogen), 0.2 mM dNTPs, 30 pmol of each primer]. In all reactions the reverse primer was the anchored primer and one of the following oligos was used as the forward primer: *pstS1095*, *pstC2053*, *pstA3180* or *pstB4001* (Fig. 1 and Table 1). The PCR consisted of 40 cycles of denaturation at 94 °C for 60 s, annealing at 50 °C for 60 s and elongation at 72 °C for 180 s, except for the *pstB-phoU* cDNA amplification where the

Table 1 List of oligonucleotide primers used

Primer ^a	Sequence (5'→3')	Designation of PCR product and length of DNA product
Primers used to create probes used in the northern-blots		
pstS(+)	CTTCCCTGCGCCGGTGTATGC	S (608 bp)
pstS(-)	TCAGCGGAGATCAGTTTGGTGT	
pstC(+)	CTGGCGGCGCTGATTGTGCTAT	C (840 bp)
pstC(-)	ATGCGGCGAGGACGATGAAGG	
pstA(+)	CACTGCGGCGCTGGCTGAAT	A (496 bp)
pstA(-)	TCTCGGTGGTGGGATAACAAT	
pstB(+)	CGGCGCTCGACCTATCTCTAC	B (196 bp)
pstB(-)	TTGTTTCTTCGCTGGCTTGGTG	
phoU(+)	CCGCGATGCATAACCAGGACAG	U (283 bp)
phoU(-)	GGTATGACGGCCAGCGACTC	
pst(+)	TCATCTTCGGCTACTTTTCTC	S-U (4925 bp)
pst(-)	AAGTTATTGGGATTGTCTGGT	
Primers used in the RT-PCR reactions		
Reverse primers		
RT primer	AGTGGTACACGAGAGTACTTTC	
	ACCTGCGTGGGATACTTT	
Anchored primer	AGTGGTACACGAGAGTACTT	
Forward primers		
pstS1095	AGATGCATGGCCTATTACCTC	
pstC2053	GGCGTATCGTTCTCCGTTCA	
pstA3180	TATTGATCATTACCCTGTG	
pstB4001	CTACCGGGCGTATTGAAGAGC	
Primers used in the primer extension reactions		
310c	CAGTTGCGACGGTGGTACGC	
1147c	GCAGCGCTTGGTTGACGCCATA	
3443c	CTCGGGGCGAGTTTCAACCAT	
4222c	AAGATTGAGACTGTCCATAACGC	

annealing temperature was 58 °C and the elongation step lasted 60 s. Negative controls in which 0.2-µg aliquots of RNA were used as templates for PCR were performed for each reaction.

Primer-extension analysis

The reactions were performed essentially as described by Sambrook and Russell (2001). RNA from Pi-starved and non-starved MG1655 cells was extracted as described above. Oligonucleotides complementary to the coding sequence of the genes *pstS*, *pstC*, *pstB* and *phoU*, (oligos 310c, 1147c, 3443c and 4222c, respectively; see Fig. 1 and Table 1) were end-labeled with ³²P using the enzyme T4 polynucleotide kinase as described previously (Sambrook and Russell 2001). The labeled oligonucleotides were incubated with 10 µg of total cellular RNA for 90 min at 65 °C. The extension reaction was carried out by incubating 10 µg of RNA together with each labeled oligonucleotide in the presence of Mu-MLV reverse transcriptase for 60 min at 42 °C. At the end of the incubation, the RT product was treated with 2 vols of RNase reaction mix (100 µg/ml salmon sperm DNA; 20 µg/ml RNase A) for 15 min at 37 °C. The cDNA was extracted with one volume of phenol:chloroform:isoamyl alcohol (50:49:1) and precipitated with ethanol. The pellet was resuspended in 5 µl of stop/loading dye (Sequenase sequencing kit; USB) and 2–3 µl were loaded onto an 8% acrylamide/7 M urea gel next to the sequencing products. DNA sequencing was done by the dideoxy chain-termination method with a Sequenase (version II) kit (USB) using the same labeled primers as for the primer-extension reaction. The reaction was conducted according to the manual that accompanies the kit. Plasmid pEY37 served as the template.

Results

Northern analysis of the *pst* operon

Exponentially growing cells of strains MG1655 (wild-type), *phoB23* and Δ *pst* (a strain in which the entire *pst*

operon has been deleted) were resuspended in a minimal medium containing 50 µM Pi. Cells harvested after 10 min (non-starved cells) and 60 min (Pi-starved cells) were assayed for alkaline phosphatase (AP) activity. Table 2 shows that in the wild-type AP activity was derepressed ninefold at the 60-min timepoint, indicating that the cells had reached the beginning of the Pi-starvation phase. As expected, the *phoB* mutant exhibited very low levels of AP activity even under Pi-starvation, and the Δ *pst* mutant expressed high levels of AP activity constitutively. Total RNA extracted from these three strains grown under conditions of Pi excess and Pi starvation was hybridized to labeled DNA probes corresponding to internal sequences of each of the *pst* genes and to a probe that covers the entire operon (see Table 1 and Fig. 1). Hybridization was evident in the sample isolated from the wild-type cells that were starved for Pi (Fig. 2) and was absent in the *phoB* and Δ *pst* RNAs (not shown), indicating that all bands observed were RNA/

Table 2 Assay of alkaline phosphatase

Strain ^a	Genotype	High Pi	Low Pi
MG1655	Wild type	0.07	0.65
BS1	<i>phoB23</i>	0.04	0.02
BS7	Δ <i>pst::Km</i>	5.15	6.03

^aThe indicated strains were assayed for alkaline phosphatase activity 10 min (high Pi) and 60 min (low Pi) after transfer to minimal medium containing an initial concentration of 50 µM Pi. Data are given as specific activities (i.e., enzyme units divided by the OD₅₄₀ of the culture)

Fig. 2A–F Northern analysis of the *pst* operon. The probes used in each case are indicated in parentheses above the lanes (see Fig. 1). The *pstS-phoU* probe used in F covers the entire operon. RNA was isolated from cells grown in the presence of excess Pi (+) or under conditions of Pi starvation (-). The numbers on the left indicate the positions and sizes of RNA molecular weight markers. The arrows on the right indicate the positions of the transcripts

DNA hybrids that were specific for the individual genes of the *pst* operon. No RNA species of the size (~4.7 kb) expected for a full-length transcript of the entire *pst* operon could be detected with any of the probes. The dotted lines in Fig. 1 depict the regions that each hybridization product represents. Hybridization with the *pstS* probe (Fig. 2A) revealed two distinct bands of 0.95 and 1.2 kb. A faint fragment of 2.6 kb became evident when the autoradiogram was exposed for a longer period of time (data not shown). The two smaller bands correspond to two different forms of *pstS* mRNA (whose ORF is 1041 bp long), suggesting either that *pstS* transcription is initiated or terminated at two distinct locations or that a larger *pstS* transcript is cleaved at a specific site shortly after its synthesis. The larger band of 2.6 kb that is much weaker corresponds best to a *pstS-pstC-pstA* transcript. However, it is somewhat smaller than the 2974 nt predicted for a *pstS-pstC-pstA* transcript. A putative inverted repeat sequence ($\Delta G = -35.0$ kJ) that might act as an internal transcription terminator or an RNase recognition site is present in the middle of *pstA* (Fig. 1; nucleotides 2848–2887 of the *pst* operon, Accession No. K01992). If the *pstS-pstC-pstA* mRNA is indeed cleaved or terminated at this site its expected length is reduced to 2.6 kb.

Northern blots hybridized with the *pstC* and *pstA* probes (Fig. 2B and C) show a 2.6-kb band that represents the *pstS-pstC-pstA* transcript, and a weaker band of about 1.5 kb that might be a transcript of the *pstC-pstA* genes (1847 nt, or 1442 nt assuming that the stem-loop sequence in *pstA* is used as a terminator or a processing site).

Hybridization with the *pstB* probe reveals three RNA species (Fig. 2D), a strong one of 2.6 kb, one of 1.7 kb

and a third of 0.94 kb. The 2.6-kb band probably represents a *pstA-pstB-phoU* transcript (2573 nt). The 1.7-kb band is of the size expected for *pstB-phoU* (1570 nt) and the 0.94-kb band agrees best with *pstB* alone (829 nt). The *phoU* probe also hybridized with the 2.6-kb *pstA-pstB-phoU* transcript, the 1.7-kb species (*pstB-phoU*), and a 0.9-kb transcript that probably represents *phoU* alone (Fig. 2E). Finally, hybridization with the probe that covers the entire operon (Fig. 2F) revealed two major bands of 0.95 kb and 1.2 kb, and a weaker band of 2.6 kb; the same pattern as seen with the *pstS* probe (Fig. 2A). The fact that these *pstS* bands are the main products detected by the *pstS-phoU* probe suggests that *pstS* is the main transcript of the operon. The stem-loop structure located immediately downstream of the *pstS* coding region shows 73% identity to a repetitive extragenic palindromic (REP) sequence (Bachelier et al. 1996). Such REP structures have been shown to impede the 3'→5' exonucleolytic degradation of mRNA (Newbury et al. 1987a, 1987b; Higgins et al. 1992), and should thus increase the amount of *pstS* mRNA in comparison to transcripts of the other *pst* genes. The minor 2.6-kb band probably represents the *pstS-pstC-pstA* transcript, which may be stabilized by the stem-loop (95% homology to the REP consensus) found downstream of *pstA* (Fig. 1). However, none of the probes provides any evidence for the existence of a stable mRNA representing the entire operon. Each of the *pst* probes hybridized with more than one RNA species, suggesting that the full-length *pst* transcript is post-transcriptionally processed by cleavage at specific sites or, less likely, that there are transcription initiation points within the operon (see Discussion).

The primary transcript of the *pst* operon

The Northern blot data described above, as well as our attempts to amplify the entire operon by conventional RT-PCR (not shown), failed to reveal a full-length *pstS-phoU* mRNA species, such as would be expected from an operon. We therefore devised a modification of the EXACT RT-PCR procedure (Smith et al. 2001) that prevents amplification of PCR products from contaminating genomic DNA, and thus eliminates the need to treat the RNA template with DNase, preserving the integrity of the RNA. RNA extracted from the Pi-starved wild-type culture (strain MG1655) was reverse transcribed using a hybrid primer of 42 nt (RT primer); the 21 nucleotides at its 5' end are not homologous to any sequence in the *E. coli* genome, and the 21 nucleotides at its 3' end correspond to the reverse sequence located 115 bp downstream from the start codon of *phoU* (see Fig. 1 and Table 1). Amplification of the reverse-transcribed DNA/RNA hybrid product was performed in four separate reactions; in all of these, the anchored reverse primer which is composed only of the (5' half) non-homologous portion of the RT primer was used as the reverse primer. The forward primer in each reaction corresponded to each of the first four coding

regions of the operon (open arrows in Fig. 1). A product that represents an mRNA transcript of the entire operon is expected from the reaction with the *pstS* primer that represents the proximal gene of the operon and the anchored primer that represents its distal gene (*phoU*). Such an RT-PCR product of 3229 bp extending from the 3' end of the *pstS* coding region through the 5' end of the *phoU* coding region was clearly evident (Fig. 3, lane 1), indicating that the *pst* operon is fully transcribed as a single mRNA. RT-PCR products of the expected shorter lengths that span *pstC-phoU* (2271 bp), *pstA-phoU* (1144 bp) and *pstB-phoU* (323 bp) were also obtained (Fig. 3, lanes 2–4, respectively). All RT-negative lanes did not show any product (not shown), confirming that the products seen in Fig. 3 were amplified from cDNA. The 3229-bp band is less intense than the others, probably because the synthesis of long PCR products is less efficient than that of shorter ones and because the full-length *pst* mRNA is less abundant.

Primer-extension analysis within the *pst* operon

Primer extension analyses were performed using primers designed to anneal upstream of each of the *pst*

Fig. 3 RT-PCR analysis of the *pst* operon. Lanes 1, *pstS-phoU* product; 2, *pstC-phoU* product; 3, *pstA-phoU* product; 4, *pstB-phoU* product. M, DNA ladder, band sizes are indicated on the left

operon genes, in order to determine the location of possible endonuclease cleavage sites, transcription initiation sites or of stable RNA secondary structures (Beuzon et al. 1999; Persson et al. 2000). RNA extracted from Pi-starved and non-starved wild-type cells was used as the template for the reactions. The approximate positions of the primers are depicted as black arrows in Fig. 1. Extension of primer 310c (Fig. 4A), whose 3' end lies 11 bp downstream of the *pstS* start codon, indicated that the transcription start point of *pstS* (and probably the entire operon) is a G-C base pair (position 237 of the *pst* operon, Accession No. K01992) a few bp downstream of the -10 site, confirming previous results (Makino et al. 1988). Primer 1147c, which covers the first six codons of *pstC*, was used to analyze the intergenic region between *pstS* and *pstC*. Four products were observed (Fig. 4B) that extended to the stem-loop structure downstream of *pstS* (Fig. 1), the strongest arrested fragment reaching the most distal base pair at the 3' end of its double-stranded stem (position 1362). Attempts to extend a primer from *pstA* did not yield any product (not shown). The product obtained with the oligomer 3443c, whose 3' end reaches 5 bp downstream of the *pstB* start codon, extended to a C-G base pair (position 3380, Fig. 4C) located 27 nt downstream of the proposed -10 site of the internal promoter in the intergenic region between *pstA* and *pstB* (Amemura et al. 1985). Finally, extension of primer 4222c, located at the 5'-end of the *phoU* coding region, yielded a product that ended at a G-C base pair (position 4150, Fig. 4D) 77 bp upstream of *phoU* and 19 codons upstream of the 3' end of *pstB*. No products were observed when RNA from non-starved cells was used as a template in any of the reactions (data not shown).

In summary, the results of the primer extension analyses confirm the position of the transcription start point of *pstS* (and probably that of the entire operon) (Makino et al. 1988); they also point to the existence of an RNA secondary structure between *pstS* and *pstC*, and they suggest the presence of either transcription start points or ribonuclease cleavage sites within the operon, upstream of *pstB* and *phoU*.

Fig. 4A–D Primer extension analysis of *pst* RNAs. The primers used were 310c (A), 1147c (B), 3443c (C) and 4222c (D). The corresponding genes are indicated in parentheses at the top. The extended products (P.E.) are indicated by the arrows to the left of the lanes. On the right side are the relevant sequences that correspond to the - strand. The bases representing the extension endpoints are boxed

Discussion

Our Northern hybridizations did not detect any RNA species that might correspond to a full-length transcript of the entire *pst* operon. Instead they have revealed much smaller, but discrete, RNA species that were specific to the *pst* operon because they were induced by Pi starvation and were absent in the *phoB* and Δ *pst* mutants. Likewise, the primer-extension experiments revealed the presence of *pst*-specific 5' RNA ends that correspond to internal positions within the intact *pst* mRNA. Nevertheless our RT-PCR analysis demonstrated that a transcript of the entire *pst* operon is in fact synthesized, albeit in small amounts. This leads to the conclusion that a full-length *pst* mRNA is formed, but is cleaved at specific sites shortly after its formation. The specific nature of these cleavages is inferred from the distinct bands represented by the hybridization products on the Northern blots and from the primer extension results.

The primer extension product obtained with the *pstS* primer (Fig. 4A) confirms the location of the transcription initiation site of the operon (Makino et al. 1988). The extension product upstream of *pstC* (Fig. 4B) extends to the 3' end of the stem of the REP element located between *pstS* and *pstC*. Therefore, the termination of extension at this point was probably due to the stem-loop structure (Beuzon et al. 1999). The other primer-extension analyses have revealed two internal 5' ends of *pst*-specific RNA species, one between *pstA* and *pstB* (Fig. 4C) and the other in the coding region of *pstB* (Fig. 4D). Amemura et al. (1985) pointed out the presence of a possible promoter within the *pst* operon, in the coding region between *pstA* and *pstB*, that consists of –10 and –35 consensus sites downstream of a stem-loop structure (Fig. 1). However, it is very unlikely that Pi starvation-induced synthesis of mRNA molecules is initiated within the *pst* operon. This is because all observed transcripts were induced by Pi starvation and were *phoB*-dependent, yet no PHO-box consensus sequences are found inside the *pst* operon. Furthermore, the proposed –10 site (AACACT) does not show much resemblance to the relevant consensus sequences (TATAAT; Harley and Reynolds 1987) and it is actually located at position –27 relative to the 5'-end of the *pstB* primer extension product. We therefore prefer to view this product as being the result of a specific endonuclease cleavage event at a site located between *pstA* and *pstB*. Finally, the primer extension product of *phoU*, which extends into the coding region of *pstB* – where there is no sign of a promoter – strengthens our view that the shorter transcripts are derived from specific endonuclease cleavage of the full-length *pst* transcript. Many studies in other bacterial systems have shown that polycistronic mRNA is post-transcriptionally processed by endonucleolytic cleavage (Faubladier et al. 1990; Murakawa et al. 1991; Gamper and Haas 1993; Naureckiene and Uhlin 1996). The ribonucleases often

involved in mRNA processing are RNase III and RNase E, but the specificity of their recognition sites is still controversial (Nicholson 1999; Rahut and Klug 1999).

The DNA probes that correspond to *pstS* and to the entire operon (*pstS-phoU*) predominantly hybridized with the same 0.95 kb and 1.2 kb species of mRNA (Fig. 2A and F), indicating that these bands, which correspond to *pstS*, are the major *pst* transcripts. The presence of a stable REP secondary structure downstream of *pstS* is probably responsible for the increased amount of *pstS* relative to other *pst* transcripts. Since the primary role of the REP sequences is to stabilize upstream mRNA by protecting it from exonucleolytic attack (Higgins et al. 1992), it is possible that the two smaller and stronger bands that correspond to *pstS* mRNAs are the result of protection by the REP from exonucleolytic degradation of a longer transcript. This conclusion agrees with observations in other ABC-transport operons in which the most proximal gene, usually coding for a periplasmic binding protein, is transcribed in excess relative to the downstream genes of the operon (Higgins et al. 1982; Horazdovsky and Hogg 1987; Hardham et al. 1997). A putative REP sequence that might be involved in the stabilization of the *pstS-pstC-pstA* transcript is also present downstream of *pstA*. However, since the *pstS* mRNA is more abundant than the *pstS-pstC-pstA* transcript, the second REP site is less protective probably because one or more endonuclease cleavage sites within the coding regions of *pstC* and/or *pstA* would expose 3' ends to exonucleolytic degradation.

In conclusion, this study has shown that the *pst* operon is transcribed as a single mRNA molecule. The full-length *pst* transcript is cleaved at specific points shortly after its synthesis, yielding smaller mRNA products. The REP sequence present in the intergenic region between the first and second genes of the operon ensures that the *pstS* mRNA encoding the periplasmic binding protein is the major transcript of the *pst* operon.

Acknowledgements We thank Barry Wanner for sending us bacterial strains. This research was supported by grants 99/09246-3 and 01/05401-6 from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). EY was supported by a grant from the Kurt Lion Foundation.

References

- Amemura M, Makino K, Shinagawa H, Kobayashi A, Nakata A (1985) Nucleotide sequence of the genes involved in phosphate transport and regulation of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 184:241–250
- Bachelier S, Gilson E, Hofnung M, Hill CW (1996) Repeated sequences. In: Neidhardt FC, Curtiss R III, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WF, Riley M, Schaechter M, Umberger HE (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington D.C., pp 2012–2040
- Beuzon CR, Marques S, Casades J (1999) Repression of IS200 transposase synthesis by RNA secondary structures. *Nucleic Acids Res* 27:3690–3695

- Boos W, Lucht JM (1996) Periplasmic binding protein-dependent ABC transporters. In: Neidhardt FC, Curtiss R III, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WF, Riley M, Schaechter M, Umberger HE (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington D.C., pp 1175–1235
- Chan FY, Torriani A (1996) PstB protein of the phosphate-specific transport system of *Escherichia coli* is an ATPase. *J Bacteriol* 178:3974–3977
- Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156–159
- Echols A, Garen A, Garen S, Torriani A (1961) Genetic control of repression of alkaline phosphatase in *E. coli*. *J Mol Biol* 3:425–438
- Faubladier M, Cam K, Bouche JP (1990) *Escherichia coli* cell division inhibitor DicF-RNA of the *dicB* operon. Evidence for its generation in vivo by transcription termination and by RNase III and RNase E-dependent processing. *J Mol Biol* 212:461–471
- Gamper M, Haas D (1993) Processing of the *Pseudomonas aeruginosa* *arcDABC* mRNA requires functional RNase E in *Escherichia coli*. *Gene* 129:119–122
- Hardham JM, Stamm LV, Porcella SF, Frye JG, Barnes NY, Howell JK, Mueller SL, Radolf JD, Weinstock GM, Norris SJ (1997) Identification and transcriptional analysis of a *Treponema pallidum* operon encoding a putative ABC transport system, an iron-activated repressor protein homolog, and a glycolytic pathway enzyme homolog. *Gene* 197:47–64
- Harley CB, Reynolds RP (1987) Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids Res* 15:2343–2361
- Higgins CF, Ames GF, Barnes WM, Clement JM, Hofnung M (1982) A novel intercistronic regulatory element of prokaryotic operons. *Nature* 298:760–762
- Higgins CF, Peltz SW, Jacobson A (1992) Turnover of mRNA in prokaryotes and lower eukaryotes. *Curr Opin Genet Dev* 2:739–747
- Horazdovsky BF, Hogg RW (1987) High-affinity L-arabinose transport operon. Gene product expression and mRNAs. *J Mol Biol* 197:27–35
- Makino K, Shinagawa H, Amemura M, Kimura S, Nakata A, Ishihama A (1988) Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*. Activation of *pstS* transcription by PhoB protein in vitro. *J Mol Biol* 203:85–95
- Makino K, Amemura M, Kim SK, Nakata A, Shinagawa H (1993) Role of the sigma 70 subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*. *Genes Dev* 7:149–160
- Murakawa GJ, Kwan C, Yamashita J, Nierlich DP (1991) Transcription and decay of the *lac* messenger: role of an intergenic terminator. *J Bacteriol* 173:28–36
- Naureckiene S, Uhlin BE (1996) In vitro analysis of mRNA processing by RNase E in the *pap* operon of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 21:55–68
- Newbury SF, Smith NH, Higgins CF (1987a) Differential mRNA stability controls relative gene expression within a polycistronic operon. *Cell* 51:1131–1143
- Newbury SF, Smith NH, Robinson EC, Hiles ID, Higgins CF (1987b) Stabilization of translationally active mRNA by prokaryotic REP sequences. *Cell* 48:297–310
- Nicholson AW (1999) Function, mechanism and regulation of bacterial ribonucleases. *FEMS Microbiol Rev* 23:371–390
- Persson M, Glatz E, Rutberg B (2000) Different processing of an mRNA species in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 182:689–695
- Rao NN, Torriani A (1990) Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 4:1083–1090
- Rauhut R, Klug G (1999) mRNA degradation in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 23:353–370
- Sambrook J, Russell DW (2001) Molecular cloning: a laboratory manual (3rd edn). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Smith RD, Ogden CW, Penny MA (2001) Exclusive amplification of cDNA template (EXACT) RT-PCR to avoid amplifying contaminating genomic pseudogenes. *Biotechniques* 31:776–782
- Spira B, Yagil E (1998) The relation between ppGpp and the PHO regulon in *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet* 257:469–477
- Spira B, Silberstein N, Yagil E (1995) Guanosine 3',5'-bispyrophosphate (ppGpp) synthesis in cells of *Escherichia coli* starved for Pi. *J Bacteriol* 177:4053–4058
- Steed PM, Wanner BL (1993) Use of the rep technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pst-SCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. *J Bacteriol* 175:6797–6809
- Surin BP, Rosenberg H, Cox GB (1985) Phosphate-specific transport system of *Escherichia coli*: nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships. *J Bacteriol* 161:189–198
- Wanner BL (1993) Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J Cell Biochem* 51:47–54
- Wanner BL (1996) Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. In: Neidhardt FC, Curtiss R III, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WF, Riley M, Schaechter M, Umberger HE (eds) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. ASM Press, Washington D.C., pp 1357–1381
- Webb DC, Rosenberg H, Cox GB (1992) Mutational analysis of the *Escherichia coli* phosphate-specific transport system, a member of the traffic ATPase (or ABC) family of membrane transporters. A role for proline residues in transmembrane helices. *J Biol Chem* 267:24661–24668