

NATALIA PASTERNAK TASCHNER

**A REGULAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA
PELO FATOR σ^S DA RNA POLIMERASE DE
*Escherichia coli***

Tese apresentada ao instituto de Ciências
Biomédicas da Universidade de São Paulo
para a obtenção do título de doutor em
Ciências (Microbiologia).

São Paulo

2006

NATALIA PASTERNAK TASCHNER

**A REGULAÇÃO DA FOSFATASE ALCALINA PELO FATOR
 σ^S DA RNA POLIMERASE DE *Escherichia coli***

Tese apresentada ao instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de doutor em Ciências (Microbiologia).

Área de concentração:
Microbiologia

Orientador:
Prof. Dr. Beny Spira

São Paulo
2006



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

© reprodução total

T-ICB
BMM
QW4
T197rf
2006

Taschner, Natalia Pasternak.

A regulação da fosfatase alcalina pelo fator σ^S da RNA polimerase de *Escherichia coli* / Natalia Pasternak Taschner. -- São Paulo, 2006.

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: Alkaline phosphatase regulation by the σ^S factor of RNA polymerase in *Escherichia coli*.

Descritores: 1. RNA polimerase 2. *Escherichia coli* 3. Fator sigma 4. Fosfatase alcalina I. Spira, Beny II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia III. Título.

ICB/SBIB044/2006

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Natalia Pasternak Taschner.

Título da Tese: A regulação da fosfatase alcalina pelo fator σ^S da RNA polimerase de *Escherichia coli*.

Orientador(a): Beny Spira.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a 31 / 05 / 06, considerou

Aprovado(a) () **Reprovado(a)**

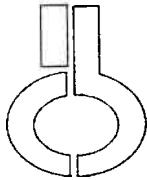
Examinador(a): Assinatura: Baldini
Nome: Regina Lucia Baldini
Instituição: IB - USP

Examinador(a): Assinatura: Almeida
Nome: Aline Maria Silve
Instituição: IB - USP

Examinador(a): Assinatura: Dauris V. Marques
Nome: Marilia da Valle Marques
Instituição: ICB - USP

Examinador(a): Assinatura: Carlos Frederico Martins Menck
Nome: Carlos Frederico Martins Menck
Instituição: ICB - USP

Presidente: Assinatura: Beny Spira
Nome: Beny Spira
Instituição: ICB - USP



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP – Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **037** nas fls. **15** do livro **2** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Beny Spira, Coordenador da Linha de Pesquisa "**Regulação da fosfatase alcalina pelo fator o2 da RNA polimerase em Escherichia coli**" do qual participou(aram) o(s) aluno(s): **Natalia Pastermak Taschner**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **26.04.2005**.

São Paulo, 28 de abril de 2005.

Prof. Dra. Marília C. Leite Seelaender
Coordenadora da CEEA

Prof. Dr. Francisco Carlos Pereira
Secretário da CEEA

Para meu marido Sérgio, pelo
companheirismo, incentivo, carinho e
paciência que tornaram possível a
realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao meu marido, meus pais, meus amigos e familiares, que me ajudaram nestes cinco anos com carinho, paciência e estímulo.

Ao Prof. Beny Spira, pelo incentivo nas horas difíceis, pela amizade, confiança, encorajamento, e por me ensinar que fazer ciência é mais do que uma profissão, é um modo de pensar e uma postura perante a vida.

Ao Prof. Luís Carlos Ferreira e Profa. Rita Café Ferreira, pelo apoio e utilização de recursos de seus laboratórios.

Ao Juliano Domiraci Paccez e Wilson Barros Luiz, pela amizade e extrema paciência, e pelo auxílio no trabalho com camundongos, e em todo o processo de obtenção de anticorpos essenciais para este trabalho.

Ao Gérson Moura Ferreira, pelo companheirismo, apoio e paciência nas horas difíceis, pelas infindáveis e produtivas discussões, pela amizade e finalmente, por consertar absolutamente todo e qualquer aparelho do laboratório.

À Juliana Velasco, pelo carinho e amizade e pela ajuda no sequenciamento das amostras de DNA; e ao prof. Paolo Zanotto, por permitir o sequenciamento de nossas amostras de DNA em seu laboratório.

À Juliana Andreoni Nico, pela amizade e por me auxiliar na expressão e purificação de proteínas, e ao prof. Carlos Winter, por permitir a utilização de recursos de seu laboratório.

À Profa. Marylis Marques, e seus alunos José, Vânia, Valéria, Elza e Luís, pela utilização de recursos de seu laboratório e pelo auxílio prestado sempre que necessário.

Aos professores Sueli Lopes Gomes, Frederico Gueiros Filho, Regina Baldini, Marylis Marques e todo o pessoal do grupo de seminários, pelas discussões e idéias que contribuíram para este trabalho.

Aos amigos queridos do laboratório, Gérson, Meire, Cássia, Adelaide, Viviane, Eduardo, Johana, Ana Lúcia, Murilo, Camila, Ricardo e Kumie, que no decorrer destes 5 anos, me ajudaram de todas as formas possíveis.

Ao Prof. Ezra Yagil, por sua intensa colaboração, sua experiência e amizade.

À todas as pessoas que direta ou indiretamente me auxiliaram durante a realização deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro, sem o qual a realização deste trabalho não teria sido possível.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Ao meu pai, Mauro Roberto Black Taschner, por me ensinar desde cedo os caminhos e fascínios da ciência.

À minha mãe, Suzana Pasternak, por me incentivar e ajudar a trilhar os caminhos da carreira científica.

A ambos, por valorizarem o estudo e o conhecimento, pelo estímulo e incentivo, pelo amor e carinho, e finalmente, por simplesmente acreditarem em mim, sempre.

RESUMO

O fator σ^S associado à RNA polimerase de *E. coli* ($E\sigma^S$) é responsável pela transcrição da maioria dos genes relacionados à sobrevivência durante a fase estacionária e em períodos de estresse. Quando a célula entra em carência de fosfato inorgânico, um conjunto de genes e operons conhecidos como o regulon PHO é ativado. Os genes do regulon PHO são transcritos preferencialmente pela RNA polimerase associada ao fator σ^D . A inativação do gene *rpoS*, que codifica para o fator σ^S , causou um aumento significativo na expressão da maioria dos genes de PHO. O efeito repressor de σ^S foi atribuído à competição entre este fator sigma e o fator σ^D pelo cerne da RNA polimerase. Diferentemente dos demais genes de PHO, a expressão de *pstS*, o primeiro gene do operon *pst*, foi moderadamente estimulada na presença do fator σ^S . A região promotora de *pstS* contém uma citosina na posição -13 e um sítio de ligação para a proteína IHF. Estes elementos, encontrados em genes dependentes do fator σ^S , podem estar contribuindo para a transcrição de *pstS* pela holoenzima $E\sigma^S$.

Um estudo do polimorfismo do gene *rpoS* em diversas cepas de *E. coli* K-12 detectou a presença de uma mutação âmbar no códon 33 deste gene. Bactérias supressoras da mutação âmbar produzem uma proteína de tamanho normal (38 KDa), ao passo que bactérias não-supressoras produzem um fator σ^S truncado, que apesar de possuir 55 aminoácidos a menos, foi capaz de transcrever seus genes dependentes ainda que com menor eficiência. Cepas que carregam o códon 33 âmbar apresentaram um fenótipo diferenciado em relação à expressão dos genes de PHO.

Palavras chave: RNA polimerase, fator sigma, regulon PHO, fosfatase alcalina, operon *pst*.

ABSTRACT

In *E. coli*, the RNA polymerase associated with σ^S ($E\sigma^S$) is responsible for the transcription of the majority of the genes related to survival during stress periods or during the stationary phase of growth. When cells enter a phase of phosphate starvation, the transcription of several genes and operons, known as the PHO regulon, is activated. Knock-out of *rpoS*, which encodes σ^S , increases the expression of most PHO genes. The negative effect of σ^S on PHO expression is probably due to the competition between σ^S and σ^D for the core RNA polymerase. Unlike all other PHO genes, *pstS*, the first gene of the *pst* operon, was mildly stimulated by σ^S . The promoter region of *pstS* contains a cytosine residue at position -13, and an IHF binding site. These elements are known to be important for the transcription of σ^S -dependent genes, and may contribute for the transcription of *pstS* by $E\sigma^S$.

The polymorphism of *rpoS* in several *E. coli* K-12 strains was evaluated. An amber mutation in codon 33 of this gene was found in 2 out of 7 strains. These strains were found to suppress the amber mutation and to produce a normal 38 KDa σ^S protein. Non-suppressor strains carrying this amber mutation produced a σ^S variant, lacking 55 amino acids. The truncated σ^S protein was still able to drive the transcription of its dependent genes, albeit in a smaller proportion. Strains carrying the *rpoS* amber mutation presented a distinct phenotype regarding the expression of the PHO regulon genes.

Key words: RNA polymerase, sigma factor, PHO regulon, alkaline phosphatase, *pst* operon.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA – bovine serum albumine
cAMP – AMP cíclico
CAT – cloranfenicol acetil transferase
CRP – receptor de cAMP
DNA – ácido desoxiribonucleico
DO – densidade ótica
DTNB - 5,5´ditiobis-2 nitrobenzoic acid
 $E\sigma$ – holoenzima associada ao fator sigma
FA – fosfatase alcalina
FIS - factor for inversion secificity
GASP – growth advantage in stationary phase
H-NS - heat-stable nucleoid-structuring protein
HU – histone like protein
IHF – integration host factor
Lrp – proteína reguladora de leucina
mRNA – RNA mensageiro
ORF – open reading frame
PCR – polymerase chain reaction
ppGpp – guanosina tetra-fosfato
RNA – ácido ribonucleico
RNAP – RNA polimerase
rpoSAm – mutante *rpoS* âmbar
SDS – sodium dodecyl sulphate
SPANC - self-preservation and nutritional competence
Pi – fosfato inorgânico
p-NPP – p-nitrofenil-fosfato

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	RNA polimerase e seus fatores sigma	1
1.1.1	O fator σ^S	3
1.1.2	Regulação da expressão de σ^S	5
1.1.3	Competição entre os fatores σ^S e σ^D	7
1.1.4	Caracterização da seqüência promotora de genes dependentes de σ^S	8
1.2	Polimorfismo de <i>rpoS</i>	11
1.3	A proteína IHF (Integration Host Factor)	13
1.4	O regulon PHO	15
1.5	A transcrição dos genes de PHO	18
1.6	A relação entre o regulon PHO, o fator σ^S e IHF	20
2	OBJETIVOS	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Meios de Cultura	22
3.2	Cepas, plasmídios e oligonucleotídios	23
3.3	Manipulações de DNA	27

3.3.1	Digestão com enzimas de restrição, ligação, extração de plasmídios, reações de PCR e eletroforese	27
3.3.2	Transformação	27
3.3.3	Sequenciamento de <i>rpoS</i> e das mutações pontuais	28
3.4	Transdução com o fago P1	28
3.4.1	Preparação do lisado de P1	28
3.4.2	Transdução	29
3.5	Obtenção de mutantes através de transdução	29
3.5.1	Obtenção dos mutantes <i>rpoS</i> ::Tn10	29
3.5.2	Obtenção do alelo <i>rpoS</i> âmbar em MG1655	29
3.6	Clonagens	30
3.6.1	Clonagem de <i>rpoS</i> proveniente de MG1655, BL21, K10, C600, W3110, MC4100 e CSH109 em plasmídios de expressão	30
3.6.2	Clonagem de <i>phoA</i> em plasmídio de expressão	32
3.6.3	Clonagem de <i>rpoS</i> de MG1655, C600 e K10 em plasmídios para expressão de σ^S com cauda de histidina	32
3.7	Ensaio quantitativo de Fosfatase Alcalina (FA)	33
3.7.1	Ensaio de bactérias cultivadas durante a noite	33
3.7.2	Ensaio de atividade de FA durante a entrada na fase de carência de Pi	34
3.8	Ensaio qualitativo de catalase	34
3.9	Ensaio de β-galactosidase	35
3.10	Extração de RNA	35
3.11	Preparação de sondas de DNA	35
3.12	Northern-blot	36
3.13	Ensaio de Cloranfenicol Acetil Transferase (CAT)	37
3.14	Mutações sítio-dirigidas de pBS11 e PNP8	37
3.15	Purificação da proteína σ^S	38

3.16	Western-blot	38
3.17	Southern-blot	39
3.18	Ensaio de competição	39
4	RESULTADOS	40
4.1	Efeito de σ^S sobre o regulon PHO	40
4.1.1	Efeito de σ^S sobre FA	40
4.1.2	Efeito de σ^S sobre FA em células não carentes de Pi	43
4.1.3	Efeito de σ^S sobre a transcrição dos genes de PHO	45
4.2	Transcrição de <i>pstS</i> via σ^S	47
4.2.1	O papel da citosina na posição -13 de <i>pstS</i>	47
4.2.2	O efeito da transição T \rightarrow C na posição -13 de <i>phoA</i>	49
4.2.3	O papel da proteína IHF	50
4.3	Polimorfismo de <i>rpoS</i>	52
4.3.1	Efeito dos diferentes alelos <i>rpoS</i> sobre a atividade de FA	53
4.3.2	Sequenciamento dos diversos alelos de <i>rpoS</i>	59
4.3.3	Caracterização das proteínas σ^S dos diversos alelos	61
4.3.4	Determinação do número de cópias de <i>rpoS</i> nos cromossomos de C600 e K10	64
4.3.5	Efeito dos diferentes alelos <i>rpoS</i> sobre <i>lacZ</i>	66
4.3.6	Competição entre bactérias contendo as formas longa e truncada de σ^S	68
5	DISCUSSÃO	71
5.1	O efeito negativo de σ^S sobre o regulon PHO	71
5.1.1	Competição entre fatores sigma	71
5.1.2	Por que <i>pstS</i> é diferente?	73
5.2	Polimorfismo de <i>rpoS</i>	75
5.3	Vantagens de ser um mutante âmbar	77

6	CONCLUSÕES	80
7	BIBLIOGRAFIA	81
8	ANEXOS	95

1 INTRODUÇÃO

Escherichia coli é um bacilo gram-negativo, que habita o intestino de mamíferos e aves e ambientes aquáticos, tais como rios, mares e lagos. Durante seu ciclo de vida, *E. coli* enfrenta diferentes condições ambientais que podem variar subitamente; variações de pH, osmolaridade, temperatura e disponibilidade de nutrientes são uma constante. Condições adversas ao crescimento caracterizam situações de estresse. A maioria das bactérias, incluindo *E. coli*, possui mecanismos de resposta ao estresse que permitem a sobrevivência em condições desfavoráveis (Farrel e Finkel, 2003).

Entretanto, a resposta ao estresse tem um custo alto para o organismo, sendo objeto de uma regulação complexa, e demanda uma boa quantidade de recursos (Ferenci, 2005). A resposta ao estresse não se limita somente às alterações fisiológicas e ao padrão de expressão de genes, mas também em longo prazo à seleção de mutações que conferirão melhor adaptabilidade às condições do ambiente em que a bactéria se encontra (Farrel e Finkel, 2003).

A carência de fosfato é uma condição bastante comum em ambientes aquáticos frequentemente habitados por *E. coli* (Barik et al, 2001, Sundareshwar, 2003). Neste trabalho, investigamos a relação entre a resposta bacteriana à carência de fosfato e a regulação geral de resposta ao estresse em *E. coli*.

1.1 RNA polimerase e seus fatores sigma

A RNA polimerase é a enzima responsável pela transcrição dos genes. O cerne da enzima é composto por 5 subunidades: 2 subunidades α , β , β' e ω (Ishihama, 2000). O sítio ativo da enzima é formado pelas subunidades β (Browning e Busby, 2004). A porção amino-terminal da subunidade α é responsável pela montagem do sítio ativo, enquanto a porção carboxi-terminal funciona como um módulo de ligação à região promotora do gene (Browning e Busby, 2004). O papel da subunidade ω é

controverso, foi primeiramente descrita como um fator não essencial para o processo de transcrição (Gentry et al, 1991), mas relacionado ao processo de dobramento da subunidade β (Ghosh et al, 2001). Mais recentemente foi proposto que a subunidade ω se liga à guanosina tetrafosfato (ppGpp), exercendo um papel importante na resposta ao estresse (Vrentas et al, 2005). Para iniciar a transcrição, é necessária uma sexta subunidade conhecida como fator sigma (σ), que se associa ao cerne de maneira reversível, formando a holoenzima ($E\sigma$). O fator sigma facilita o reconhecimento do promotor pela RNA polimerase, além de auxiliar no desenrolamento da dupla fita de DNA.

Uma vez iniciado o processo de transcrição, o fator sigma é geralmente liberado, sendo o cerne da enzima suficiente para transcrever o gene até o ponto de terminação (Burgess e Anthony, 2001). Entretanto, estudos recentes contestam a necessidade do fator sigma em abandonar a holoenzima após o início da transcrição. (Mukhopadhyay et al., 2001, Mukhopadhyay et al., 2003, Nickels et al., 2004, Kapanidis et al, 2005).

Em eubactérias existem duas famílias principais de fatores sigma, a família σ^{70} e a família σ^{54} (Paget e Helmann, 2003). A maior parte dos fatores sigma pertence à família σ^{70} . Já a família σ^{54} compreende proteínas de função análoga, mas estruturalmente diferentes da família σ^{70} . Os membros da família σ^{70} reconhecem elementos de aproximadamente 6 pares de bases, localizados nas regiões -10 e -35 acima do início de transcrição (Paget e Helmann, 2003). Diversos membros da família σ^{70} foram descobertos em diferentes bactérias; em *Streptomyces coelicolor*, por exemplo, foram encontrados 63 ORFs correspondentes a fatores da família σ^{70} (Paget e Helmann, 2003).

Em *E. coli*, até o momento foram identificados 7 fatores σ , sendo que cada um deles reconhece uma classe distinta de genes (Jishage e Ishihama, 1997, Ishihama, 2000). Apenas um pertence à família σ^{54} , os demais pertencem à família σ^{70} (Paget e Helmann, 2003). O fator σ^{70} ou σ^D , codificado pelo gene *rpoD*, é o principal, sendo responsável pela transcrição da maior parte dos genes da bactéria. Ele está ativo principalmente durante a fase logarítmica de crescimento. Os demais fatores sigma desta família são: σ^N (σ^{54}), σ^S (σ^{38}), σ^H (σ^{32}), σ^F (σ^{28}), σ^E (σ^{24}) e σ^{FecI} (Maeda et al,

2000). O fator σ^S , conhecido também como σ^{38} , é considerado o segundo em importância (Nguyen et al, 1993, Tanaka et al, 1993), sendo necessário para a transcrição de genes relacionados à proteção e sobrevivência da bactéria durante a fase estacionária, ou em situações de estresse, tais como choque térmico, mudança brusca de pH e carência de nutrientes (Hengge-Aronis, 1996). A holoenzima $E\sigma^N$ transcreve genes regulados pela disponibilidade de nitrogênio, $E\sigma^H$ transcreve genes envolvidos em choque térmico, $E\sigma^F$ é necessária para a expressão de genes envolvidos na síntese de flagelos e quimiotaxia, $E\sigma^E$ transcreve genes envolvidos em funções extra-citoplasmáticas e choque térmico, e finalmente, $E\sigma^{FecI}$, é um membro da sub-família de fatores sigma relacionados à funções extra-citoplasmáticas (ECF) (Maeda et al, 2000, Ishihama, 2000). Trataremos detalhadamente neste trabalho do fator σ^S .

1.1.1 O fator σ^S

σ^S é conhecido como o regulador mestre da resposta geral ao estresse em *E. coli* (Becker e Hengge-Aronis, 2001). Foi descoberto de maneira independente por 7 grupos diferentes, que estudavam aspectos diversos do metabolismo bacteriano (Hengge-Aronis, 2000). σ^S é codificado pelo gene *rpoS*, que também é conhecido como *nuv*, *katF*, *attP*, *appR*, *xthA* e *csi-2*. Estas denominações foram sugeridas, de acordo com a função estudada para o produto do gene. Neste contexto, *rpoS* foi identificado como um gene envolvido na resistência à radiação UV (Tuveson e Jonas, 1979), regulador do gene *katE*, que codifica para a enzima catalase (Loewen e Triggs, 1984), regulador da fosfatase ácida (Touati et al, 1986), regulador da exonuclease III (Sak et al, 1989), e finalmente, como regulador de genes de fase estacionária (Lange e Hengge-Aronis, 1991). Em um determinado momento ficou claro que todos estes estudos abordavam aspectos distintos do mesmo gene, que codifica um fator sigma, explicando o motivo de funções tão variadas. Por ser um fator sigma relacionado ao estresse, o nome *rpoS* prevaleceu sobre as demais denominações (Hengge-Aronis, 2000).

O gene *rpoS* está localizado no minuto 61,76 do cromossomo de *E. coli*, no sentido anti-horário. Forma um operon juntamente com o gene *nlpD*, que localizado acima de *rpoS*, codifica para uma lipoproteína de função ainda não esclarecida (Lange e Hengge-Aronis, 1994). *rpoS* é transcrito a partir de 3 promotores: os promotores *nlpDp1* e *nlpDp2* localizam-se acima de *nlpD* e um terceiro promotor, *rpoSp*, situa-se dentro de *nlpD*, sendo este o principal responsável pela transcrição de *rpoS* durante a fase estacionária de crescimento (Lange et al, 1995, Hengge-Aronis, 2002). A proteína NlpD não é induzida em fase estacionária, indicando que os 2 promotores *nlpDp1* e *nlpDp2* não são regulados pela fase de crescimento (Hengge-Aronis, 2002).

Conforme veremos detalhadamente mais adiante, σ^S é uma proteína bastante polimórfica (Zambrano et al, 1993, Jishage e Ishihama, 1997, King et al, 2004). A forma mais comum de σ^S em cepas de laboratório apresenta uma massa molecular de 37,8 kDa, característica esta que deu origem à designação σ^{38} para este fator sigma (Hengge-Aronis, 2000).

σ^S não é considerado um mero fator sigma alternativo, mas um segundo fator sigma principal (Hengge-Aronis, 2000). É estruturalmente muito semelhante a σ^D , e reconhece seqüências promotoras similares.

A resposta a estresses específicos é caracterizada pela eliminação do agente causador do estresse ou reparação do dano causado. A função de σ^S , no entanto, é predominantemente geral e preventiva, preparando a célula para lidar com eventuais estresses. Genes que codificam proteínas com função reparadora são raros entre aqueles controlados por σ^S (Hengge-Aronis, 2000, 2002).

Os mais de 70 genes dependentes de σ^S conferem resistência à estresse oxidativo, radiação ultravioleta, hiperosmolaridade, pH ácido, etanol, choques térmicos, alta densidade celular e possivelmente outros estresses ainda não identificados (Hengge-Aronis, 2002). Além disso, genes controlados por σ^S também estão relacionados com a morfologia da célula, morte celular programada e virulência em alguns patógenos entéricos. σ^S também se acumula em situações de carência de

carbono, nitrogênio, fosfato ou aminoácidos, e durante a entrada da célula na fase estacionária de crescimento (Hengge-Aronis, 2002).

1.1.2 Regulação da expressão de σ^S

Durante a fase logarítmica de crescimento, σ^S não é sequer detectável, no entanto, a proteína acumula-se rapidamente no início da fase estacionária, ou em resposta aos diferentes tipos de estresse descritos acima. A regulação da expressão de σ^S em *E. coli* ocorre em vários níveis (Figura 1), desde a transcrição, passando pela tradução e por controles pós-traducionais (disponibilidade e proteólise da proteína) (Lange e Hengge-Aronis, 1994). Os diferentes níveis de regulação sugerem que não há um sinal celular comum a todos os tipos de estresse. Em geral, condições de estresse potencialmente letais requerem uma resposta rápida, e atuam sobre a estabilidade de σ^S . Um estresse mais gradual ou condições ambientais menos severas tendem a estimular a transcrição ou tradução de σ^S (Hengge-Aronis, 2000).

Os níveis de mRNA de *rpoS* são relativamente altos mesmo durante a fase de crescimento exponencial (Lange e Hengge-Aronis, 1994). Já os níveis da proteína são alterados significativamente em resposta aos diferentes tipos de estresse. Portanto, a maioria dos estudos sobre a regulação de *rpoS* enfoca aspectos da regulação em nível traducional e pós-traducional. Ainda assim, há certo aumento no nível de transcrição de *rpoS* quando o ritmo de crescimento diminui e durante a entrada em fase estacionária em bactérias crescendo em meio complexo (Lange e Hengge-Aronis, 1991, 1994). Vários fatores estão envolvidos no controle transcricional de *rpoS*, entre eles guanosina tetrafosfato (ppGpp), polifosfatos e cAMP (Hengge-Aronis, 2000, 2002).

A tradução do mRNA de *rpoS* é controlada pela proteína ligante de RNA Hfq, pequenos RNAs (DsrA, RprA e OxyS), DksA, H-NS e UDP-glicose. A tradução de *rpoS* é estimulada de 5 a 10 vezes em situações de aumento de osmolaridade (Muffler et al, 1996), baixas temperaturas (20°C) (Lange e Hengge-Aronis, 1994), assim como entrada em fase estacionária tardia e em resposta à diminuição do pH

de 7 para 5 em meio rico (Hengge-Aronis, 2002). Durante a fase de carência de carbono, a tradução de *rpoS* é reduzida, indicando que o aumento nos níveis de σ^S nestas condições deve-se somente à inibição da degradação da proteína (Lange e Hengge Aronis, 1994).

Na fase exponencial de crescimento, a meia-vida de σ^S gira em torno de um minuto. Situações potencialmente letais, como carência repentina de carbono, choque superormótico e mudança para pH ácido resultam na estabilização de σ^S (Hengge-Aronis, 2002). Fora destas condições, observa-se constante proteólise de σ^S , que é dependente das proteínas ClpXP (protease) e RssB (proteína ligante). RssB, em sua forma fosforilada, liga-se à σ^S e expõe o sítio de ligação à ClpXP, entregando σ^S à ClpXP para proteólise e sendo então liberado do complexo (Becker et al, 1999, Zhou et al, 2001, Mika e Hengge, 2005).

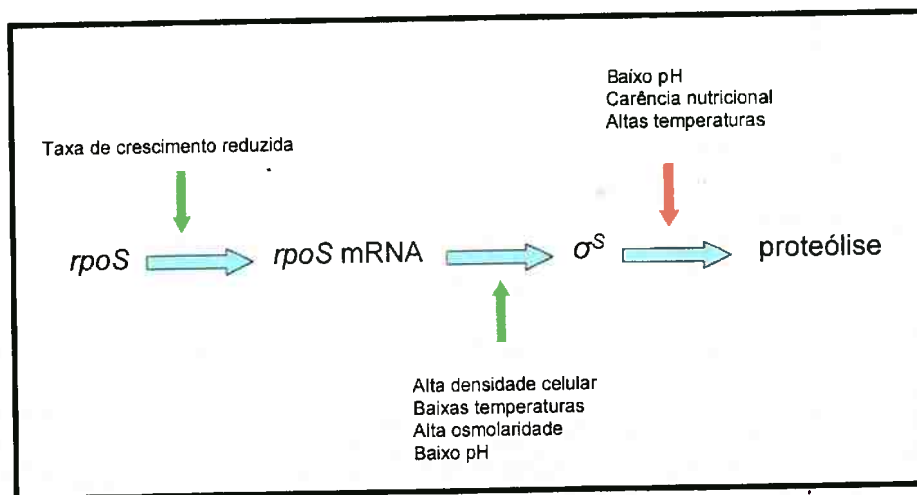


Figura 1 – Vários níveis da regulação de σ^S , em resposta a diferentes estímulos. As setas verdes indicam indução da transcrição e tradução, a seta vermelha indica inibição da proteólise (adaptado de Hengge-Aronis, 2002).

1.1.3 Competição entre os fatores σ^S e σ^D

Em bactérias crescendo em meio rico, a concentração do cerne da RNA polimerase é de aproximadamente 2000 moléculas por equivalente genômico de DNA, dos quais um terço (600-700) encontra-se livre, não associado ao DNA. A quantidade total de moléculas de todos os sete fatores sigma presentes em *E. coli* é de aproximadamente 1200/célula, ou seja, o dobro da concentração de moléculas de cerne livres (Ishihama, 2000). Devido à limitação na quantidade de cernes de RNA polimerase na célula, os fatores sigma devem competir entre si para ligar-se ao cerne e promover a transcrição de seus genes dependentes.

A competição entre os diversos fatores sigma pelo cerne da RNA polimerase determina o padrão geral de transcrição da bactéria (Zhou et al, 1992, Jishage e Ishihama, 1999, Maeda et al, 2000). Desta maneira, a substituição de uma holoenzima por outra determina uma alteração no padrão de transcrição de genes, como ocorre na entrada em fase estacionária ou sob diversos tipos de estresse, e esta alteração é sempre precedida de aumento nos níveis de um determinado fator sigma.

A concentração de cada holoenzima depende, portanto, da quantidade disponível dos respectivos fatores sigma, e de sua afinidade pelo cerne da RNA polimerase. Os fatores sigma exibem diferentes afinidades pelo cerne da RNA polimerase, sendo que a maior afinidade é encontrada para o fator σ^D , que chega a ser 16 vezes maior que a do fator σ^S , que apresenta a menor afinidade (Maeda et al, 2000). Além disso, em sua concentração máxima, σ^S corresponde a apenas 30% da concentração de σ^D (Jishage e Ishihama, 1995, Ishihama, 2000).

Há vários exemplos na literatura de genes que tem seu nível de transcrição afetado pela competição entre os fatores σ^D e σ^S pelo cerne da RNA polimerase. Farewell et al (1998) demonstraram este efeito para os genes *uspA* e *uspB*, transcritos por σ^D e σ^S , respectivamente. Através da super expressão de σ^D , observaram aumento no nível de transcrição de *uspA* ao mesmo tempo em que a transcrição do gene *uspB* era inibida e vice-versa. Este efeito foi atribuído à competição entre os fatores sigma

pela quantidade limitada de RNA polimerase produzida pela célula, como descrito acima.

É surpreendente que σ^S consiga transcrever seus genes dependentes de maneira eficaz, uma vez que sua concentração na célula e afinidade pelo cerne são muito menores que as de σ^D . Acredita-se que alguns elementos possam contribuir para aumentar a afinidade de σ^S e também para diminuir a afinidade de σ^D pelo cerne da RNA polimerase em determinadas condições.

A molécula ppGpp, sintetizada em resposta à todos os tipos de estresse estudados, parece reduzir a afinidade de σ^D pelo cerne (Hernandez e Cashel, 1995), além de ser necessária para a expressão e atividade de σ^S (Gentry et al, 1993, Lange et al, 1995, Kvint et al, 2000). A concentração de σ^D livre também diminui na fase estacionária graças à ligação do fator anti-sigma Rsd a σ^D , inativando-o reversivelmente (Jishage e Ishihama, 1998). Além disso, moléculas como CRP (receptor de cAMP), Lrp (proteína reguladora de leucina) e IHF (fator de integração ao hospedeiro), inibem parcialmente a ligação de $E\sigma^D$ ao sítio promotor (Colland et al, 2000). Concentrações elevadas de glutamato de potássio e uma diminuição no grau de super-enrolamento do DNA também contribuem positivamente para a seletividade dos promotores dependentes de σ^S (Colland et al, 2000).

1.1.4 Caracterização da seqüência promotora de genes dependentes de σ^S

$E\sigma^S$ e $E\sigma^D$ reconhecem seqüências promotoras similares (Wise et al, 1996, Espinosa-Urgel et al, 1996, Gaal et al, 2001 e Lee e Gralla, 2001). Estudos *in vitro* demonstraram que muitos genes são transcritos com igual eficiência por ambos os fatores sigma (Nguyen et al, 1993, Tanaka et al, 1993, Kusano et al, 1996, Colland et al, 2000 e Bordes et al, 2000). Além disso, a seleção *in vitro* de uma seqüência promotora ótima dependente de σ^S revelou um consenso compatível com aquele obtido para σ^D , em ambas as regiões -10 e -35 (Gaal et al, 2001).

No entanto, *in vivo*, os promotores são geralmente reconhecidos por somente um dos fatores sigma (Hengge-Aronis, 1999 e Ishihama, 1999). Vários elementos parecem contribuir, de maneira integrada, para a seletividade de σ^S . Alguns estudos sugeriram a falta de uma seqüência consenso para a região -35 em genes transcritos por σ^S *in vivo* (Gaal et al, 2001), sugerindo uma interação fraca entre $E\sigma^S$ e a região -35. Portanto, promotores contendo uma região -35 significativamente distinta da seqüência consenso seriam preferencialmente reconhecidos por σ^S . Além disso, promotores dependentes de σ^S toleram um maior espaçamento entre as regiões -35 e -10 (Typas e Hengge, 2006). Já em relação à região -10, foram propostas seqüências consenso para promotores dependentes de σ^S .

Através da compilação de 41 genes dependentes de σ^S *in vivo*, foi sugerida a seqüência CTACACT, da posição -13 até a posição -7 como consenso para promotores dependentes de σ^S (Lee e Gralla, 2001). Outra compilação, de 56 promotores, chegou ao consenso CYATACT (Lacour et al, 2003). Atribui-se um papel especial à posição -13, ocupada por uma citosina em genes transcritos preferencialmente por $E\sigma^S$ (Lee e Gralla, 2001 e Lacour et al, 2003). Lee e Gralla (2001) ressaltam que a função da citosina na posição -13 é impedir o reconhecimento do sítio promotor por σ^D . Similarmente, Becker e Hengge-Aronis (2001) sustentam a importância da região -10 e particularmente de -13C no reconhecimento por σ^S . Hengge-Aronis (2002) alega que uma citosina na posição -13 é claramente específica para promotores dependentes de σ^S , ocorrendo em 80% dos promotores naturalmente transcritos por $E\sigma^S$, enquanto que os promotores dependentes de σ^D exibem uma seleção contra -13C.

A substituição de uma citosina por uma timina na posição -13 do promotor de *osmE* afetou negativamente a transcrição *in vivo* deste gene por $E\sigma^S$ (Bordes et al, 2000). Experimentos de supressão específica de alelos demonstraram que -13C interage com uma lisina na região 2.5 de σ^S , enquanto σ^D possui um resíduo de glutamato nesta mesma região que interage preferencialmente com uma guanina na posição -13 (Becker e Hengge-Aronis, 2001).

De uma forma geral, os promotores dependentes de σ^S são mais tolerantes em relação à alterações e variações nos espaçamentos entre as seqüências -10 e -35, diferentemente de promotores dependentes de σ^D . Mas esta estratégia impõe um preço: estes promotores operam de forma sub-ótima (Typas e Hengge, 2006). Como os genes dependentes de σ^S são ativados em situações de estresse, quando o crescimento se encontra estacionado, a atividade promotora sub-ótima destes genes geralmente não representa um problema.

Promotores dependentes de σ^S também podem aumentar sua atividade através da presença de elementos UP (Typas e Hengge, 2005), que são regiões localizadas acima da seqüência -35, e que auxiliam na ligação da RNA polimerase ao promotor, aumentando a eficiência da transcrição (Gourse et al, 2000). Os elementos UP são formados por dois sítios independentes, chamados de proximal e distal, sendo que a RNA polimerase pode ligar-se a apenas um ou a ambos os sítios (Estrem et al, 1998, 1999). Foi demonstrado que, na ausência de uma seqüência -35, promotores dependentes de σ^S exibem uma preferência por elementos UP distais, e rejeitam elementos UP proximais ou completos (ambos os sítios presentes), enquanto promotores dependentes de σ^D preferem interagir com elementos UP proximais ou completos (Typas e Hengge, 2005). Além disso, proteínas acessórias, tais como CRP, Lrp e IHF podem contribuir para a indução de seletividade (Germer et al, 2001). Estas proteínas podem funcionar como ativadores diretos da ligação de $E\sigma^S$ ao promotor ou como repressores que inibem preferencialmente σ^D , favorecendo σ^S na competição, (Colland et al, 2000).

Resumidamente, podemos dizer que $E\sigma^S$ explora seqüências promotoras menos convencionais, que não são reconhecidas por $E\sigma^D$ por este tolerar menos variações em relação às seqüências consenso da região promotora (Typas e Hengge, 2006). Entretanto, seqüências consenso para a região -10 foram descritas (Lee e Gralla, 2001, Lacour et al, 2003) e em especial a presença de uma citosina na posição -13 foi considerada fundamental para a ligação de $E\sigma^S$ ao promotor (Bordes et al, 2000, Becker e Hengge-Aronis, 2001, Lee e Gralla, 2001).

1.2 Polimorfismo de *rpoS*

Ivanova et al (1992) encontraram uma grande variação nas seqüências do gene *rpoS* em cepas derivadas de *E. coli* K-12. Zambrano et al (1993) demonstraram que cepas selvagens acumulam mutações em *rpoS* sempre que cultivadas por longos períodos de tempo e que estes mutantes apresentam vantagem adaptativa em relação à culturas jovens, dando origem a um fenótipo que ficou conhecido como GASP (*Growth Advantage in Stationary Phase*) (Zambrano et al, 1993, 1996, Finkel, 2006).

Fatores sigma da família σ^D tiveram suas seqüências de proteínas divididas em 4 regiões conservadas e numeradas de 1 a 4 (Gowrishankar et al, 2003). As regiões 2 e 4 são as mais conservadas e são estas as regiões responsáveis pela ligação às regiões promotoras -10 e -35, respectivamente. A região 1 foi subdividida em 2 subregiões, 1.1 e 1.2, das quais a primeira é altamente conservada (Gowrishankar et al, 2003). Foi sugerido que a região 1.1 protege as regiões 2 e 4 enquanto σ^D encontra-se livre, expondo estas regiões somente quando o fator sigma estiver associado ao cerne da RNA polimerase (Rajkumari e Gowrishankar, 2002). Outras funções sugeridas para a região 1.1 incluem intermediar a ligação inicial do fator sigma ao cerne, aumento da eficiência do início da transcrição pela holoenzima e sua estabilização (Wilson e Dombroski, 1997). A deleção da região 1.1 de σ^D mostrou-se letal para a bactéria (Dombroski et al, 1993, Sharp et al, 1999). O fator σ^S também apresenta a região 1.1. No entanto, um alinhamento da região 1.1 de σ^S com os demais fatores da família σ^D mostrou que apenas metade desta região é conservada (Wilson e Dombroski, 1997).

Mutações são comuns na região 1.1 de *rpoS* e incluem uma transição C→T na posição 99, que resulta em um códon de parada TAG (âmbar) no códon 33. Esta mutação foi descrita por diversos autores (Atlung et al, 2002, Rajkumari e Gowrishankar, 2002, Subbarayan e Sarkar, 2003 e 2004) e causa o término precoce da síntese de σ^S . Esperar-se-ia, portanto, que cepas com esta mutação apresentassem fenótipos semelhantes à de um mutante nulo de σ^S .

No entanto, foi detectada nestes mutantes a síntese de uma proteína σ^S menor, porém funcional. Foi sugerida a presença de um segundo sítio de início de tradução na posição 157, e um possível sítio Shine-Dalgarno na posição 143 (Figura 2) (Rajkumari e Gowrishankar, 2002, Subbarayan e Sarkar, 2003 e 2004). Esta proteína truncada seria composta por 277 aminoácidos, 53 a menos do que a σ^S selvagem. Foi demonstrado que a forma truncada de σ^S retém parcialmente sua função, ou seja, é capaz de transcrever genes dependentes de σ^S , ainda que em menor proporção (Subbarayan e Sarkar, 2003).

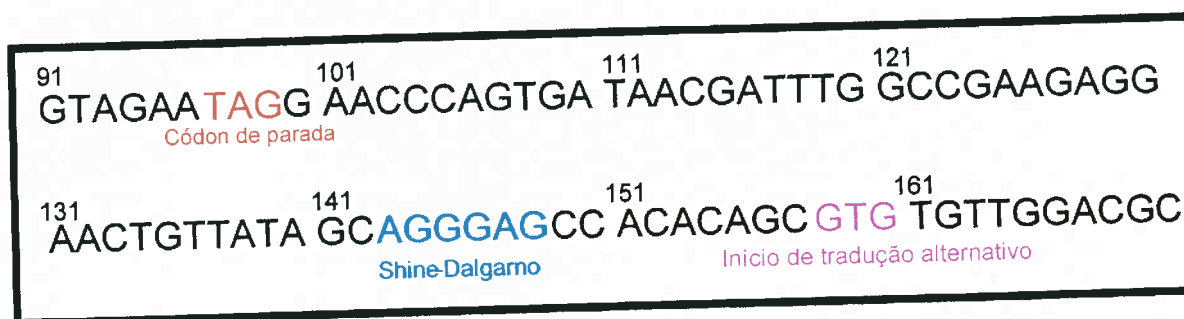


Figura 2 – Seqüência de região 1.1 de um alelo *rpoS* âmbar. Em destaque o códon de parada TAG, os prováveis sítios Shine-Dalgarno (SD), e de início de tradução GTG.

Um estudo comparativo das seqüências de *rpoS* na cepa W3110 proveniente de diferentes laboratórios demonstrou que 4 de 5 amostras seqüenciadas apresentavam uma timina na posição 97, em vez da citosina reportada como fenótipo selvagem; estas cepas foram denominadas *rpoSAm* (mutante âmbar de *rpoS*) (Subbarayan e Sarkar, 2004). Entretanto, quando estes autores seqüenciaram a cepa ancestral de W3110, W3350, e uma derivada da mesma, a cepa W1485, constataram que estas também apresentaram um resíduo de timina na posição 97. Assim, foi sugerido que a proteína σ^S truncada, corresponde à versão ancestral ou selvagem do gene *rpoS* em cepas aparentadas a W3110, já que a maioria das cepas possui um códon de parada na posição 97-99.

Atlung et al (2002) também encontraram mutantes âmbar em aproximadamente 50% das cepas K-12 examinadas. Já em todas as cepas de *E. coli* ambientais e patogênicas (não derivadas de K-12), encontraram uma guanina na posição 97. Estes autores ainda sugeriram que o ancestral comum de *E.coli* possuía um códon

GAG na posição 33 de *rpoS*, que transformou-se em TAG na linhagem K-12, dando origem aos mutantes conhecidos atualmente como âmbar. Mutações adicionais teriam ocorrido com o passar do tempo em cepas de laboratório, reconstituindo o alelo longo de σ^S através da reversão da mutação âmbar, ou por supressão da mesma (Atlung et al, 2002).

1.3 A proteína IHF (Integration Host Factor)

Bactérias não apresentam histonas, mas possuem diversas proteínas que auxiliam na compactação do DNA. As mais bem caracterizadas são as proteínas HU, H-NS, FIS e IHF, todas relativamente abundantes na célula (Goosen e van de Putte, 1995). IHF liga-se a sítios específicos no cromossomo da bactéria, ocasionando um dobramento de 160 graus na molécula de DNA (Rice et al, 1996). É composta por duas subunidades IhfA e IhfB, codificadas por genes homônimos, conhecidos também como *himA* e *himD* ou *hip* (Weisberg et al, 1996).

IHF foi caracterizada pela primeira vez como uma proteína acessória no processo de integração do fago λ no cromossomo de *E. coli* (Miller e Friedman, 1980). Além disso, IHF é essencial ao processo de replicação do DNA bacteriano (Friedman, 1988) e está envolvida na modulação da expressão gênica (Goosen e van de Putte, 1995). Um experimento de microarranjo demonstrou que IHF afeta a expressão de mais de 120 genes de *E. coli* (Arfin et al, 2000). IHF pode agir tanto como inibidor ou ativador de transcrição. Quando o sítio de ligação de IHF coincide com a região promotora -10 ou -35 de um gene, ocorre geralmente repressão da transcrição deste gene (Goosen e van de Putte 1995). Um exemplo deste tipo de interação é a ligação de IHF à região promotora de *ompB* (Tsui et al, 1991) (Figura 3B).

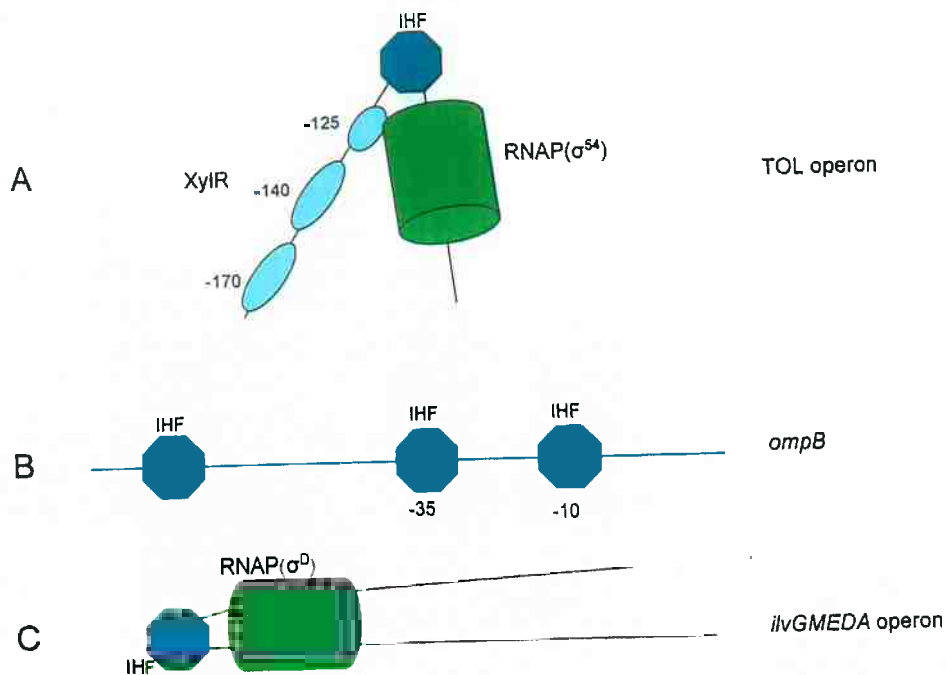


Figura 3 – Representação esquemática dos modos de atuação da proteína IHF. A- IHF como um ativador transcricional, facilitando a ligação da RNA polimerase (RNAP) à proteína ativadora no operon TOL de *Pseudomonas putida*. B- IHF como um inibidor de transcrição do gene *ompB*, impedindo a ligação da RNAP à região promotora. C- IHF como um ativador direto do operon *ilvGMEDA* de *E. coli*, facilitando a interação de regiões específicas da RNAP com seqüências localizadas acima, e favorecendo a formação do complexo fechado. A figura foi adaptada de Goosen e van de Putte (1995).

IHF é um estimulador geral de transcrição para genes dependentes de σ^{54} . Sítios de ligação à IHF foram encontrados nas regiões regulatórias destes genes, localizados entre a seqüência promotora e sítios de ligação de uma proteína ativadora específica localizados acima. Acredita-se que a função de IHF, nestes casos, seja estrutural, facilitando a formação de uma alça, que por sua vez é necessária para aproximar a proteína ativadora de $E\sigma^{54}$. Um exemplo deste tipo de estimulação de transcrição ocorre nos genes dependentes de σ^{54} presentes no plasmídio TOL de *Pseudomonas putida*; IHF dobra o DNA, permitindo a interação entre a proteína reguladora XylR e a holoenzima $E\sigma^{54}$ (Figura 3A). Neste caso, a presença de IHF é essencial para a transcrição (Hoover et al. 1990, Claverie-Martin e Magasanik 1991, Seong et al. 2002).

Foi demonstrado também que IHF pode agir diretamente como um estimulador de transcrição para alguns genes, ligando-se a um sítio imediatamente acima do promotor, e favorecendo a formação do complexo binário fechado (Figura 3C) (Goosen e van de Putte, 1995), provavelmente através da interação com a subunidade alfa da RNA polimerase (Giladi et al, 1992). Exemplos de genes assim regulados são o promotor Pe do fago Mu (Krause e Higgins 1986, Goosen e van de Putte 1995), o promotor pL1 do fago λ (Giladi et al, 1990), e o promotor pG2 do operon *ilvGMEDA* de *E. coli* (Pagel e Hatfield 1991).

Sítios IHF foram encontrados em alguns promotores dependentes de σ^S e já foi sugerido que a presença de um sítio de ligação IHF na região promotora geralmente favorece a transcrição por σ^S em caso de competição, pois reprime fortemente a transcrição por σ^D (Hengge-Aronis 2000 e 2002, Colland et al, 2000). Exemplos de alguns genes dependentes de σ^S regulados por IHF são *ihfA*, *dps*, *osmY* e *sra* (Arfin et al. 2000; Lange et al. 1993; Izutsu et al. 2001). *dps* e *sra* são regulados positivamente, enquanto *osmY* e *ihfA* são inibidos por IHF. (Aviv et al. 1994; Colland et al. 2000). Para o promotor de *dps*, por exemplo, IHF atua como um ativador em fase estacionária, facilitando a ligação do fator σ^S (Altuvia et al, 1994). No caso de *osmY*, que pode ser transcrito *in vivo* tanto por $E\sigma^D$ como por $E\sigma^S$, IHF reprime mais fortemente a transcrição por $E\sigma^D$ do que por $E\sigma^S$, contribuindo para a seletividade de σ^S (Colland et al, 2000).

1.4 O regulon PHO

O regulon PHO consiste de mais de 40 genes e operons (Figura 4) envolvidos na captação e transporte de compostos fosforilados (Rao et al, 1993). Sua transcrição é ativada durante a carência de fosfato inorgânico (Pi), quando a concentração externa deste nutriente cai para níveis abaixo de 4 μ M (Makino et al, 1993). Os genes mais bem caracterizados do regulon são *phoA*, *phoE*, o operon *pst*, o operon *ugp* e o operon *phoB/phoR* que codificam respectivamente a enzima Fosfatase Alcalina (FA), a porina seletiva para ânions PhoE, o transportador de alta-afinidade

de Pi Pst, o transportador de alta afinidade de glicerol-3-fosfato Ugp e o sistema de dois componentes PhoB/PhoR, responsável pela ativação da transcrição dos genes de PHO. O operon *pst* funciona também como um regulador negativo de PHO, já que mutações neste operon acarretam a síntese constitutiva de todos os genes de PHO (Wanner, 1996). O exato mecanismo desta regulação ainda não é conhecido.

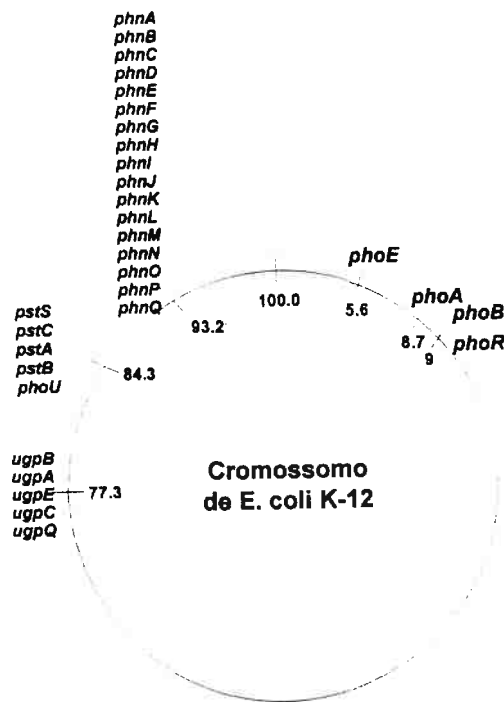


Figura 4 – Localização dos principais genes e operons do regulon PHO no cromossomo de *E. coli*

Os genes de PHO possuem, no lugar da seqüência promotora -35, um ou mais PHO-box, que é uma seqüência de 18 pares de bases cujo consenso é CTGTCATWAWCTGTCAAY. Experimentos envolvendo a deleção desta região confirmaram que sua presença é indispensável para a expressão dos genes de PHO (Makino et al, 1993). A seqüência -10 é conservada e similar ao -10 dos demais genes de *E. coli* (Figura 5).

PHO-boxes

-10

AGCTGTCATAAAGTTGTCACGGCCGAGACTTATAGTCGCT *phoA*
 GCTTTTCATAAATCTGTCATAAATCTGACGCATAATGACG *phoB*
 ATCTGTAATATATCTTTAACAAATCTCAGGTAAAAACTTT *phoE*
 CACTGTCATCACTCTGTCATCTTTCCAGTAGAACTAATG *phoH*
 ATCTGTTAGTCACTTTAATTAACCAAATCGTCACAATAATC *phnC*
 AGGTTGAACAAAACATACACAAAAATATAGATCTCCGTCACATTTTTGCGTTATACAGGAA *psiE*
 CTCTGTCATAAAACTGTCATATTCCTTACATATAACTGTCACCTGTTTGTCTATTTTGCTT *pstS*
 TACTATCTTACAAATGTAACAAAAAAGTTATTTTTCTGTAATTCGAGCATGTCATGTTACCC *ugpB*

Figura 5 – Promotores dos genes de PHO. A região do PHO-box está representada por retângulos; a região -10 está sublinhada e em negrito a posição -13.

A ativação da transcrição dos genes de PHO é regulada por duas proteínas do tipo “sistema de dois componentes”, PhoB e PhoR (Figura 6). PhoR é uma histidina quinase que possui um domínio citoplasmático e outro embebido na membrana (Torriani, 1990). De maneira ainda não esclarecida, PhoR “sente” a baixa concentração externa de Pi e se auto-fosforila. Em seguida, PhoR-P transfere seu grupo fosfato para PhoB (Torriani, 1990). PhoB é uma proteína reguladora, que uma vez fosforilada (PhoB-P), liga-se ao PHO-box presente na região promotora de todos os genes do regulon PHO, ativando suas transcrições (Makino et al, 1989).

REGULAÇÃO DE PHO

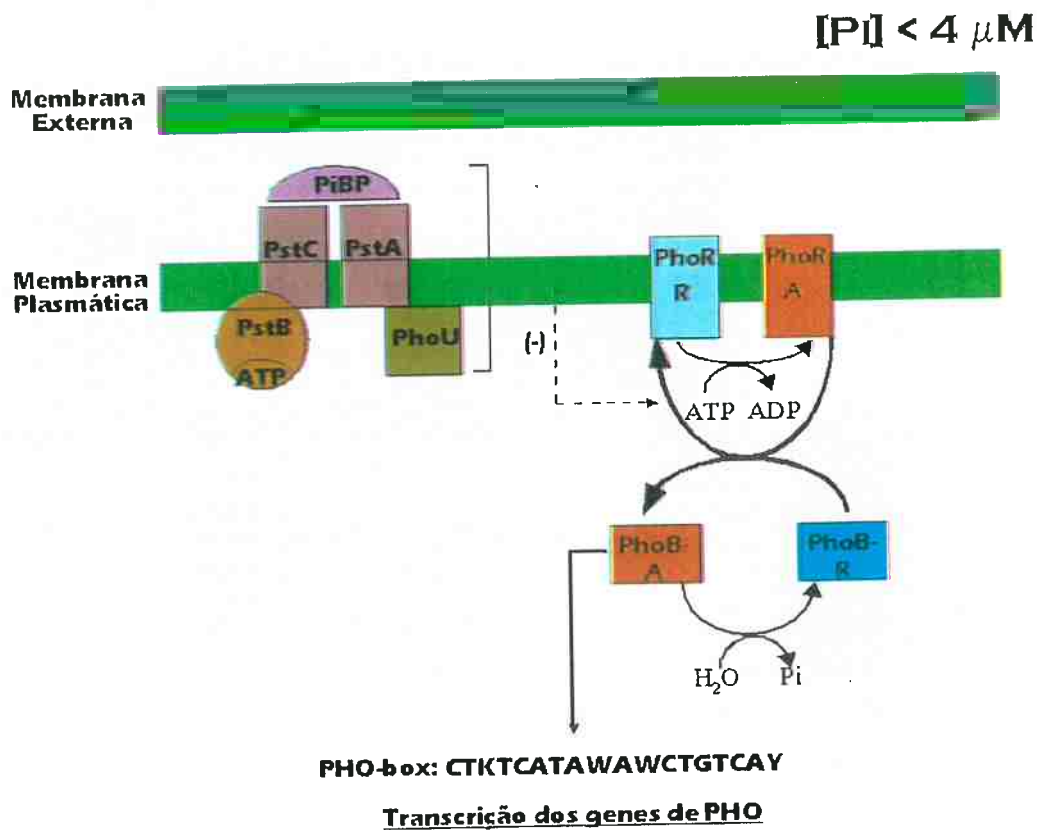


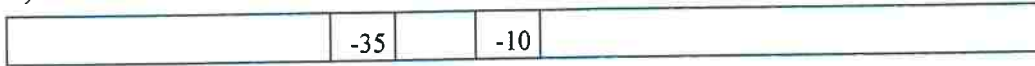
Figura 6 - Esquema representativo da ativação da transcrição dos genes de PHO pelo sistema de dois componentes PhoB/PhoR.

1.5 A transcrição dos genes de PHO

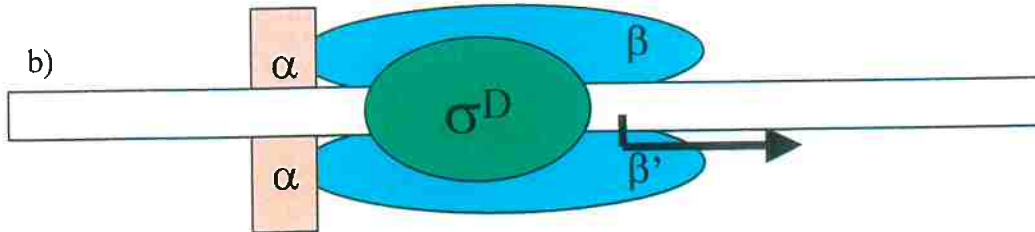
A transcrição *in vivo* dos genes de PHO requer o fator σ^D da RNA polimerase (Makino et al 1988, 1989). Apesar de σ^D interagir com a seqüência -10 dos promotores de PHO, a formação de um complexo estável com o promotor só é possível com o auxílio de PhoB-P (Makino et al, 1993, Hiratsu et al, 1995). PhoB-P liga-se ao PHO-box e forma um complexo que interage diretamente com a subunidade σ^D da RNA polimerase (Figura 7).

A

a)

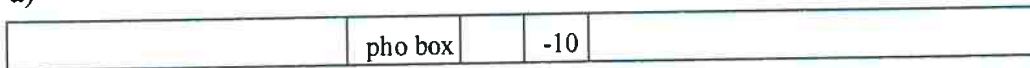


b)



B

a)



b)



c)

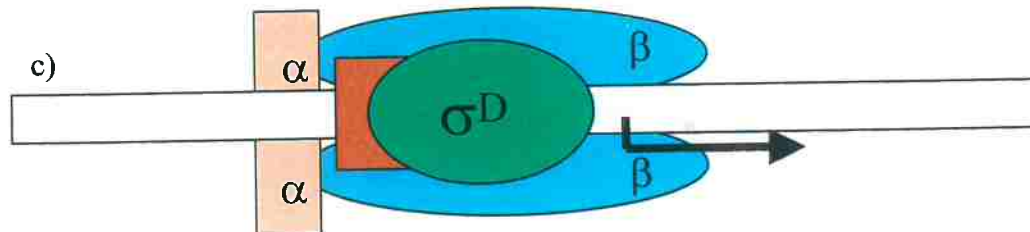


Figura 7 – Esquema da interação da proteína PhoB com o fator σ^D da RNA polimerase, modificado de Makino et al (1993): A. a) seqüências -35 e -10 de um gene regular, b) RNA polimerase interage com as seqüências promotoras. B. a) seqüência promotora de um gene de PHO, explicitando o PHO-box, b) ligação da proteína PhoB-P ao PHO-box e c) ligação da subunidade σ^D à PhoB-P e à região -10.

1.6 A relação entre o regulon PHO, o fator σ^S e IHF

Resultados preliminares obtidos no laboratório demonstraram que σ^S reprime a atividade de FA em cepas de *E. coli* K-12. Uma vez que os genes de PHO são transcritos preferencialmente por $E\sigma^D$ (Makino et al, 1993), foi levantada a hipótese de que a competição entre os fatores σ^D e σ^S pela ligação ao cerne da RNA polimerase afetaria a transcrição dos genes do regulon PHO. Apesar disso, é possível notar que o operon *pst* possui uma seqüência -10 típica de promotores dependentes de σ^S (Figura 3) (Lee e Gralla, 2001, Becker e Hengge-Aronis, 2001, Hengge-Aronis, 2002, Lacour et al, 2003, Lacour e Landini, 2004). Foi também demonstrado que a região promotora de *pst* apresenta um sítio de ligação para IHF, que também caracteriza genes dependentes de σ^S , localizado entre a seqüência -10 e o Shine-Dalgarno (Spira e Yagil, 1999) e que IHF estimula diretamente a transcrição do operon *pst*.

2 OBJETIVOS

Pretendemos através deste trabalho investigar a relação entre o regulon PHO e o fator σ^S da RNA polimerase de *Escherichia coli*. Tanto o regulon PHO como o fator σ^S são ativados em resposta à a carência de Pi no meio externo (Gentry et al, 1993, Hengge-Aronis, 2002). Este trabalho visa caracterizar a forma pela qual a bactéria concilia estas duas respostas, e propor um modelo evolutivo para sua ocorrência.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Meios de Cultura

Meio A (Levinthal et al, 1962): 0,12M Tris, 80 mM NaCl, 20 mM KCl, 20 mM NH₄Cl, 3 mM Na₂SO₄, 1 mM MgCl₂ , 0,2 mM CaCl₂ , 2 μM ZnCl₂, 0,5% Glicose, 0,5% Bacto-peptona em pH 7,5.

Meio A é um meio de cultura semi-rico contendo 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

Meio LB (Miller,1992): Bacto-Tripona (10g/l), Extrato de levedura (5g/l), NaCl (10g/l), em pH 7,4.

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

Meio T-salts (Torriani, 1960): NaCl (4,68 g/l), KCl (1,5g/l) ,NH₄Cl (1,08g/l), Tris-base (14,52g/l), MgCl.6H₂O (0,2g/l), Na₂SO₄ (0,35g/l), CaCl₂ (0,01M), FeCl₃ (0,01M), ZnCl₂ (0,01M), em PH 7,5 (ajustado com HCl concentrado).

Ao meio T-salts foi acrescentado 0,2% de Glicose e concentrações variadas de KH₂PO₄.

3.2 Cepas, plasmídios e oligonucleotídios

Tabela 1 - Cepas e plasmídios:

Cepa	Genótipo	fonte
BL21 (DE3)	F ⁻ <i>ompT hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) gal dcm</i> (DE3)	Coleção do laboratório
BS7	MG1655 <i>ΔpstSCABU::KmR</i>	Coleção do laboratório
BS16	MG1655 <i>rpoS::Tn10</i>	Coleção do laboratório
C600	F- <i>hsdR supE44 thr-1 leuB6 thi-1 lacY1 fhuA21 e14- mcrB lambda-</i>	Coleção do laboratório
CSH109	F-, <i>ara Δ(gpt-lac)5 rpsL</i>	Coleção do laboratório
JY16	MPh45 <i>phoA</i> ⁻	Rao et al (1993)
K10	HFr <i>tonA22 ompF626 relA1 pit-10 spoT1 T2(R)</i>	Coleção do laboratório
MC4100	<i>E. coli</i> K-12 selvagem	Coleção do laboratório
MG1655	<i>E. coli</i> K-12 selvagem	Coleção do laboratório
NP1	K10 <i>rpoS::Tn10</i>	Este estudo
NP2	CSH109 <i>rpoS::Tn10</i>	Este estudo
NP3	C600 <i>rpoS::Tn10</i>	Este estudo
NP8	BL21(DE3) <i>rpoS::Tn10</i>	Este estudo
NP23	JY16 <i>rpoS::Tn10</i>	Este estudo
NP34	MG1655 <i>rpoS::Tn10 ΔpstSCABU::KmR</i>	Este estudo
NP36	MG1655 <i>lacZ::Tn5</i>	Este estudo
NP38	W3110 <i>rpoS::Tn10</i>	Este estudo
NP69A	RW1370 <i>rpoS::Tn10</i>	Este estudo
NP107	MC4100 <i>rpoS::Tn10</i>	Este estudo
NP108	RW1369 <i>rpoS::Tn10</i>	Este estudo
NP136	MG1655 <i>rpoSAm zfi::Tn10</i>	Este estudo
RW1369	F ⁻ <i>thyA strA</i>	R. Weisberg
RW1370	F ⁻ <i>thyA strA hip157</i>	R. Weisberg
W3110	W3110 <i>Δlac</i>	Coleção do laboratório
Plasmídios	Característica	fonte
pACT3	Vetor de clonagem CmR, promotor <i>tac</i> , <i>lacI^q</i>	Thomas Linn
pBS11	Região promotora de <i>pstS</i> clonada em pKK232-8 acima do gene repórter <i>cat</i>	Coleção do laboratório
pGB2	Vetor de clonagem de poucas cópias	Churchward et al, 1984
pKK232-8	Vetor de clonagem	Amersham Biosciences
pMRG7	<i>rpoD</i> clonado sob <i>P_{tac}</i>	coleção do laboratório

pNP5	<i>rpoS</i> clonado em pACT3 sob <i>Ptac</i>	Este estudo
pNP6	pBS11 no qual -13C de <i>pstS</i> foi substituída por -13T	Este estudo
pNP8	<i>phoA</i> clonado em pGB2	Este estudo
pNP9	pNP8 no qual -13T de <i>phoA</i> foi substituída por -13C	Este estudo
pNP10	<i>rpoS</i> ⁺ de C600 clonado em pACT3 sob <i>Ptac</i>	Este estudo
pNP11	<i>rpoS</i> ⁺ de K10 clonado em pACT3 sob <i>Ptac</i>	Este estudo
pNP12	<i>rpoS</i> ⁺ de CSH109 clonado em pACT3 sob <i>Ptac</i>	Este estudo
pNP13	<i>rpoS</i> ⁺ de BL21 clonado em pACT3 sob <i>Ptac</i>	Este estudo
pNP14	<i>rpoS</i> ⁺ de W3110 clonado em pACT3 sob <i>Ptac</i>	Este estudo
pNP16	<i>rpoS</i> ⁺ de MC4100 clonado em pACT3 sob <i>Ptac</i>	Este estudo
pNP19	<i>rpoS</i> ⁺ de MG1655 clonado em pPROEX htc	Este estudo
pNP26	<i>rpoS</i> ⁺ de C600 clonado em pPROEX htc	Este estudo
pNP27	<i>rpoS</i> ⁺ de K10 clonado em pPROEX htc	Este estudo
pPROEX htc	Vetor de clonagem para purificação de proteínas com His-tag	Invitrogen
pRPOD	<i>rpoD</i> ⁺ clonado em pBR322	K. Makino

Tabela 2 - Oligonucleotídios

Nome	Sequencia	Utilização
pBS11 mut(-)	GTTTGTGGCTACGAGAAGCAAAA TAAGACAAACAGGTGACAG	mutação pontual no promotor de <i>pstS</i>
pBS11 mut(+)	CTGTCACCTGTTTGTCTTATTTG CTTCTCGTAGCCAACAAC	mutação pontual no promotor de <i>pstS</i>
<i>phoA</i> 110	GACCATT CCTGCAG ACGATAC	amplificação de <i>phoA</i> para clonagem em pGB2, negrito indica sítio de restrição da enzima HindIII

phoA Bam	ATTTTCATAGCAGGATCCCTCTTCA	amplificação de <i>phoA</i> para clonagem em pGB2, negrito indica sítio de restrição da enzima BamHI
phoA mut(+)	CTGTCATAAAGTTGTCACGGCCGA GACCTATAGTCGCTTTG	mutação pontual no promotor de <i>phoA</i>
phoA mut(-)	CAAAGCGACTATAGGTCTCGGCCG TGACAACCTTTATGACAG	mutação pontual no promotor de <i>phoA</i>
phoB 4821	TCAAACACCTCAAGCGCGAG	amplificação de <i>phoB</i> para sonda radioativa
phoB 5240	GCTCCAGTGCTTTACGCA	amplificação de <i>phoB</i> para sonda radioativa
phoE 1118	TTGGTGCGATCTGAGTTGGTAT	amplificação de <i>phoE</i> para sonda radioativa
phoE 818	ACCTGGGGGCGTTGTATGAC	amplificação de <i>phoE</i> para sonda radioativa
pstS (-)	TCAGCGGAGATCAGTTTGGTGTT	amplificação de <i>pstS</i> para sonda radioativa
pstS (+)	CTTCCCTGCGCCGGTGTATGC	amplificação de <i>pstS</i> para sonda radioativa
rpoS (1+)	TGTTCCGTCAAGGGAATCACGGGT A	sequenciamento do gene <i>rpoS</i>
rpoS (2+)	CATACGCAACCTGGTGGATT	sequenciamento do gene <i>rpoS</i>
rpoS (3+)	GAAGATACCACGCAAGATGAC	sequenciamento do gene <i>rpoS</i>
rpoS (4-)	GTGTTAACGACCATTCTCGG	sequenciamento do gene <i>rpoS</i>
rpoS (5-)	GTCATCTTGCGTGGTATCTTCC	sequenciamento do gene <i>rpoS</i>
rpoS (6-)	CAGACCACGATTGCCATAAC	sequenciamento do gene <i>rpoS</i>
rpoS(-)	ATACTGCAGGCAGCAAAGGACAGG	amplificação de <i>rpoS</i> para clonagem em pACT3, negrito indica sítio de restrição da enzima HindIII
rpoS(+)	CGTCGCGGCTGAAGCTTACAA CAC	amplificação de <i>rpoS</i> para clonagem

		em pACT3, negrito indica sítio de restrição da enzima PstI
rpoS(Bam)	TCACGGGTAG GATCC ACCTT	amplificação de <i>rpoS</i> para clonagem em pPROEX htc, negrito indica sítio de restrição da enzima BamHI
ugpB 1012	GACGCGGTGCTGGAGTTCAATA	amplificação de <i>ugpB</i> para sonda radioativa
ugpB 1462	CCGCCCTGGGTTTTTCTCATA	amplificação de <i>ugpB</i> para sonda radioativa

3.3 Manipulações de DNA

3.3.1 Digestão com enzimas de restrição, ligação, extração de plasmídios, reações de PCR e eletroforese

Enzimas de restrição foram adquiridas da empresa Fermentas e as digestões foram feitas conforme especificado pelo fabricante. As ligações foram feitas em temperatura ambiente, por 4 horas com T4 DNA Ligase (Fermentas ou Invitrogen) e tampão fornecido pelo fabricante. Extrações de plasmídios foram feitas pelo método de lise alcalina (Sambrook e Russel, 2001). As amplificações de DNA foram feitas no termociclador *Master Cycler Personal* da Eppendorf. O número de ciclos variou de 35 a 40. A temperatura de anelamento foi calculada subtraindo-se 2-3 graus da temperatura de *melting* (T_m). O tempo de extensão foi de 1 min/Kb de produto de PCR. Para amplificação do gene *rpoS* e para inserção de mutações pontuais nos promotores de *pstS* e *phoA* foi utilizada a enzima Pfx (Invitrogen). Para as demais amplificações, utilizou-se a enzima Taq Platinum (Invitrogen). As eletroforeses de DNA foram feitas em gel de agarose em tampão TAE (Tris-acetato EDTA) x 1. Após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídeo e visualizados sob luz UV.

3.3.2 Transformação

As transformações com plasmídios foram feitas através de eletroporação no aparelho *Bio-Rad Micro Pulser* em bactérias competentes. Imediatamente após o choque elétrico, as bactérias transformadas foram transferidas a tubos contendo meio SOC e incubadas por 1 hora a 37°C para expressar os genes de resistência a antibióticos. Em seguida, as bactérias foram semeadas em placas de meio LB, contendo o antibiótico apropriado para seleção dos transformantes.

Para a obtenção de células competentes, as cepas de interesse foram cultivadas durante a noite em meio LB, diluídas 100x no dia seguinte no mesmo meio, e cultivadas até atingir uma DO de aproximadamente 0,5-0,6 medida em 540 nm. Neste ponto, as culturas foram mantidas no gelo, lavadas duas vezes com glicerol

10%, e ressuspendidas em 80 µl de GYT (10% glicerol, 0,125% extrato de levedura, 0,25% triptona). As bactérias competentes foram então instantaneamente congeladas em uma mistura de etanol com gelo seco, e armazenadas na temperatura de -80°C até serem utilizadas.

3.3.3 Sequenciamento de *rpoS* e das mutações pontuais

As seqüências codificadoras (ORFs) de *rpoS* das diversas cepas K-12 estudadas foram amplificadas e seqüenciadas (ambas as fitas de DNA) com os iniciadores indicados na Tabela 2 utilizando-se o kit *BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit* em sequenciador automático modelo ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems/Hitachi). Os plasmídios pNP6 e pNP8 foram seqüenciados no mesmo aparelho com os iniciadores pstS(+) e phoA110 , respectivamente, para confirmar a presença das mutações pontuais.

3.4 Transdução com o fago P1

3.4.1 Preparação do lisado de P1

A bactéria doadora foi cultivada durante a noite em meio LB. No dia seguinte, a cultura foi diluída 100 vezes no mesmo meio contendo 5 mM CaCl₂ e 0,2% glicose e cultivada até atingir a DO de aproximadamente 0,5, medida em 540 nm. Neste momento foi adicionado 1/50 do volume da cultura de um lisado de fagos P1 contendo aproximadamente 10⁹ fagos/ml. As bactérias foram então cultivadas por mais 2-3 horas a 37 °C até que fosse observada a lise das células. Neste momento, clorofórmio foi adicionado ao lisado (1/20 do volume), que foi em seguida centrifugado para descartar os restos de bactérias. O lisado foi armazenado a 4°C.

3.4.2 Transdução

As cepas a serem transduzidas foram cultivadas durante a noite em meio LB, centrifugadas na manhã seguinte e ressuspensas em tampão MC (0,1M MgSO₄, 5mM CaCl₂). 200 µl de células foram misturados com 200 µl do lisado de P1 e incubados por 20 min a 37°C. Em seguida, 200 µl de citrato de sódio 0,1 M foram adicionados para quelar os íons de Ca⁺² e assim evitar a lise das bactérias. As bactérias foram incubadas por mais 30 min a 37°C para expressar o gene de resistência ao antibiótico. O produto da transdução foi semeado em meio LB com o antibiótico apropriado para selecionar as bactérias transducentes.

3.5 Obtenção de mutantes através de transdução

3.5.1 Obtenção dos mutantes *rpoS*::Tn10

Foi obtido um lisado de fago P1 a partir da cepa BS16 (MG1655 *rpoS*::Tn10), conforme descrito acima. Este lisado foi utilizado para infectar separadamente as cepas K10, C600, CSH109, BL21, W3110, MC4100, JY16, BS7, RW1369, RW1370, NP113, NP114, NP115, NP116, NP117, NP118 e NP122. Os transducentes foram selecionados em meio LB acrescido de tetraciclina, e tiveram suas atividades de catalase testadas qualitativamente, como descrito mais adiante.

3.5.2 Obtenção do alelo *rpoS* âmbar em MG1655

Foi obtido um lisado de fago P1 a partir da cepa BS110 (MG1655 *zfi*::Tn10), conforme descrito acima. A frequência de co-transdução de *zfi*::Tn10 com o gene *rpoS* é de 70 %. Este lisado foi utilizado para infectar a cepa C600, e transducentes foram selecionados em meio LB acrescido de tetraciclina. Os transducentes tiveram suas atividades de FA testadas, e aquele que demonstrou uma atividade mais elevada, similar à da cepa C600 selvagem, foi então selecionado. A idéia era

selecionar um mutante que houvesse recebido da cepa doadora apenas o marcador *zfi::Tn10*, mas mantivesse o alelo *rpoS* da cepa receptora (C600). A partir desta nova cepa, foi obtido um novo lisado de P1, que foi utilizado para infectar a cepa selvagem MG1655. Desta vez, procuramos selecionar um transductante que houvesse recebido o alelo *rpoS* de C600 junto com o marcador de resistência à tetraciclina (co-transdução de 70%). Foi selecionado um transductante resistente à tetraciclina que apresentou atividade de FA alta, compatível com a atividade observada para a cepa C600. Ensaio qualitativo de catalase comprovaram o fenótipo do novo mutante, que apresentou atividade reduzida de catalase em relação à cepa MG1655. A nova cepa é, portanto, uma cepa isogênica de MG1655, portando um alelo âmbar de *rpoS*, proveniente da cepa C600, e foi designada MG1655 *rpoS*^{Am} (NP136).

3.6 Clonagens

3.6.1 Clonagem de *rpoS* proveniente de MG1655, BL21, K10, C600, W3110, MC4100 e CSH109 em plasmídios de expressão

Os fragmentos de DNA contendo a região codificadora de *rpoS* de cada cepa foram amplificados a partir do DNA genômico, utilizando-se os iniciadores *rpoS*⁺ e *rpoS*⁻. Os produtos de PCR foram então digeridos com as enzimas PstI e HindIII e ligados aos mesmos sítios de restrição nos vetores pKK223-3 ou pACT3. A Figura 8 ilustra a clonagem do *rpoS* de MG1655 nos vetores pKK223-3 e pACT3, que deu origem aos plasmídios pNP1 e pNP5, respectivamente (Figura 8). Já os fragmentos de PCR de *rpoS* das cepas C600, K10, CSH109, BL21, W3110 e MC4100 foram clonados somente no vetor pACT3 utilizando o mesmo procedimento descrito acima, originando respectivamente os plasmídios pNP10, pNP11, pNP12, pNP13, pNP14, e pNP16 (Figura 9).

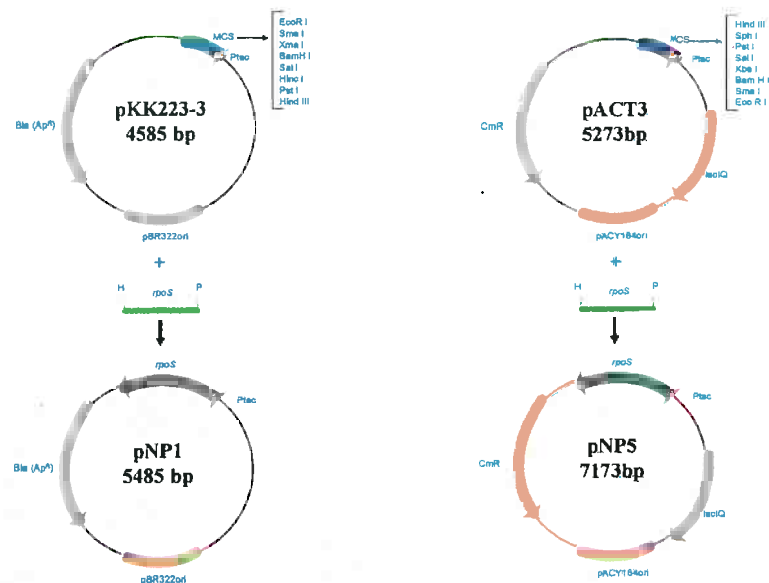


Figura 8 – Representação da clonagem do *rpoS* de MG1655 nos vetores pKK223-3 e pACT3 dando origem aos plasmídios pNP1e pNP5, respectivamente. H, sítio de restrição da enzima HindIII; P, sítio de restrição de PstI.

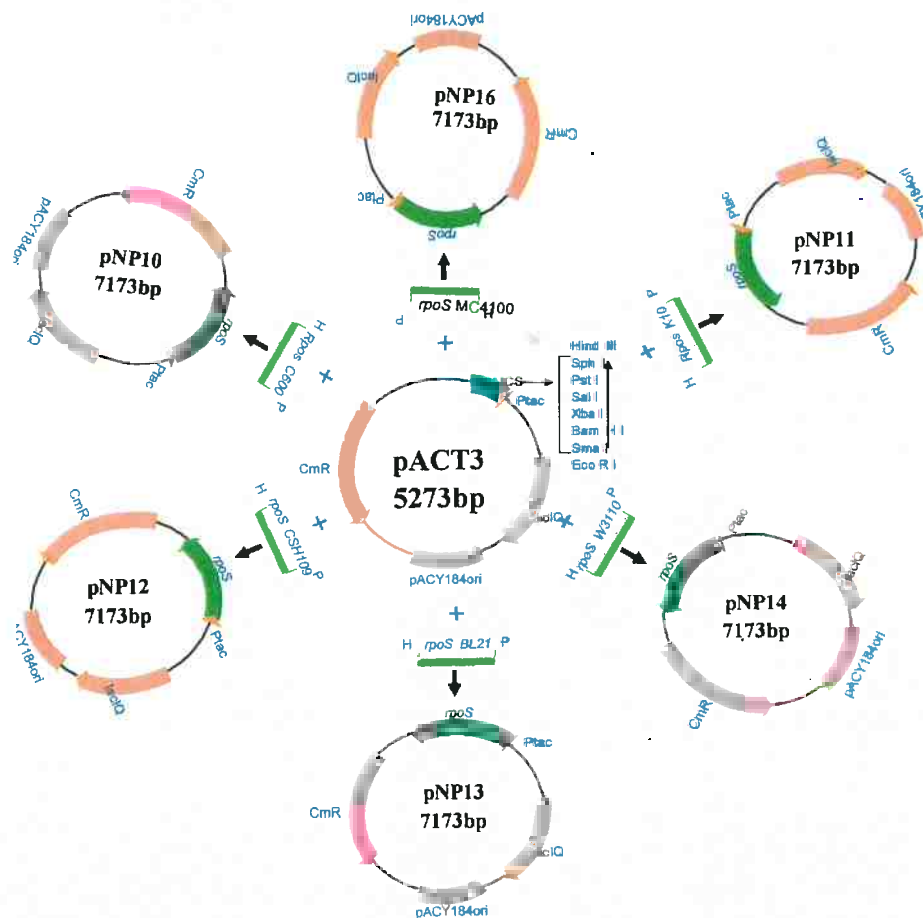


Figura 9 – Clonagem dos produtos de amplificação de *rpoS* provenientes de C600, K10, CSH109, BL21, W3110 e MC4100 em pACT3 dando origem aos plasmídios pNP10, pNP11, pNP12, pNP13, pNP14 e pNP16, respectivamente. H, sítio de restrição da enzima HindIII; P, sítio de restrição de PstI.

3.6.2 Clonagem de *phoA* em plasmídio de expressão

O fragmento obtido através da amplificação do gene *phoA* com os iniciadores *phoA110* e *phoABam* (Tabela 2), a partir do DNA genômico da cepa MG1655, foi digerido com as enzimas *Hind*III e *Bam*HI e ligado aos mesmos sítios no vetor pGB2 (Figura 10).

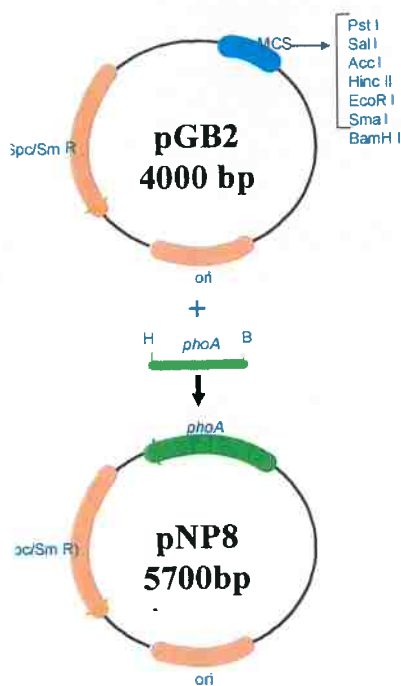


Figura 10 - Clonagem de *phoA* em pGB2. H, sítio de restrição da enzima *Hind*III; B, sítio de restrição de *Bam*HI.

3.6.3 Clonagem de *rpoS* de MG1655, C600 e K10 em plasmídios para expressão de σ^S com cauda de histidina

Os fragmentos obtidos através da amplificação de *rpoS* a partir do DNA genômico das cepas MG1655, C600 e K10, utilizando-se os iniciadores *rpoS Bam* e *rpoS –* foram digeridos com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Hind*III e ligados aos mesmos

sítios do plasmídio pPROEX htc, de maneira a obter o gene *rpoS* clonado em fase com a cauda de histidina do plasmídio (Figura 11).

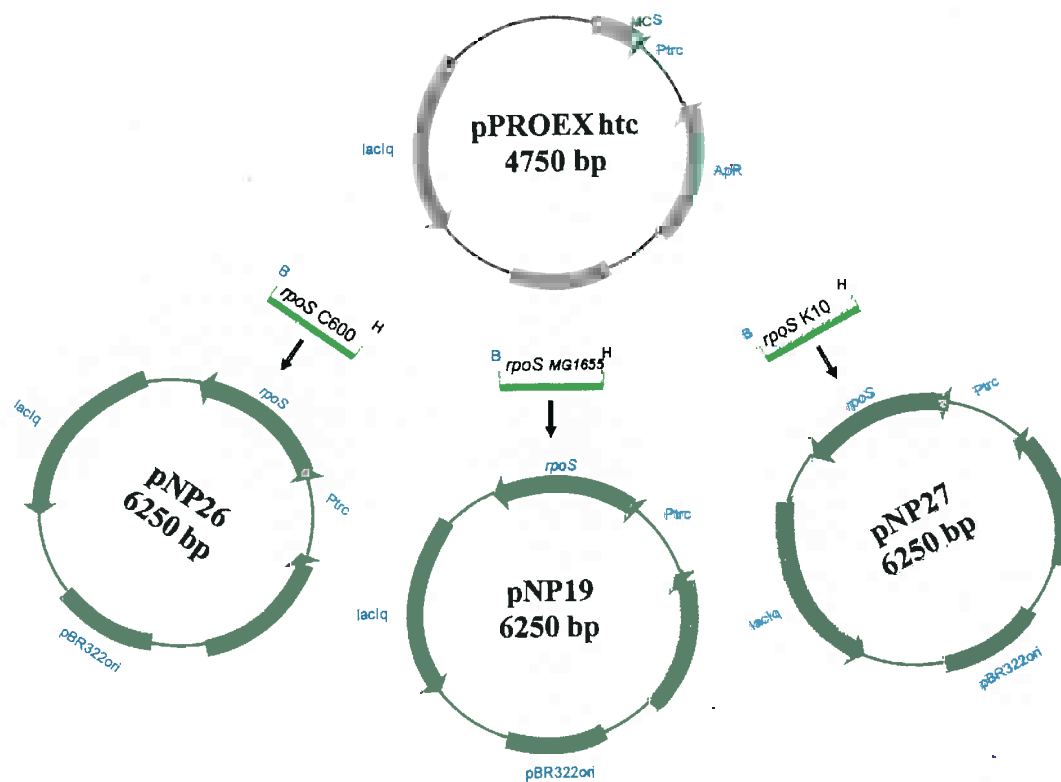


Figura 11 – Clonagem de *rpoS* das cepas MG1655, C600 e K10 em fase com cauda de histidina no plasmídio de expressão de proteínas pPROEX htc. B, sítio de restrição de enzima BamHI; H, sítio de restrição da enzima HindIII.

3.7 Ensaios quantitativos de Fosfatase Alcalina (FA)

3.7.1 Ensaio de bactérias cultivadas durante a noite

As bactérias foram cultivadas em meio A, utilizando-se dois tubos de ensaio para cada cepa, sendo que um deles foi suplementado com 1 mM de KH_2PO_4 e no outro

nada foi acrescentado a fim de se induzir carência de fosfato. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas e ressuspensas em uma solução de Tris 0,1 M pH8. A concentração de bactérias representada pela turbidez da cultura foi medida em espectrofotômetro, utilizando-se o comprimento de onda de 540 nm. 100 μ l de células foram adicionados a uma solução de p-NPP (p-nitrofenilfosfato) dissolvido em 1M Tris pH8, na concentração de 1mg/ml, e incubados a 37°C até a obtenção de coloração amarela. A reação foi então interrompida pela adição de 250 μ l de 1M Na_2HPO_4 . A absorbância foi medida em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 410 nm e a atividade enzimática da amostra foi obtida pela equação $A^{410} \cdot \text{Fd}/\text{min} \cdot \text{DO}^{540}$, onde Fd representa o fator de diluição das células, min é o tempo do ensaio em minutos e DO^{540} representa a concentração celular.

3.7.2 Ensaio de atividade de FA durante a entrada na fase de carência de Pi

As bactérias foram cultivadas em meio T-salts ou Meio A, suplementado com 1 mM de KH_2PO_4 até atingirem $\text{DO}^{540}=0,3-0,4$. Foram então centrifugadas e ressuspensas em meio T-salts suplementado com apenas 100 μM KH_2PO_4 ou meio A sem suplementação. O crescimento foi acompanhado e amostras foram retiradas a cada 30 minutos para leitura da turbidez da cultura (DO^{540}) e ensaio de FA, conforme descrito no item anterior.

3.8 Ensaio qualitativos de catalase

Para testar a atividade de catalase de forma qualitativa, 10 μ l de peróxido de Hidrogênio 3 % foram aplicados diretamente sobre a colônia de bactérias, observando-se a produção de efervescência. Alternativamente, 50 μ l de peróxido de Hidrogênio 3 % foram misturados com 50 μ l de uma cultura de bactérias líquida.

3.9 Ensaio de β -galactosidase

Bactérias foram cultivadas durante a noite em meio LB. As células foram permeabilizadas adicionando-se 50 μ l de 1% SDS e 100 μ l de clorofórmio para cada 100 μ l de células, aos quais foram então adicionados 900 μ L de tampão Z (16.1g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5.5g/L $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.75g/L KCl, 0.25g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.7 mL β -mercaptoetanol em pH 7), 200 μ l de ONPG (4mg/ml dissolvido em água) e 500 μ l de Na_2CO_3 1M para terminar a reação. A reação foi quantificada através de leitura em espectrofotômetro, no comprimento de onda 420 nm e a atividade enzimática da amostra foi obtida pela equação $A^{420} \cdot \text{Fd}/\text{min} \cdot \text{DO}^{540}$, onde Fd representa o fator de diluição das células, min é o tempo do ensaio em minutos e DO^{540} representa a concentração celular.

3.10 Extração de RNA

RNA foi extraído pelo “método de passo único” conforme descrito (Chomczynski e Sacchi, 1987). 20 ml de culturas de células foram cultivadas exponencialmente em meio A +Pi ou meio A -Pi por uma hora após indução de carência de Pi. As células foram centrifugadas e homogeneizadas em 2 ml de uma solução de RNAzol (50% fenol pH 4, 1,86 M guanidina tiocianato, 12 mM citrato de sódio, 87 mM acetato de sódio pH 4.0, 0,37% sarcosil e 42 mM β -mercaptoetanol). Ao homogenado foram então adicionados 400 μ l de clorofórmio e em seguida o extrato foi centrifugado por 15 minutos a 12.000 RPM. À fase aquosa contendo o RNA foi adicionado um volume de isopropanol e o precipitado foi centrifugado por 10 minutos a 12.000 RPM. O pellet obtido foi lavado com etanol 70% e ressuspensionado em 40 μ l de formamida. A concentração e a pureza do RNA foi medida pela absorbância da amostra nos comprimentos de onda 260 nm e 280 nm.

3.11 Preparação de sondas de DNA

Fragmentos de DNA correspondentes aos genes *phoA*, *phoE*, *ugpB*, *pstS*, *phoB* e *rpoS* foram obtidos por amplificação a partir do cromossomo de MG1655, utilizando-

se, respectivamente, os seguintes pares de iniciadores: *phoA110/phoABam*, *phoE818/phoE1118*, *ugpB1012/ugpB1462*, *pstS(+)/pstS(-)*, *phoB4821/phoB5240* e *rpoS(+)/rpoS(-)*. A sonda para *rpoD* foi preparada a partir de um fragmento de DNA obtido através da digestão do plasmídeo pRPOD com as enzimas BamHI e SacI. Para a síntese das sondas radioativas, 100 ng dos fragmentos de DNA foram incubados com $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP (Amersham Biosciences), 500 ng de hexâmeros aleatórios (Promega), 10 mM de uma mistura de dCTP, dGTP e dTTP, e o fragmento Klenow da DNA polimerase (Fermentas), por 4 horas, em temperatura ambiente. A reação foi terminada com 10 mM EDTA, e o produto da reação foi purificado utilizando-se o kit GFX (Amersham Biosciences).

3.12 Northern-blot

RNA foi extraído de bactérias jovens (de crescimento exponencial) cultivadas em meio abundante ou carente em Pi, conforme descrito acima. 20 μg de RNA de cada amostra foram resolvidos em gel desnaturante de agarose 1%, acrescido de 1X MOPS (MOPS 20mM, NaAc 5mM, EDTA 1mM), que é também o tampão de corrida, e 2,2 M formaldeído. Após a eletroforese, o gel foi transferido a uma membrana de nylon (Hybond-N, Amersham Biosciences) por capilaridade, utilizando-se uma solução de 10xSSC (NaCl 1,5M, Na-citrato 0,15M pH7,5). Após a transferência, o RNA foi fixado à membrana através de aquecimento a 80°C por 2 horas. As bandas de RNA ribossômico foram visualizadas com luz UV e suas posições marcadas na membrana. As sondas radioativas foram desnaturadas por 10 minutos a 100°C e hibridizadas com as membranas mergulhadas em solução de hibridização (HS-114F, Molecular Research Cloning) a 42°C por 15-20 horas. As membranas foram expostas a filmes de raios-X, em temperatura ambiente ou a -80°C com intensificadores, dependendo da intensidade da radiação medida na membrana. O tempo de exposição também variou de acordo com a intensidade de radiação. Os filmes foram revelados e fotografados.

3.13 Ensaio de Cloranfenicol Acetil Transferase (CAT)

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

As cepas contendo fusões *pst-cat* foram cultivadas durante a noite em meio A, suplementado ou não com 1 mM Pi. No dia seguinte, as culturas foram lavadas e concentradas 2X em Tris 0,1M pH 7,5 e em seguida sonicadas. Os sonicados foram centrifugados e seus sobrenadantes coletados. A quantidade de proteína foi determinada pelo método de Bradford (1976), utilizando BSA como padrão. 50 µl do extrato celular foram adicionados a 0,4 mg DTNB e 0,5 mM Acetil CoA em um volume final de 0,5 ml. A reação foi iniciada através da adição de Cloranfenicol (Cm) em concentração final de 0,2 mM. A atividade foi determinada através da medição em espectrofotômetro da taxa de aumento na absorbância em 412 nm como resultado da liberação de 5-tio-1-nitrobenzoato, em temperatura ambiente. A atividade foi calculada pela seguinte fórmula: **taxa de aumento de $A^{412} \times 1000 / 13,6 \times \text{mg Proteína}$** .

3.14 Mutações sítio-dirigidas de pBS11 e PNP8

As mutações sítio-dirigidas foram realizadas conforme descrito por Sambrook e Russel (2001). Para a substituição da citosina por uma timina na posição -13 de *pstS*, o plasmídeo pBS11 foi utilizado como molde para a reação de PCR com o par de oligonucleotídeos PBS11mut(+) e PBS11mut(-). Para a substituição da timina na posição -13 de *phoA* por uma citosina, o plasmídeo pNP8 foi utilizado como molde para a reação de PCR com o par de oligonucleotídeos phoAmut(+) e phoAmut(-).

Após a reação de PCR, os plasmídios amplificados foram digeridos com DpnI, que cliva seqüências GATC metiladas, de modo que apenas o DNA plasmidial sintetizado pela bactéria, que fora utilizado como molde para a reação de PCR foi

clivado. O produto da digestão foi então precipitado e eletroporado nas cepas MG1655 e BS16, no caso de pBS11, e JY16 e NP23, no caso de pNP8.

3.15 Purificação da proteína σ^S

As seqüências codificadoras de *rpoS* foram amplificadas a partir do DNA genômico das cepas MG1655, C600 e K10 e clonadas no plasmídio de expressão pPROEX htc (Invitrogen). Os plasmídios resultantes pNP19, pNP26 e pNP27 (ver Tabela 2 e Figura 11) foram eletroporados nas cepas BS16, NP3 e NP1, respectivamente, e cultivados durante a noite a 37°C. No dia seguinte, as culturas foram diluídas 100 vezes, e cultivadas até atingir a $DO^{540} \approx 0,5$. Neste momento, 1 mM IPTG foi acrescentado às culturas, e após 4 horas de indução, 50 ml de cultura foram centrifugados e submetidos à purificação utilizando-se o kit Pro-Bond (Invitrogen), conforme recomendado pelo fabricante.

3.16 Western-blot

As cepas de interesse foram cultivadas durante a noite em meio LB. No dia seguinte, as culturas foram diluídas 100 vezes no mesmo meio, e cultivadas até o início da fase estacionária. Amostras de 1 ml de cultura foram coletadas uma hora após a entrada em fase estacionária. As bactérias foram centrifugadas e ressuspensas em tampão de corrida (0,5 M Tris-HCl, 2% SDS, 5% 2-mercaptoetanol, 10% glicerol e 0,01% bromophenol blue) e fervidas por 10 minutos. O lisado de células foi então resolvido em gel de 12,5 % de acrilamida. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas a uma membrana de nitrocelulose (Protran, Perkin-Elmer Life Sciences) por capilaridade. A membrana foi submetida a ensaio de imuno-deteção com o soro anti- σ^S (Neoclone) diluído 1000 vezes e soro anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Pierce) diluído 5000 vezes. Para deteção do complexo, foi utilizado o kit de deteção Super Signal West Pico (Pierce) conforme recomendado pelo fabricante. A membrana foi exposta a filmes de raios-X por diversos períodos de tempo.

3.17 Southern-blot

10 µg de DNA genômico das cepas MG1655, C600 e K10 foram digeridos com as enzimas Nsil e HindIII, e separadamente com KpnI. As digestões foram resolvidas em gel de agarose 1%. Após a eletroforese, o gel foi incubado em 0,125M HCl por 20 min para depurinação. Em seguida o gel foi incubado em tampão de desnaturação (87,66g NaCl; 20g NaOH em 1 litro de H₂O) por 30 minutos. Após a desnaturação, seguiu-se nova incubação por 30 min em tampão de neutralização (87,66g NaCl ,60,5g Tris em 1 litro de H₂O) e o DNA foi transferido para uma membrana de nylon (Hybond-N, Amersham Biosciences) por capilaridade. As membranas foram hibridizadas com uma sonda radioativa correspondente a *rpoS* por 18 h em tampão de hibridização (HS-114F, Molecular Research Company), lavadas e expostas a filmes de raios-X.

3.18 Ensaio de competição

Para os ensaios de competição foram utilizadas as cepas NP36 (MG1655 Δ /*lac*-169::Tn5) e NP136 (MG1655 *rpoS*Am *zfi*::Tn10). As cepas foram cultivadas em meio A, acrescido ou não de 1 mM KH₂PO₄, por 10 dias. Amostras das culturas foram retiradas diariamente, submetidas a diluições seriadas e semeadas em placas de meio LB acrescido de tetraciclina (15 mg/ml) ou canamicina (50 mg/ml). A cada dia, as unidades formadoras de colônia foram contadas e foram realizados ensaios qualitativos de catalase para confirmar o fenótipo das cepas originais.

4 RESULTADOS

4.1 Efeito de σ^S sobre o regulon PHO

4.1.1 Efeito de σ^S sobre FA

Experimentos preliminares em nosso laboratório haviam demonstrado uma possível correlação entre a atividade da FA e a presença do fator σ^S . Com o intuito de investigar mais a fundo a relação entre σ^S e a expressão dos genes do regulon PHO, foram realizados inicialmente ensaios de FA em culturas de bactérias da cepa selvagem MG1655, seu mutante isogênico *rpoS*::Tn10 (BS16) e respectivos transformantes contendo os plasmídios pNP1 (*rpoS*⁺ sob controle de *P_{tac}*) e pMRG7 (*rpoD*⁺ sob controle de *P_{tac}*). As bactérias foram cultivadas durante a noite em meio A acrescido de 1 mM KH₂PO₄ (+Pi) e meio A sem suplementação (-Pi), para induzir a carência de Pi. Conforme esperado, as células cultivadas em meio A com baixa concentração de Pi expressaram altos níveis de FA (Figura 12), enquanto as células cultivadas em excesso de Pi apresentaram apenas atividade basal da enzima com valores máximos de apenas 0,015 unidades enzimáticas.

A mutação *rpoS*::Tn10 (barra b) causou um aumento de 3 vezes na atividade de FA quando comparada com a cepa selvagem (barra a), indicando que a presença de uma única cópia do gene *rpoS* afeta negativamente a expressão de FA. Quando *rpoS* é super-expresso através do plasmídio pNP1, tanto na cepa selvagem (barra c), como na mutante *rpoS*::Tn10 (barra d), a atividade de FA diminui para um nível situado abaixo da atividade observada para a cepa selvagem, indicando que o excesso de σ^S inibiu a atividade de FA. A introdução do plasmídio pMRG7, que super expressa o gene *rpoD*, aumenta a atividade de FA em 3,7 vezes quando comparado com a cepa selvagem (compare barras e e a) e em 1,5 vez quando comparado com a cepa mutante *rpoS* (compare barras f e b).

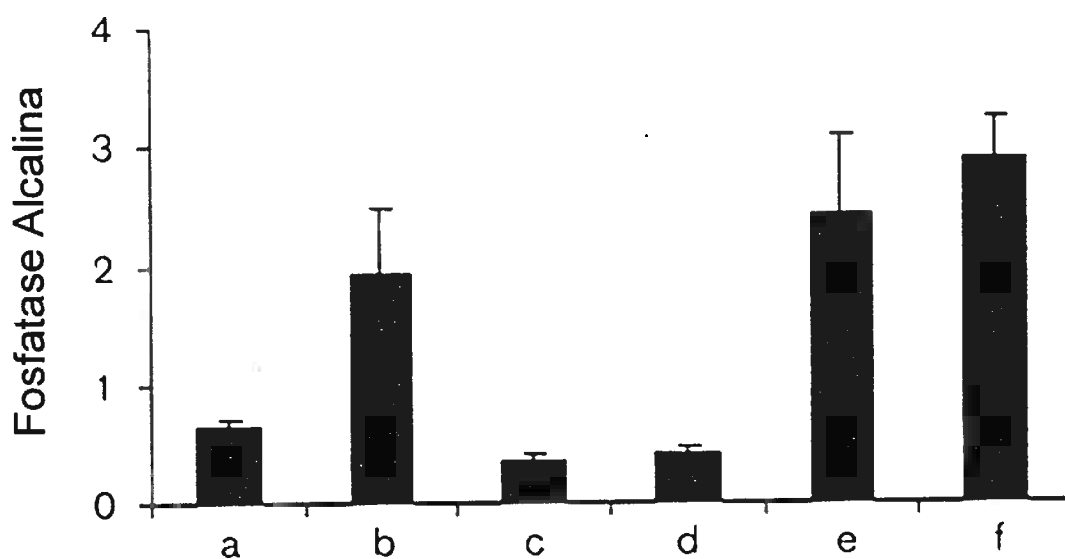


Figura 12 – Efeito de σ^S sobre FA em células cultivadas em meio A -Pi. a- MG1655, b- BS16 (MG1655 *rpoS::tn10*), c- pNP1(*prpoS*⁺) transformado em MG1655, d- pNP1 transformado em BS16, e- pMRG7 (*prpoD*⁺) transformado em MG1655, f- pMRG7 transformado em BS16. As barras representam média e desvio padrão de 3 ensaios. As cepas contendo plasmídios foram cultivadas na presença de 0,1 mM IPTG e dos respectivos antibióticos.

A expressão elevada de FA na presença de pMRG7 confirma que os genes de PHO são transcritos por $E\sigma^D$ (Makino et al, 1988). A repressão da atividade de FA causada pelo excesso de σ^S e a atividade elevada de FA observada na ausência deste fator sigma sugerem que há uma competição entre os fatores σ^S e σ^D pela ligação ao cerne da RNA polimerase, com prejuízo para *phoA*, que na presença de σ^S estaria sendo transcrito de forma sub-ótima. Este tipo de regulação via competição entre fatores sigma foi proposto anteriormente para outros genes (Zhou et al, 1992, Jishage e Ishihama, 1999, Maeda et al, 2000).

A concentração de σ^S aumenta progressivamente durante a entrada em fase estacionária ou de carência de nutrientes (Gentry et al, 1993, Hengge-Aronis, 1993, Lange e Hengge-Aronis, 1994). Para testar em que momento da fase de carência de Pi, σ^S começa a exercer seu papel repressor, foram realizados ensaios de FA durante o início da fase de carência de Pi. Culturas em fase exponencial das cepas MG1655 e seu mutante *rpoS::Tn10* (BS16), transformado ou não com o plasmídio pNP5 (*rpoS*⁺ clonado no vetor de poucas cópias pACT3, sob *P_{tac}* e controle do alelo

lacI^q, que super-expressa o repressor LacI, mantendo assim um forte controle sobre a atividade de *P_{tac}* na ausência do indutor IPTG) foram ressuspendidas em meio A - Pi, e tiveram sua atividade de FA monitorada durante 6 horas.

Todas as cepas entraram na fase de carência de Pi entre 30 e 60 minutos (Figura 13). A atividade de FA da cepa selvagem atingiu seu pico máximo aos 90 minutos (Figura 13, ♦). No caso do mutante *rpoS::Tn10* (Figura 13, ■), a atividade de FA continuou aumentando no decorrer do experimento, atingindo seu valor mais alto aos 240 minutos, chegando a ser 3 vezes maior do que a atividade da cepa selvagem. Estes resultados indicam que na cepa selvagem, aos 90 minutos a concentração de σ^S na célula já era suficiente para reprimir FA.

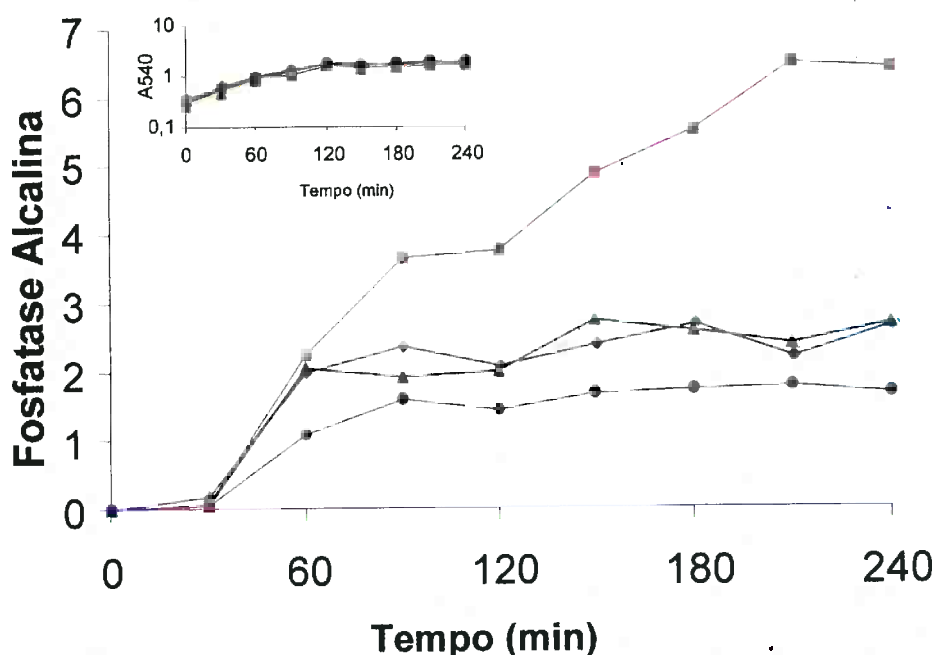


Figura 13 – Efeito repressor de σ^S sobre FA durante a fase inicial de carência de Pi. MG1655 (♦), BS16 (MG1655 *rpoS::Tn10*) (■), pNP5 (*rpoS*⁺ em BS16 sem adição de IPTG) (▲), pNP5 em BS16 com 0,1 mM IPTG (●). Culturas de fase exponencial foram ressuspendidas em meio A - Pi e monitoradas em relação ao crescimento (inserto) e atividade de FA.

O transformante contendo pNP5 demonstra uma atividade de FA similar à da cepa selvagem na ausência de IPTG (Figura 13, ▲), indicando que mesmo a presença de

lacI^q não impediu a expressão de *rpoS* a partir do promotor *tac*, e seu efeito repressor sobre FA. A adição de IPTG, contudo, causou um aumento no nível de expressão de *rpoS*, que inibiu fortemente a atividade de FA desde o início da fase de carência de Pi aos 60 min.

4.1.2 Efeito de σ^S sobre FA em células não carentes de Pi

O próximo passo foi testar o efeito repressor de σ^S em células cultivadas em meio complexo, abundante em Pi. Esperávamos assim observar o efeito de σ^S sobre FA em condições não estressantes, sem a influência da carência de Pi. Para isso, a mutação *rpoS*::Tn10 foi introduzida na cepa BS7 (MG1655 Δ *pst*SCABU), dando origem à cepa NP34. É importante lembrar que a deleção do operon *pst* causa a síntese constitutiva de todos os genes do regulon PHO, independentemente da concentração de Pi no meio de cultivo (Wanner, 1996).

As cepas BS7 e NP34 foram cultivadas em meio LB, e monitoradas em relação ao crescimento (Figura 14a, inserto), atividade de FA (Figura 14a) e catalase (Figura 14b). A síntese de catalase (enzima codificada pelo gene *katE*) é dependente exclusivamente de σ^S (Schellhorn et al, 1998), e serve como indicador indireto da atividade de σ^S .

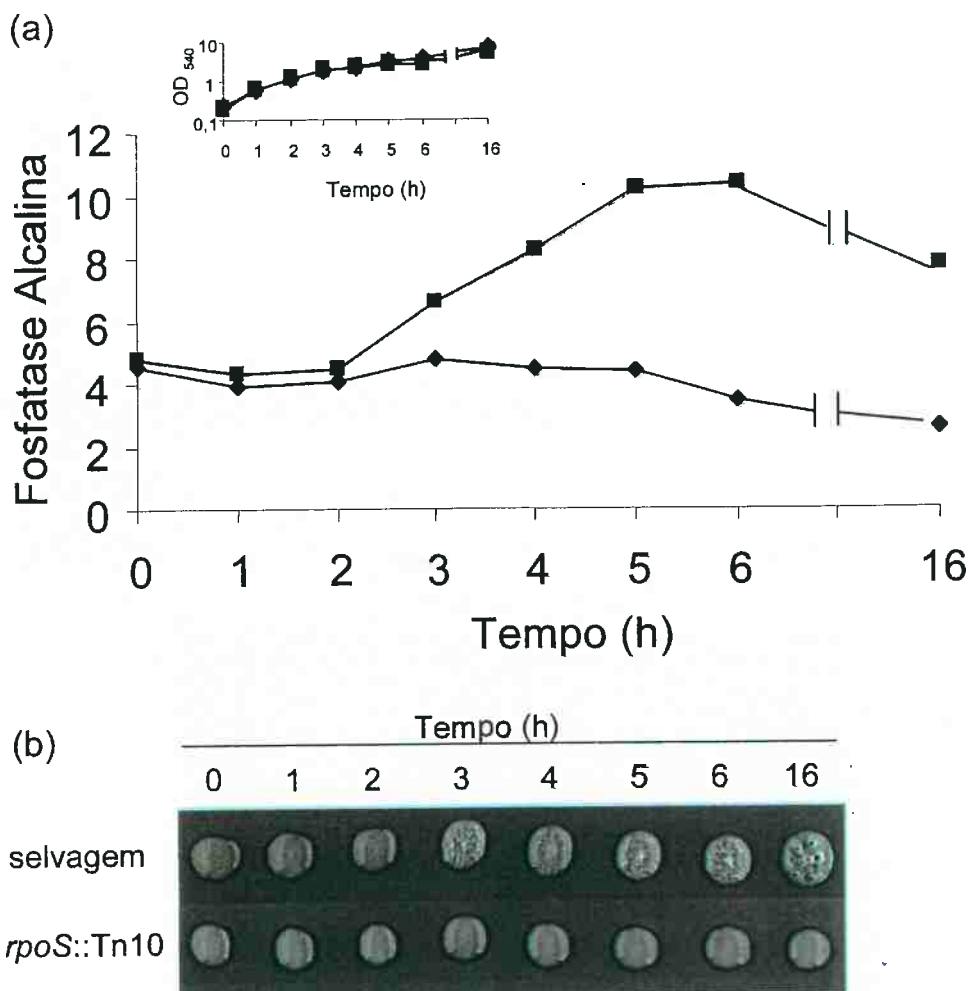


Figura 14 – Efeito de σ^S sobre cepas constitutivas para PHO em meio rico. Culturas exponenciais das cepas BS17 (Δpst , \blacklozenge) e NP34 ($\Delta pst rpoS::Tn10$, \blacksquare) foram cultivadas em meio LB e monitoradas em relação ao crescimento (inserto), atividade de FA (a) e atividade de catalase (b), observada pela presença de efervescência.

O inserto da Figura 14a mostra que o ritmo de crescimento das células diminuiu consideravelmente após 120 minutos, indicando a entrada na fase estacionária. A Figura 14b mostra a efervescência da cepa selvagem a partir da terceira hora, indicando a atividade de catalase e o acúmulo de σ^S na célula. Durante as 2 horas iniciais, enquanto as bactérias ainda cresciam exponencialmente, o nível de FA das duas cepas era similar. A partir da terceira hora, no entanto, a atividade de FA da cepa BS17 (Δpst) foi gradualmente reprimida, enquanto a atividade de FA de NP34 ($\Delta pst rpoS::Tn10$) continuou aumentando (Figura 14a). Observa-se um leve declínio da atividade de FA de ambas as cepas no final do experimento, que se deve principalmente ao aumento da densidade ótica das células (mas não

necessariamente a um aumento da concentração de células viáveis) em fase estacionária avançada.

Assim como com células carentes de Pi, na ausência do fator σ^S há mais cerne de RNA polimerase disponível para a ligação com σ^D . A partir do momento em que a célula entra na fase estacionária, σ^S se acumula e a atividade de FA é reduzida. Estes resultados demonstram que o efeito repressor de σ^S ocorre sempre que o nível deste fator sigma na célula aumenta significativamente, independente da concentração externa de Pi e sugerem novamente que a competição entre σ^S e σ^D pelo cerne é responsável por este efeito.

4.1.3 Efeito de σ^S sobre a transcrição dos genes de PHO

Para testar se o efeito de σ^S sobre FA ocorre ao nível de transcrição de *phoA*, e se outros genes de PHO são igualmente afetados, realizamos ensaios de northern-blot. Sondas de DNA específicas para os genes *phoA*, *phoE*, *ugpB*, *pstS* e *phoB* foram hibridizadas com RNA extraído das cepas MG1655, BS16 (MG1655 *rpoS*::Tn10) e do transformante pNP1 (*prpoS*⁺) introduzido em BS16 cultivados em carência e excesso de Pi. Os resultados estão expostos na Figura 15.

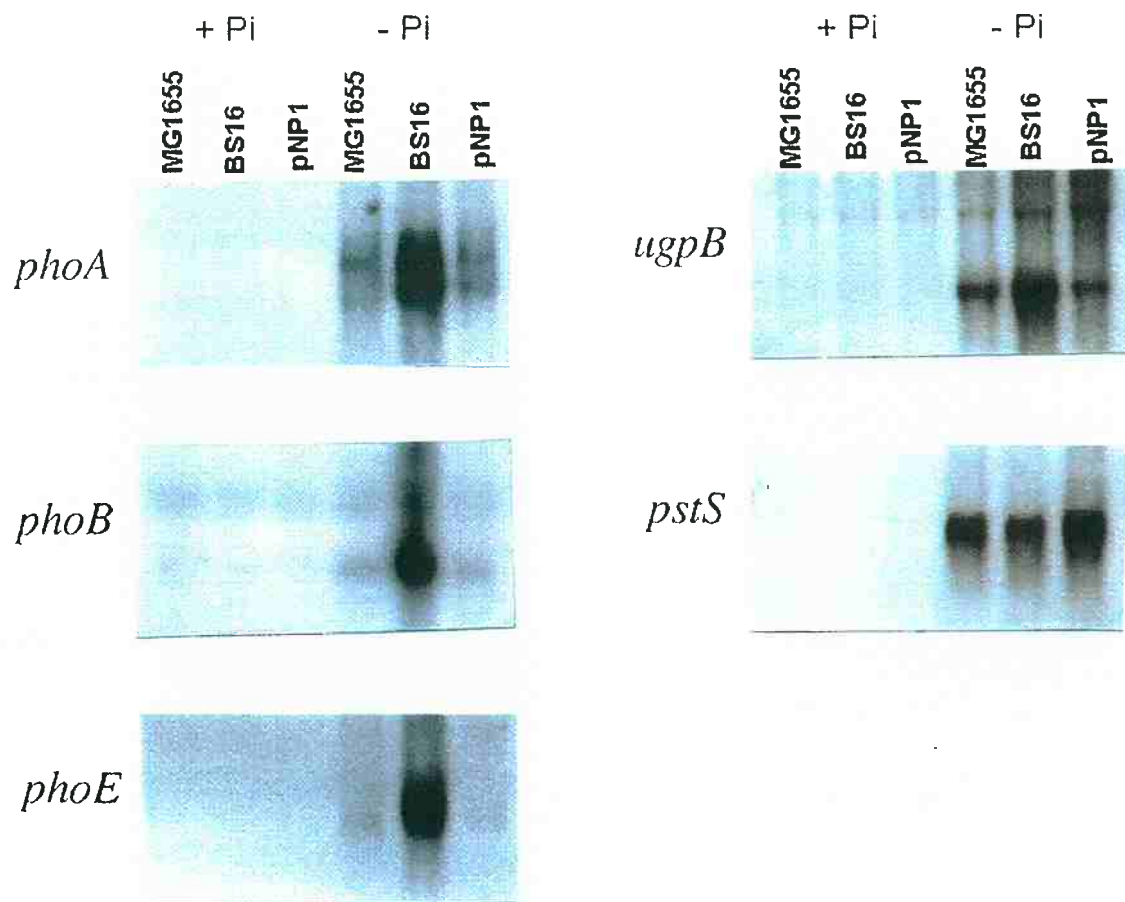


Figura 15 – Efeito de σ^S sobre o nível de mRNA de *phoA*, *phoE*, *ugpB*, *pstS* e *phoB*. Células das cepas MG1655, BS16 (MG1655 *rpoS*::Tn10) e pNP1 (*rpoS*⁺ sob *P_{tac}*) transformado em BS16, cultivadas exponencialmente em meio A +Pi foram ressuspensas em meio A -Pi e cultivadas até a entrada da fase de carência de Pi. O RNA total de bactérias carentes e não carentes de Pi foi extraído e hibridizado com sondas radioativas de DNA específicas para cada um dos genes acima citados. Posteriormente, as sondas radioativas foram removidas das membranas e estas foram hibridizadas com uma sonda de DNA referente ao gene de expressão constitutiva *rpoD* para certificar de que quantidades iguais de mRNA total foram aplicadas nas canaletas do gel (dados não apresentados).

O sinal radioativo de bactérias cultivadas em excesso de Pi foi muito baixo ou indetectável, conforme esperado, já que nestas condições o regulon PHO não se encontra induzido. Já nas células carentes de Pi, observa-se um sinal de hibridização muito mais forte no mutante *rpos* (BS16), e uma redução do sinal para um nível ainda menor do que a cepa selvagem no transformante que super-expressa *rpoS* (pNP1). Este efeito pode ser observado para todos os genes com exceção de *pstS*. Diferente dos demais, *pstS* não foi reprimido por σ^S , mas ao contrário, o sinal

de hibridização da sonda *pstS* com o RNA do mutante *rpoS*::Tn10 (BS16) foi mais fraco do que com o da cepa selvagem, enquanto que a hibridização com o RNA do transformante pNP1 foi ligeiramente mais forte. Estes resultados indicam que σ^S inibe a transcrição de *phoA*, *phoE*, *ugpB* e *phoB*, e estimula moderadamente a transcrição de *pstS*.

4.2 Transcrição de *pstS* via σ^S

4.2.1 O papel da citosina na posição -13 de *pstS*

As seqüências -10 de todos os promotores de genes de PHO conhecidos estão representadas na Figura 3 (Introdução). As seqüências promotoras de *phoA*, *phoE*, *phnC*, *psiE* e *ugpB* possuem uma timina na posição -13, *phoH* possui uma adenina e *phoB*, uma guanina. Apenas *pstS* possui uma citosina na posição -13.

A presença de uma citosina na posição -13 foi descrita por diversos autores como um elemento importante para o reconhecimento do sítio promotor pelo fator σ^S (Espinosa-Urgel et al, 1996, Bordes et al, 2000, Gaal et al, 2001, Becker e Hengge-Aronis, 2001, Lee e Gralla, 2001). É possível, portanto, que a citosina -13 de *pstS* esteja permitindo seu reconhecimento por σ^S . Isto explicaria porque o nível de mRNA de *pstS* é reduzido no mutante *rpoS*::Tn10 (BS16), e porque sua transcrição parece ser estimulada pela super-expressão de *rpoS* (pNP1), ao contrário dos demais genes de PHO. Desta forma, *pstS* seria transcrito principalmente por $E\sigma^D$, mas também em menor proporção por $E\sigma^S$.

Para testar esta hipótese, o promotor de *pstS*, que coordena a transcrição de todo o operon *pst* (Aguena et al, 2002), foi clonado no plasmídio pKK232-8, gerando uma fusão com o gene repórter *cat*, que resultou no plasmídio pBS11 (Tabela 1). Em seguida, a citosina -13 no promotor de *pstS* foi substituída por uma timina através de mutação sítio-dirigida, dando origem ao plasmídio pNP6 (Tabela 1). Ambos os plasmídios foram transformados na cepa selvagem MG1655 e seu mutante

isogênico *rpoS*::Tn10 (BS16). Os transformantes foram cultivados em meio A -Pi e monitorados em relação às atividades de FA e CAT (Figura 16). Para enfatizar o efeito da transição C→T sobre a atividade do promotor de *pstS*, os resultados estão representados como a razão entre a atividade enzimática do mutante *rpoS*::Tn10 dividida pela atividade enzimática da cepa selvagem.

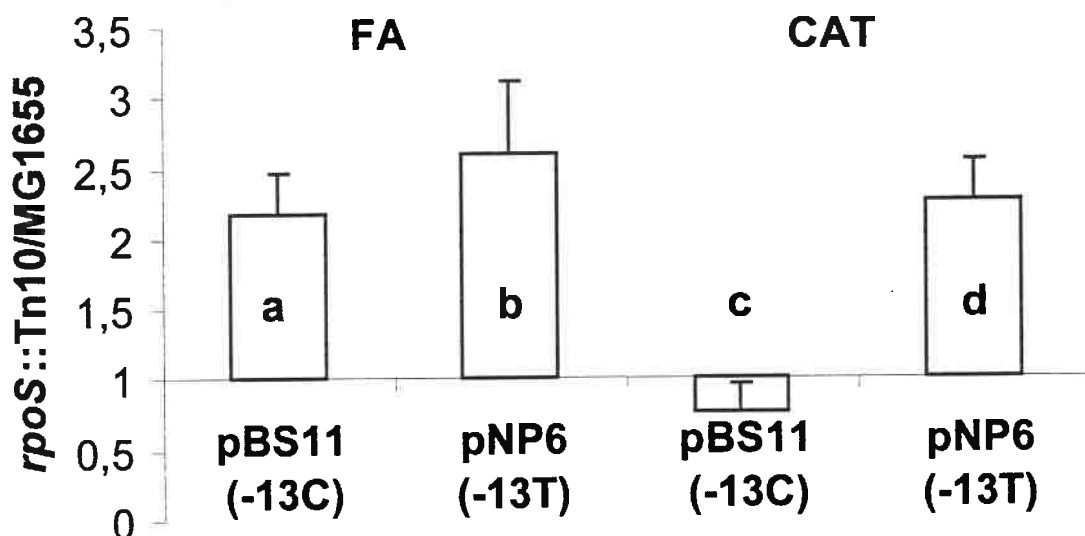


Figura 16 – Efeito de σ^S sobre atividade de FA e CAT em cepas carregando plasmídios contendo um resíduo de citosina ou de timina na posição -13 do promotor de *pstS*. Os transformantes foram cultivados durante a noite em Meio A -Pi. As barras representam a razão entre a atividade da enzima no mutante *rpoS*::Tn10 (BS16) e na cepa selvagem (MG1655) .

A atividade de FA do mutante *rpoS*::Tn10 foi 2 a 2,5 vezes maior do que aquela observada para a cepa selvagem (barras a e b), confirmando o efeito positivo do nocauteamento de *rpoS* sobre a expressão de FA. Já a atividade de CAT a partir de pBS11 (promotor de *pstS* selvagem) foi 25% menor no mutante *rpoS*::Tn10 quando comparado com a cepa selvagem, corroborando o resultado do ensaio de northern-blot, no qual foi observado um menor nível de mRNA de *pstS* no mutante *rpoS*::Tn10 (Figura 15). Por outro lado, a atividade de CAT produzida a partir do plasmídio pNP6, no qual a citosina -13 foi substituída por uma timina, foi mais de 2 vezes maior no mutante *rpoS*::Tn10 do que na cepa selvagem (barra d).

Portanto, a transição C→T inserida na posição -13 do promotor de *pstS* resultou em um promotor que passou a comportar-se de forma similar aos promotores de *phoA*, *phoE*, *ugpB* e *phoB*, que são reprimidos por σ^S . Este resultado também indica que -13C é fundamental para o reconhecimento do promotor de *pstS* por σ^S .

4.2.2 O efeito da transição T→C na posição -13 de *phoA*

O passo seguinte foi testar se o inverso também é válido, ou seja, se a troca da timina na posição -13 de um promotor de PHO por uma citosina resultaria em sua transcrição pela holoenzima $E\sigma^S$. Para testar esta possibilidade, o gene *phoA* foi clonado juntamente com sua região regulatória no vetor de poucas cópias pGB2, dando origem ao plasmídio pNP8 (Tabela 1). A timina presente na posição -13 da região promotora de *phoA* foi substituída por uma citosina, através de mutação sítio dirigida, resultando no plasmídio pNP9 (Tabela 1). Os plasmídios foram transformados nas cepas JY16 (*phoA*⁻) e NP23 (*phoA*⁻ *rpoS*::Tn10), e ensaios de atividade de FA foram realizados.

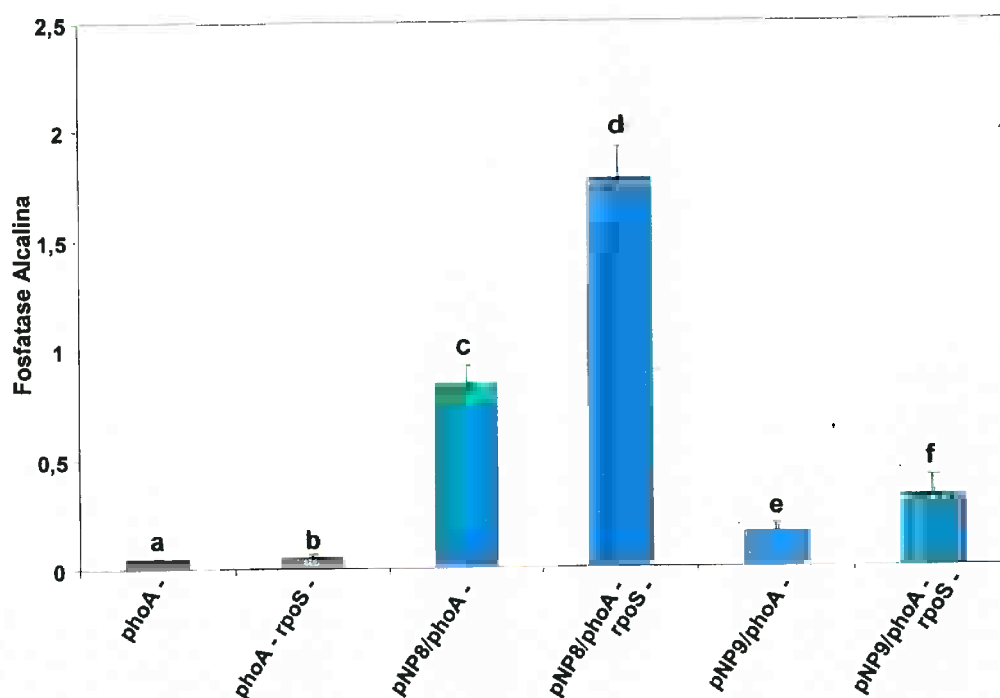


Figura 17 – Efeito de σ^S sobre a atividade de FA produzida a partir de plasmídios carregando a mutação -13T→C no promotor de *phoA*. As cepas foram cultivadas durante a noite em meio A -Pi. a- JY16 (*phoA*⁻), b- NP23 (*phoA*⁻ *rpoS*::Tn10), c- pNP8 (*phoA*⁺ -13T) transformado em JY16, d- pNP8

transformado em NP23, e- pNP9 (*phoA*⁺ -13C) transformado em JY16, f- pNP9 transformado em NP23. As barras representam as médias e desvios padrão de 3 ensaios.

A Figura 17 mostra que o plasmídeo pNP8 (barras c e d), que carrega o gene *phoA* selvagem, complementou totalmente a mutação das cepas parentais JY16 e NP23 (barras a e b), restituindo a atividade de FA. Assim como observado com *phoA* cromossômico (Figura 12), o mutante *rpoS*::Tn10 transformado com pNP8 apresentou uma atividade de FA 2 vezes maior que a do transformante selvagem. Esta relação entre a cepa selvagem e o mutante *rpoS*::Tn10 não mudou mesmo quando estas foram transformadas com pNP9 (C na posição -13 de *phoA*), ou seja, na ausência de *rpoS*, a atividade de FA continuou elevada em relação à cepa selvagem (compare as barras e e f).

Entretanto, o nível de atividade de ambas as cepas foi bastante reduzido, provavelmente porque a presença de uma citosina na posição -13, além de não ser suficiente para promover a transcrição pelo fator σ^S , acabou repelindo a holoenzima $E\sigma^D$, diminuindo o nível de transcrição de *phoA* (Lee e Gralla, 2001, Hengge-Aronis, 2002). Este resultado sugere que deve haver algum outro elemento necessário para o reconhecimento do promotor de *pstS* pelo fator σ^S . Este elemento poderia ser a presença de um sítio de ligação para a proteína IHF, presente na região promotora de *pstS*, mas não nos demais genes de PHO (Spira e Yagil 1999).

4.2.3 O papel da proteína IHF

Para testar o possível envolvimento de IHF na transcrição de *pstS* mediada por σ^S , um mutante *ihfB* (RW1370), sua cepa parental *ihf*⁺ (RW1369), e os mutantes *rpoS*::Tn10 isogênicos NP108 (RW1370 *rpoS*::Tn10) e NP69A (RW1369 *rpoS*::Tn10), foram transformados com o plasmídeo pBS11 (promotor de *pstS* selvagem em fusão com o gene repórter *cat*), e ensaiados para a atividade de CAT.

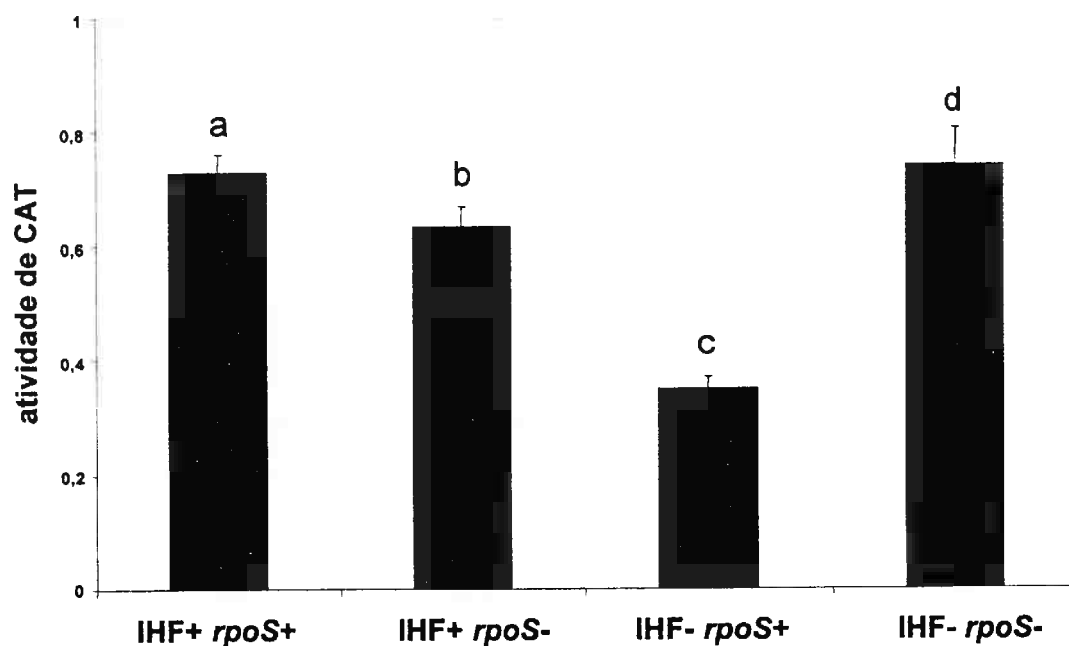


Figura 18 – Efeito de IHF e σ^S sobre a expressão de *pstS*. As cepas foram cultivadas durante a noite em Meio A -Pi. a- pBS11 (promotor selvagem de *pstS* (-13C) em fusão com o gene repórter *cat*) transformado na cepa RW1369 (*ihf*⁺) b- pBS11 em NP108 (RW1369 *rpoS*::Tn10), c- pBS11 em RW1370 (*ihfB*), d- pBS11 em NP69A (RW1370 *rpoS*::Tn10). As barras representam as médias e desvios padrão de 3 ensaios.

Nas cepas IHF⁺, a mutação *rpoS*::Tn10 (barra b) inibiu moderadamente a atividade de *pstS* (barra a), confirmando resultados anteriores (Figuras 15 e 16). Nas cepas IHF⁻, no entanto, a mutação *rpoS*::Tn10 causou um aumento significativo da expressão de *pstS*, indicando que, assim como ocorreu com a transição -13C→T no promotor de *pstS* (Figura 16), *pstS* passou a ser reprimido por σ^S , conforme observado para os demais genes de PHO. Além disso, a ausência de IHF causou uma diminuição no nível de expressão de *pstS* somente na cepa *rpoS*⁺ (compare as barras a e c), sugerindo que IHF contribui para o reconhecimento do promotor de *pstS* por σ^S .

Podemos concluir, portanto, que para que o promotor de *pstS* possa ser reconhecido por $E\sigma^S$, são necessários uma citosina na posição -13 e também um sítio de ligação a IHF.

4.3 Polimorfismo de *rpoS*

Um outro aspecto abordado neste trabalho foi o polimorfismo de *rpoS* entre cepas de *E. coli* K-12 e sua possível relação com a expressão de PHO. *rpoS* é descrito como um gene altamente polimórfico, e que acumula mutações facilmente (Ivanova et al, 2002, Zambrano et al, 2003).

Ensaio preliminares realizados em nosso laboratório determinaram que o nível de atividade de FA varia entre diferentes cepas de *E. coli* K-12. Uma vez que σ^S afeta a expressão de FA, seria, portanto, possível que as variações encontradas nos níveis de FA estivessem relacionadas ao tipo de alelo de *rpoS* presente. Para determinar a viabilidade desta hipótese, foi realizada a caracterização de *rpoS* de diversas cepas de *E. coli* K-12, entre elas, a cepa padrão deste trabalho, MG1655, além de MC4100, C600, K10, CSH109, W3110 e BL21, uma *E. coli* B, amplamente utilizada.

4.3.1 Efeito dos diferentes alelos *rpoS* sobre a atividade de FA

Foram obtidos, através de transdução, mutantes *rpoS*::Tn10 para cada uma das cepas, e realizados ensaios de FA para cada uma das cepas selvagens e seus mutantes *rpoS*::Tn10.

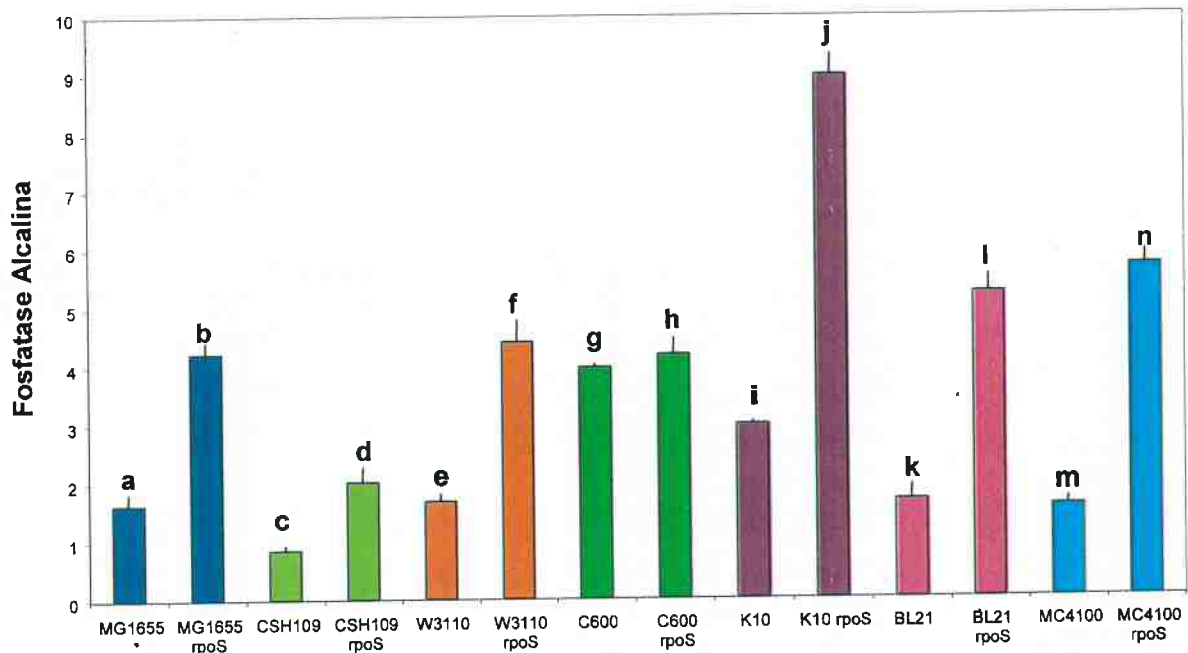


Figura 19 – Atividade de FA nas cepas MG1655, CSH109, W3110, C600, K10, BL21 e MC4100 e em seus respectivos mutantes *rpoS*::Tn10. Bactérias foram cultivadas durante a noite em Meio A - Pi. As barras representam a média e desvio padrão de 3 ensaios.

Com exceção da cepa C600, a atividade de FA de todas as cepas testadas (MG1655, CSH109, W3110, BL21, MC4100 e K10) foi significativamente aumentada na ausência de σ^S . Outro aspecto que chama a atenção é o alto nível de atividade de FA apresentado pela cepa K10 (barra i), que aumenta ainda mais na ausência de *rpoS* (barra j), sobressaindo sobre as demais cepas.

Para testar se o alelo *rpoS*⁺ de uma cepa é capaz de complementar a mutação *rpoS*::Tn10 de outra cepa, os alelos *rpoS* de cada uma das cepas foram clonados sob o promotor *tac* do plasmídio de poucas cópias pACT3 (Figura 9, Material e Métodos), dando origem aos plasmídios pNP10 (*rpoS*⁺ de C600), pNP11 (*rpoS*⁺ de K10), pNP12 (*rpoS*⁺ de CSH109), pNP13 (*rpoS*⁺ de BL21), pNP14 (*rpoS*⁺ de W3110)

e pNP16 (*rpoS*⁺ de MC4100). As construções, juntamente com o plasmídio pNP5 (*rpoS*⁺ de MG1655, Figura 8), foram individualmente transformadas em cada uma das cepas selvagens e em seus respectivos mutantes *rpoS*::Tn10. A Figura 20 mostra o resultado de ensaios de atividade de FA da cepa MG1655, seu mutante *rpoS*::Tn10 (BS16) e seus respectivos transformantes contendo cada uma das construções plasmidiais dos diversos alelos de *rpoS*, cultivadas durante a noite, com 0,1 mM IPTG.

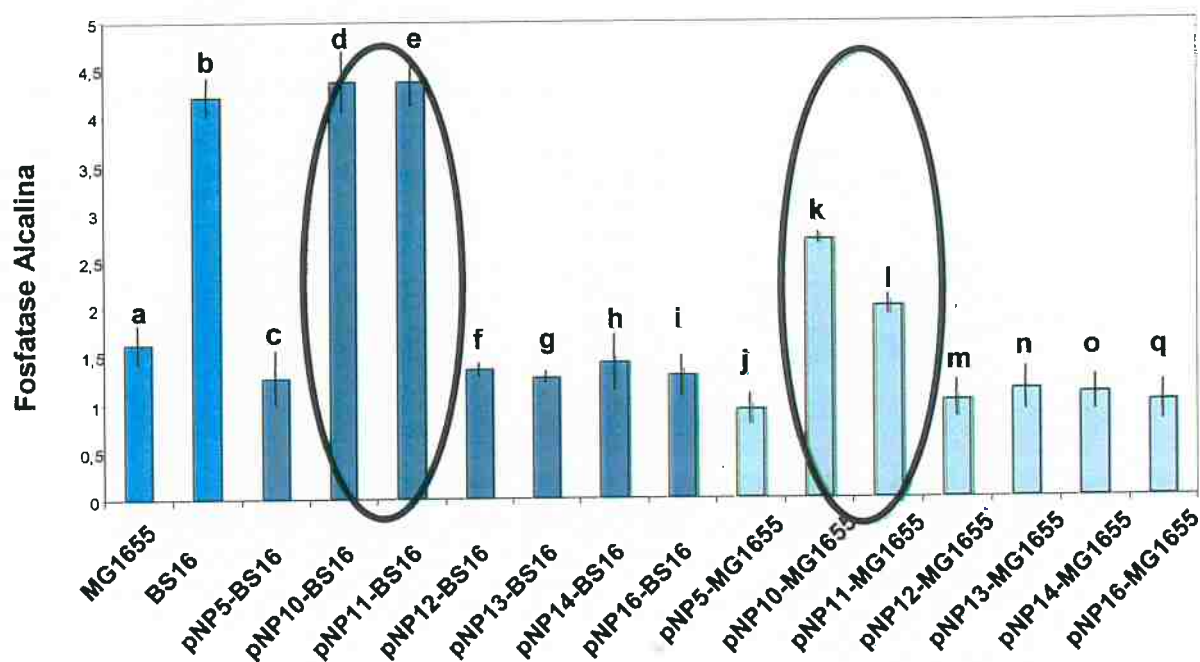


Figura 20 – Efeito dos diferentes alelos de *rpoS* sobre a atividade de FA da cepa MG1655 e seu mutante isogênico *rpoS*::Tn10 (BS16). pNP5 -*rpoS*⁺ de MG1655, pNP10 - *rpoS*⁺ de C600, pNP11-*rpoS*⁺ de K10, pNP12- *rpoS*⁺ de CSH109, pNP13- *rpoS*⁺ de BL21, pNP14- *rpoS*⁺ de W3110, pNP16-*rpoS*⁺ de MC4100. Bactérias foram cultivadas durante a noite em Meio A –Pi. 0,1 mM IPTG foi acrescentado às cepas transformadas com plasmídios. As barras representam as médias e desvios padrão de 3 ensaios.

Todos os plasmídios, com exceção de pNP10 (*rpoS*⁺ de C600) e pNP11 (*rpoS*⁺ de K10), foram capazes de complementar a mutação *rpoS*::Tn10 da cepa BS16, restaurando o nível normal de atividade de FA da cepa selvagem MG1655 (compare as barras c,f,g,h e i com a barra a). Estes resultados confirmam o efeito repressor de *rpoS* das cepas CSH109, W3110, BL21, MC4100 e MG1655 sobre FA. Os alelos *rpoS* de C600 e K10, no entanto, não complementaram a mutação *rpoS*::Tn10, pois

a atividade de FA dos transformantes pNP10 e pNP11 em BS16 permaneceu alta (compare as barras **d** e **e**, em destaque, com **a** e **b**). Para testar o efeito que teria a super expressão de *rpoS*⁺ na cepa MG1655 sobre a atividade de FA, cada um dos plasmídios foi transformado em MG1655 e a atividade de FA foi medida. Novamente, com exceção de C600 e K10, todos os alelos *rpoS*⁺ reprimiram parcialmente a atividade de FA (compare as barras **j**, **m**, **n**, **o** e **q** com a barra **a**). A super expressão dos alelos *rpoS* de C600 e K10 causou um aumento no nível de atividade de FA da cepa MG1655 (compare as barras **k** e **l**, em destaque, com a barra **a**).

Além dos ensaios de FA, foram realizados ensaios qualitativos de catalase, para testar a funcionalidade dos diferentes alelos *rpoS*⁺ (Tabela 3). O gene *katE*, que codifica a enzima catalase, é dependente de σ^S (Schellhorn et al, 1998), e serve como indicador de sua atividade. Assim, a presença de efervescência no ensaio de catalase indica a presença de um alelo funcional de *rpoS*. Neste ensaio, foram comparados os níveis de catalase produzidos pelos diversos alelos *rpoS*⁺ transformados em BS16 (MG1655 *rpoS*::Tn10), NP1 (K10 *rpoS*::Tn10) e NP3 (C600 *rpoS*::Tn10). Observou-se a produção de efervescência para todos os alelos *rpoS*⁺ introduzidos em BS16, se bem que os transformantes contendo os plasmídios pNP10 e pNP11 (alelos de C600 e K10, respectivamente), apresentaram uma efervescência discreta, indicando apenas uma complementação parcial da mutação *rpoS*::Tn10. No caso das cepas NP1 e NP3, todos os alelos *rpoS*⁺ introduzidos apresentaram efervescência abundante, indicando complementação total da mutação *rpoS*::Tn10 (Tabela 3). Todas as cepas selvagens, inclusive C600 e K10, apresentam atividade de catalase qualitativamente similares.

Tabela 3 – Atividade de catalase de MG1655, K10, C600 e seus mutantes *rpoS*::Tn10 BS16, NP1 e NP3, transformados com os diversos alelos *rpoS*⁺. pNP5 -*rpoS*⁺ de MG1655, pNP10 - *rpoS*⁺ de C600, pNP11- *rpoS*⁺ de K10, pNP12- *rpoS*⁺ de CSH109, pNP13- *rpoS*⁺ de BL21, pNP14- *rpoS*⁺ de W3110, pNP16- *rpoS*⁺ de MC4100. Bactérias foram cultivadas durante a noite em Meio A –Pi. 0,1 mM IPTG foi acrescentado às cepas transformadas com plasmídios.

Cepas	Efervescência observada	Cepas	Efervescência observada	Cepas	Efervescência observada
MG1655	*****	K10	*****	C600	*****
BS16	-	NP1	-	NP3	-
pNP5-BS16	*****	pNP5-NP1	*****	pNP5-NP3	*****
pNP10-BS16	**	pNP10-NP1	*****	pNP10-NP3	*****
pNP11-BS16	**	pNP11-NP1	*****	pNP11-NP3	*****
pNP12-BS16	*****	pNP12-NP1	*****	pNP12-NP3	*****
pNP13-BS16	*****	pNP13-NP1	*****	pNP13-NP3	*****
pNP14-BS16	*****	pNP14-NP1	*****	pNP14-NP3	*****
pNP16-BS16	*****	pNP16-NP1	*****	pNP16-NP3	*****

Os resultados dos ensaios de FA e catalase sugerem que C600 e K10 carregam alelos distintos de *rpoS* quando comparados às demais cepas. Quando introduzidos *in trans* no mutante *rpoS*::Tn10 de MG1655, estes alelos não inibem a expressão de FA e apresentam atividade parcial de catalase. Quando transformados em MG1655 causaram um aumento significativo no nível de FA. É possível, portanto, que o fator σ^S produzido por C600 e K10 seja capaz de participar da transcrição de *phoA*.

O próximo passo foi testar a atividade de FA da cepa C600 e seus derivados. A Figura 21 mostra que a cepa C600 e seu mutante *rpoS*::Tn10 (NP3) apresentam um nível de atividade muito similar (compare as barras a e b), confirmando os dados apresentados na Figura 19. Quando os alelos *rpoS* das diversas cepas foram introduzidos *in trans* em NP3, houve diminuição no nível de atividade de FA (barras c-i). Entretanto, os alelos *rpoS* de C600 e K10 inibiram menos que os demais (barras c e e). Diferentemente do observado para os transformantes da cepa MG1655, os

ensaios qualitativos de catalase demonstraram efervescência abundante em todos os transformantes de NP3, indicando que houve complementação total da mutação *rpoS*::Tn10, até mesmo pelos plasmídios pNP10 e pNP11 (Tabela 3). Quando inseridos *in trans* na cepa C600 selvagem, todos os alelos, com exceção de C600 e K10, reprimiram parcialmente a atividade de FA (compare as barras k, m, n, o, p com a barra a).

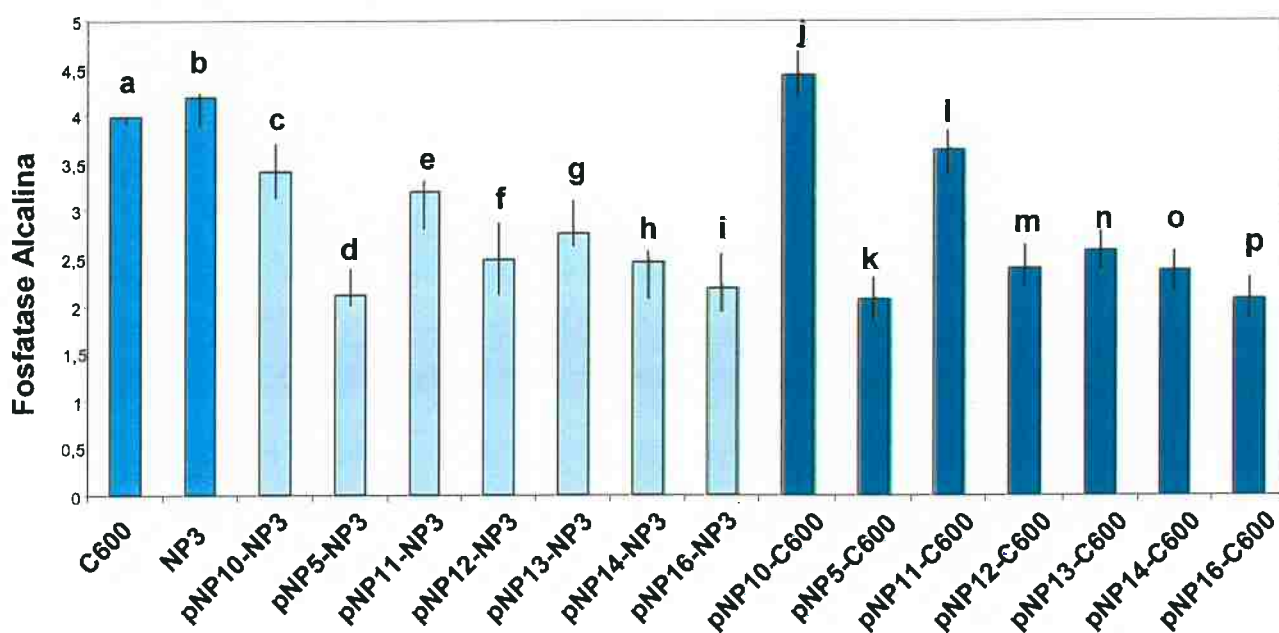


Figura 21 - Efeito dos diferentes alelos de *rpoS* sobre a atividade de FA da cepa C600 e de seu mutante isogênico *rpoS*::Tn10 (NP3). pNP5 -*rpoS*⁺ de MG1655, pNP10 - *rpoS*⁺ de C600, pNP11-*rpoS*⁺ de K10, pNP12- *rpoS*⁺ de CSH109, pNP13- *rpoS*⁺ de BL21, pNP14- *rpoS*⁺ de W3110, pNP16-*rpoS*⁺ de MC4100. Bactérias foram cultivadas durante a noite em Meio A -Pi. 0,1 mM IPTG foi acrescentado às cepas transformadas com plasmídios. As barras representam as médias e desvios padrão de 3 ensaios.

Os plasmídios contendo os diversos alelos de *rpoS* foram também introduzidos na cepa K10. A Figura 22 mostra que todos os alelos *rpoS* complementam a mutação *rpoS*::Tn10 da cepa NP1, diminuindo a atividade de FA desta cepa para um nível similar ou abaixo do observado para a cepa selvagem (compare as barras c,d,e,f,g,h,i com as barras a e b). Ensaios qualitativos de catalase demonstraram efervescência abundante para todos os transformantes de NP1, indicando que houve em todos os casos complementação da mutação *rpoS* (Tabela 3). Quando

inseridos na cepa K10 selvagem, todos os alelos causaram diminuição moderada no nível de atividade de FA (compare as barras j,k,l,m,n,o,p com a barra a).

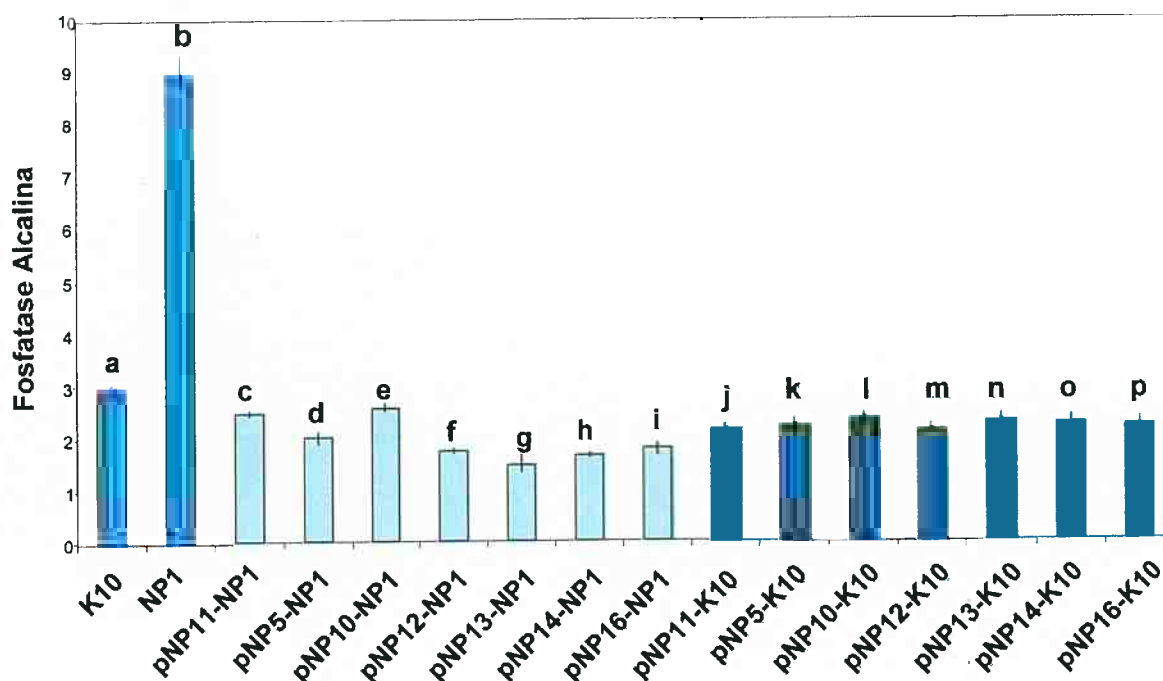


Figura 22 - Efeito dos diferentes alelos de *rpoS* sobre a atividade de FA da cepa K10 e seu isogênico *rpoS*::Tn10 (NP1). pNP5 -*rpoS*⁺ de MG1655, pNP10 - *rpoS*⁺ de C600, pNP11- *rpoS*⁺ de K10, pNP12- *rpoS*⁺ de CSH109, pNP13- *rpoS*⁺ de BL21, pNP14- *rpoS*⁺ de W3110, pNP16- *rpoS*⁺ de MC4100. Bactérias foram cultivadas durante a noite em Meio A -Pi. 0,1 mM IPTG foi acrescentado às cepas transformadas com plasmídios. As barras representam as médias e desvios padrão de 3 ensaios.

As demais cepas estudadas, CSH109, MC4100, W3110 e BL21 apresentaram resultados semelhantes aos da cepa MG1655, e por esta razão, os gráficos de ensaios de FA realizados para estas cepas e seus derivados não estão sendo apresentados.

Em resumo, os resultados das Figuras 20, 21 e 22 e Tabela 3 sugerem que C600 e K10 portam alelos *rpoS* diferentes do alelo de MG1655 e das demais cepas. Os alelos *rpoS* de C600 e K10 são incapazes de complementar a mutação *rpoS*::Tn10 de MG1655. Esta falta de complementação refere-se tanto à incapacidade em diminuir o nível de atividade de FA, como à incapacidade de restaurar totalmente a atividade de catalase do mutante *rpoS*::Tn10. Além disso, quando múltiplas cópias

dos alelos *rpoS* de C600 e K10 foram introduzidos em MG1655 observou-se um aumento na atividade de FA, enquanto que a introdução do plasmídio contendo o alelo *rpoS* de MG1655 inibiu parcialmente a atividade da enzima. Apesar dos alelos *rpoS* de K10 e C600 apresentarem alguns fenótipos similares, as duas cepas diferem em alguns pontos. O nocaute de *rpoS* não afetou o nível de FA de C600. Já em K10, o nível de FA, que já era alto na cepa selvagem, triplicou quando a mutação *rpoS*::Tn10 foi introduzida. Os alelos transformados em C600 não afetaram significativamente a atividade de FA; já em K10, os plasmídios contendo os alelos *rpoS* de C600 e K10 inibiram a atividade da enzima, exatamente como os demais alelos de *rpoS*. Está claro, portanto, que as cepas C600 e K10 diferem das demais cepas K-12, mas também diferem entre si.

4.3.2 Sequenciamento dos diversos alelos de *rpoS*

No capítulo anterior constatamos que as cepas C600 e K10 apresentam distintos níveis de atividade de FA e catalase quando comparadas às demais cepas (MG1655, CSH109, W3110, MC4100 e BL21). Uma explicação plausível para estas diferenças seria a presença de variantes de *rpoS* distintas nestas cepas. O próximo passo foi, portanto, sequenciar as regiões codificadoras (ORFs) de *rpoS* de cada uma das cepas estudadas. As seqüências de *rpoS* das cepas MG1655, CSH109, W3110, MC4100, BL21, C600 e K10 foram amplificadas a partir do DNA genômico de cada cepa, com os iniciadores *rpoS*(+) e *rpoS*(-) (Tabela 2). Os fragmentos de PCR foram seqüenciados em seqüenciador automático, utilizando os 3 pares de iniciadores descritos na Tabela 2 de forma a englobar as duas fitas do ORF completo de *rpoS*. Os resultados do sequenciamento mostraram que todos os alelos apresentaram seqüências de DNA idênticas, a não ser por dois nucleotídios nas posições 98 e 99, cujas identidades variaram entre as cepas, conforme explicitado na Tabela 4.

Tabela 4 – Sequenciamento dos alelos *rpoS*. Seqüências de DNA e proteínas dos alelos *rpoS* das cepas MG1655, BL21, CSH109, W3110, MC4100, C600 e K10, ressaltando os nucleotídeos diferentes nas posições 98 e 99, e o códon de parada encontrado em C600 e K10 (elipse).

Cepas	Sequência (posição 91 a 108)
MG1655	GTA GAA CAG GAA CCC AGT Val Glu Gln Glu Pro Ser
BL21	GTA GAA TTG GAA CCC AGT Val Glu Leu Glu Pro Ser
CSH109	GTA GAA TTG GAA CCC AGT Val Glu Leu Glu Pro Ser
W3110	GTA GAA CAG GAA CCC AGT Val Glu Gln Glu Pro Ser
MC4100	GTA GAA CAG GAA CCC AGT Val Glu Gln Glu Pro Ser
C600	GTA GAA TAG GAA CCC AGT Val Glu Stop Glu Pro Ser
K10	GTA GAA TAG GAA CCC AGT Val Glu Stop Glu Pro Ser

As cepas MG1655, W3110 e MC4100 apresentam uma glutamina na posição 33 de σ^S . BL21 e CSH109 possuem uma leucina nesta mesma posição. É importante lembrar que as cepas acima apresentaram fenótipos de FA e catalase semelhantes (Figura 19) e seus alelos de *rpoS* foram capazes de se auto complementar (Figura 20 e Tabela 3). Por outro lado, C600 e K10 apresentam um códon de parada âmbar (TAG) nesta mesma posição. Mutações âmbar na posição 99 do gene *rpoS* são surpreendentemente comuns (Atlung et al, 2002, Rajkumari e Gowrishankar, 2002, Subbarayan e Sarkar, 2003 e 2004), e acarretam a síntese de uma proteína σ^S menor, menos eficiente na transcrição de seus genes dependentes, conforme descrito na Introdução. Esta proteína truncada estaria sendo sintetizada a partir de um início de tradução alternativo, um códon GTG localizado na posição 157, e um possível sítio Shine-Dalgarno na posição 143 (Figura 7), e teria

um peso molecular de 30 KDa apenas, enquanto que a massa molecular da proteína longa seria de 38 KDa.

A caracterização de C600 e K10 como mutantes âmbar explica porque estes alelos não foram capazes de complementar a mutação *rpoS*::Tn10 das demais cepas em relação às atividades de FA e catalase, mas não explica por que C600 e K10 apresentaram níveis normais de catalase, ou por que C600, diferentemente de K10, que possui a mesma mutação âmbar, não apresenta o efeito repressor de *rpoS* observado para as demais cepas.

4.3.3 Caracterização das proteínas σ^S dos diversos alelos

Para verificar se a mutação *rpoS* âmbar das cepas C600 e K10 produz realmente proteínas σ^S truncadas, foram realizados ensaios de western-blot, com um anticorpo monoclonal anti- σ^S (Figura 23). Para estes ensaios, extratos de proteína total foram obtidos a partir das cepas MG1655, C600 e K10, e dos transformantes de BS16 (MG1655 *rpoS*::Tn10) carregando os plasmídios pNP10 (*rpoS*⁺ de C600) e pNP11 (*rpoS*⁺ de K10). A cepa BS16 foi utilizada como controle negativo. O motivo pelo qual foram também testados os transformantes contendo pNP10 e pNP11 foi porque já havia sido relatada a dificuldade em se observar a proteína σ^S truncada proveniente de mutantes âmbar, sendo que sua visualização só foi possível quando os alelos âmbar foram clonados sob um promotor forte em plasmídios de múltiplas cópias (Subbarayan e Sarkar, 2003). Esperávamos, portanto, visualizar uma banda de 30 KDa, referente ao fator σ^S truncado, apenas na cepa BS16 transformada com os plasmídios pNP10 e pNP11, que super-expressam os alelos *rpoS* de C600 e K10, respectivamente. Nas canaletas correspondentes as proteínas extraídas de K10 de C600, não esperávamos visualizar nenhuma banda.

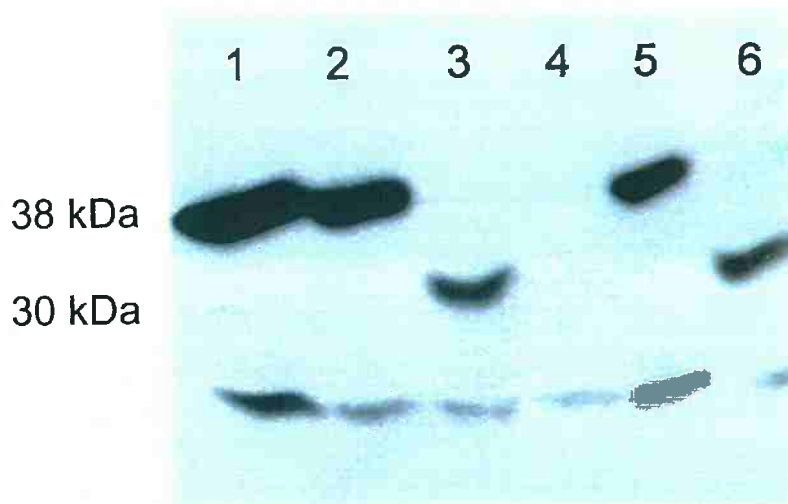


Figura 23 – Ensaio de western-blot com anti- σ^S . 1- MG1655, 2- C600, 3- pNP10 ($rpoS^+$ de C600) transformado em BS16 (MG1655 $rpoS::Tn10$), 4- BS16, 5- K10, 6- pNP11 ($rpoS^+$ de K10) transformado em BS16. Extratos de proteína total foram obtidos a partir de bactérias cultivadas em Meio A -Pi por 1 hora após a entrada na fase de carência de Pi. 0,1 mM IPTG foi adicionado ao meio de cultura das bactérias transformantes.

A cepa MG1655 (Figura 23, canaleta 1) apresentou uma proteína σ^S de 38 KDa. O controle negativo BS16 (canaleta 4) não apresentou nenhuma proteína correspondente a σ^S , longa ou truncada, conforme esperado. Surpreendentemente, C600 e K10 (canaletas 2 e 5) também apresentaram uma banda de 38 KDa, mas os plasmídios pNP10 e pNP11, transformados na cepa BS16 (canaletas 3 e 6) apresentaram apenas a versão truncada de 30 kDa da proteína σ^S .

Uma explicação plausível para esta discrepância seria a presença de mutações supressoras da mutação âmbar nas cepas C600 e K10, capazes de suprimir parcialmente o códon de parada na posição 33 de $rpoSAm$. Isto explicaria porque pNP10 e pNP11 transformados em MG1655 (que não possui fenótipo supressor) apresentaram apenas proteínas truncadas. Outra explicação possível seria a presença de mais de uma cópia do gene $rpoS$ em C600 e K10, sendo que uma delas conteria a mutação âmbar e a outra cópia codificaria para a proteína σ^S longa. Neste caso, os alelos de $rpoS$ clonados nos plasmídios pNP10 e pNP11 carregariam o códon de parada âmbar, enquanto que uma segunda cópia do gene, presente em

outra região do cromossomo apresentaria outro códon na posição 33 e estaria produzindo a proteína σ^S longa.

Se C600 e K10 são supressoras da mutação âmbar, a introdução dos plasmídios pNP10 e pNP11 nos mutantes NP3 (C600 *rpoS*::Tn10) e NP1 (K10 *rpoS*::Tn10) deveria resultar na produção de proteínas σ^S de 38 KDa, diferentemente do que havia sido observado quando estes plasmídios foram introduzidos em BS16 (MG1655 *rpoS*::Tn10). Para determinar a validade desta predição, foram realizados novos ensaios de western-blot. A Figura 24 mostra os resultados de testes de western-blot nos quais proteínas totais extraídas das cepas NP1, NP3 e BS16 transformadas com os plasmídios pNP10 e pNP11 foram ensaiadas com anticorpos anti- σ^S .

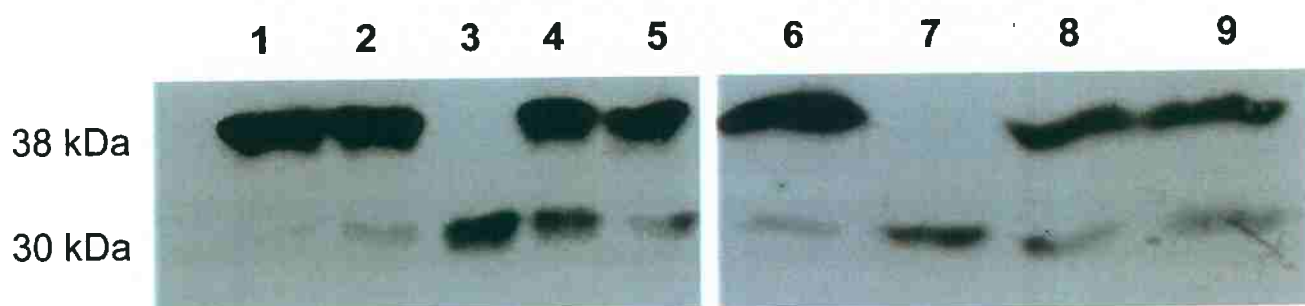


Figura 24 – Ensaio de Western-blot com anti- σ^S . 1- MG1655, 2- C600, 3- pNP10 transformado em BS16 (MG1655 *rpoS*::Tn10), 4- pNP10 transformado em NP3 (C600 *rpoS*::Tn10), 5- pNP10 transformado em NP1 (K10 *rpoS*::Tn10) 6- K10, 7- pNP11 transformado em BS16 (MG1655 *rpoS*::Tn10), 8- pNP11 transformado em NP3 (C600 *rpoS*::Tn10), 9- pNP11 transformado em NP1 (K10 *rpoS*::Tn10).

Confirmando os resultados apresentados na Figura 23, as cepas MG1655, C600 e K10 apresentaram uma banda forte correspondendo a uma proteína de 38 kDa (Figura 24, canaletas 1, 2 e 6). Entretanto, é possível observar também uma banda mais fraca de 30 kDa, que corresponde a σ^S truncada. A detecção desta banda foi possível graças a uma exposição mais prolongada do filme de raios-X junto à membrana do ensaio de western-blot. Este resultado indica que as cepas que produzem majoritariamente proteínas σ^S longas, sintetizam pequenas quantidades de proteínas σ^S truncadas. Os plasmídios pNP10 e pNP11 transformados em BS16,

apresentam apenas a versão truncada de σ^S (canaletas 3 e 7), confirmando a incapacidade de BS16 em suprimir a mutação âmbar. Entretanto, quando introduzidos nas cepas NP1 e NP3, apresentaram o mesmo padrão observado para as cepas parentais C600 e K10, ou seja, uma banda mais forte de 38 kDa e outra mais fraca de 30 kDa (canaletas 4, 5, 8 e 9). É provável, portanto, que C600 e K10 suprimam o códon de parada âmbar de *rpoSAm*. Isto explicaria porque os alelos âmbar de *rpoS* produzem proteínas longas quando presentes nestas cepas. Entretanto, a hipótese de que os cromossomos de C600 e K10 carregam 2 cópias de *rpoS*, conforme sugerido acima, não pode ser ainda descartada.

4.3.4 Determinação do número de cópias de *rpoS* nos cromossomos de C600 e K10

Conforme exposto acima, uma outra explicação possível para a presença de ambas as proteínas, σ^S longa e truncada nas cepas C600 e K10, seria a presença de mais de uma cópia de *rpoS* nos cromossomos destas cepas. Uma destas cópias, clonada nos plasmídios pNP10 e pNP11 conteria o códon de parada na posição 33 e uma segunda cópia, presente em outro local do cromossomo, possuiria outro códon nesta posição. Para testar esta hipótese, foram realizados ensaios de hibridização southern. O DNA genômico das cepas MG1655, C600 e K10 foi digerido com as enzimas de restrição NsiI e HindIII, que digerem nas regiões adjacentes ao gene *rpoS*, de maneira a gerar um fragmento de aproximadamente 5300 bp. Outra digestão foi feita com a enzima KpnI apenas, que possui dois sítios de restrição, flanqueando o gene *rpoS*, de maneira a gerar um fragmento de aproximadamente 2500 bp. O DNA genômico digerido foi hibridizado com uma sonda radioativa correspondente a *rpoS* (Figura 25).

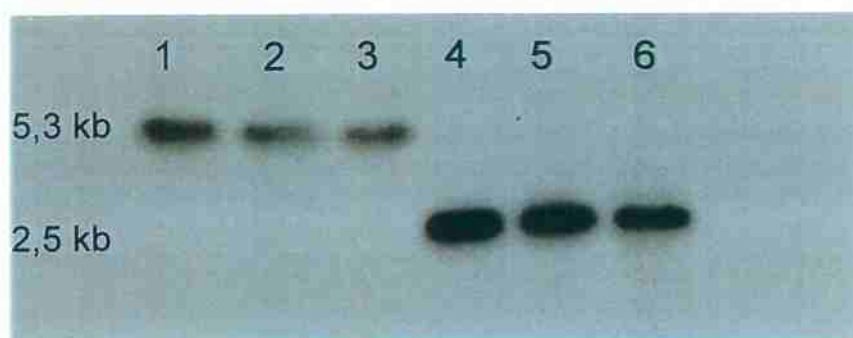


Figura 25 – Checagem do número de cópias de alelos *rpoS* presentes nos cromossomos de MG1655, C600 e K10. 1, 2 e 3- MG1655, C600 e K10 digeridas com as enzimas NsiI e HindIII ; 4, 5 e 6- MG1655, C600 e K10 digeridas com a enzima KpnI.

Se houvesse mais de uma cópia de *rpoS* nos cromossomos de C600 e K10, seria esperado que a sonda hibridizasse com mais de uma banda. No entanto, os resultados mostram a presença de apenas uma banda detectada para cada digestão. Os tamanhos observados foram de 5,3 kb para a digestão com HindIII e NsiI e 2,5 kb para digestão com KpnI, exatamente como esperado para a presença de uma única cópia de *rpoS* no genoma, e de forma idêntica ao observado para a cepa MG1655. Portanto, a hipótese de que há mais de uma cópia de *rpoS* no cromossomo das cepas C600 e K10 não procede.

Os resultados apresentados nas Figuras 23 e 24 indicam que C600 e K10 são realmente cepas supressoras e que apesar da seqüência de *rpoS* destas cepas conter um códon de parada na posição 33, este é fortemente suprimido originando proteínas σ^S longas. Nestas cepas, o tRNA de anticódon ATC vazio seria substituído por outro carregado com um aminoácido. Uma vez que os níveis de FA de C600 e K10 não se assemelham (vide Figuras 21 e 22), é provável que estas cepas não possuam a mesma mutação supressora. A melhor forma para descobrir o tipo de supressão e a natureza do aminoácido inserido na posição 33 é através do sequenciamento das proteínas σ^S oriundas destas cepas. Com esta finalidade, os alelos *rpoS* de C600 e K10 foram clonados no plasmídio pPROEX htc, para expressão e purificação de proteínas com cauda de histidina (Figura 11, Material e

Métodos). As proteínas foram expressas, purificadas e encaminhadas para sequenciamento.

4.3.5 Efeito dos diferentes alelos *rpoS* sobre *lacZ*

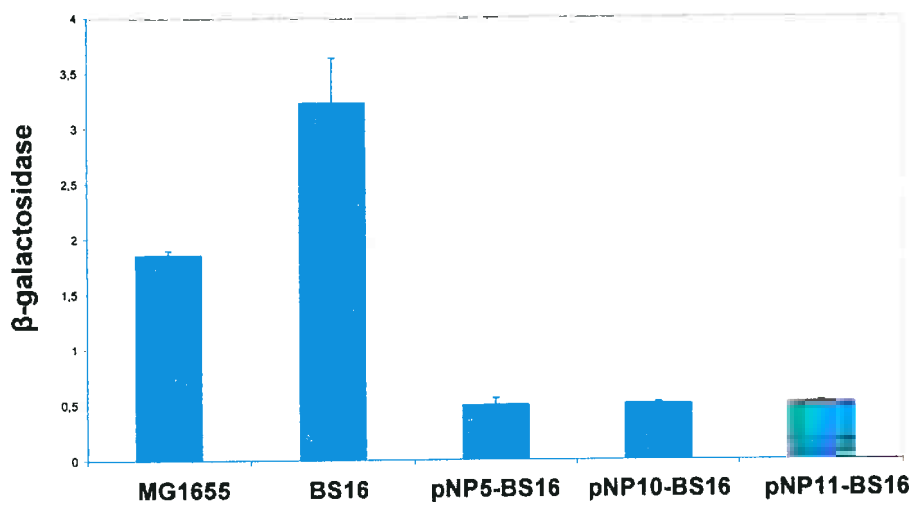
Após caracterizar os alelos *rpoS*, e concluir que C600 e K10 apresentam, na ausência de supressão, um alelo truncado, que resulta em diferentes fenótipos de FA e catalase, resolvemos investigar como os diferentes alelos de *rpoS* atuam sobre outros genes, que assim como *phoA*, são dependentes de σ^D . O gene escolhido foi *lacZ*, transcrito por $E\sigma^D$ (Collado-Vides et al, 1991), e cuja expressão pode ser facilmente quantificada através de ensaios de β -galactosidase (β -gal).

Escolhemos trabalhar apenas com as cepas MG1655, C600 e K10, já que os alelos de CSH109, MC4100, W3110 e BL21 apresentaram resultados similares a MG1655 nos testes de anteriores de FA e catalase. As cepas foram cultivadas durante a noite em meio LB acrescido de 1 mM IPTG e no dia seguinte foram submetidas a ensaios de β -gal.

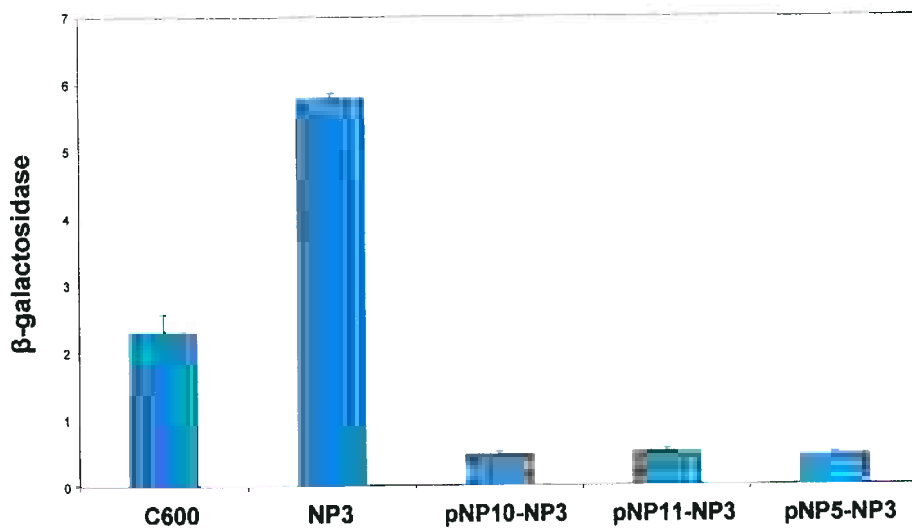
A inativação de σ^S acarretou uma maior atividade de β -gal; pois assim como ocorre com *phoA*, a transcrição de *lacZ* é beneficiada pela ausência de competição entre σ^D e σ^S pelo sítio da RNA polimerase (Figura 26). Quando a mutação *rpoS*::Tn10 foi complementada por plasmídios que super-expressam σ^S , a atividade de β -gal diminuiu para um nível 4 vezes menor que o da cepa selvagem. Todos os 3 alelos de *rpoS* (MG1655, C600 ou K10) complementaram *in trans* de forma similar a mutação *rpoS*::Tn10, independentemente da cepa na qual foram transformados. Estes resultados sugerem que até mesmo o alelo âmbar de *rpoS* é capaz de inibir a expressão de *lacZ*. Ou seja, ambas as formas de σ^S , longa ou truncada, estariam competindo com σ^D pelo sítio da RNA polimerase, e reprimindo indiretamente a transcrição dos genes dependentes de σ^D , entre eles *lacZ*, ao contrário do que foi observado para *phoA*, onde o alelo truncado, além de não inibir, contribuiu para aumentar o nível de atividade de FA. Para explicar esta diferença, levantamos a hipótese de que *phoA*, além de ser transcrito por $E\sigma^D$, estaria sendo transcrito

também pela RNA polimerase associada à σ^S truncada. Por outro lado, o promotor de *lacZ* e provavelmente dos demais genes dependentes de σ^D que não pertencem ao regulon PHO não poderiam ser reconhecidos por σ^S .

A



B



C

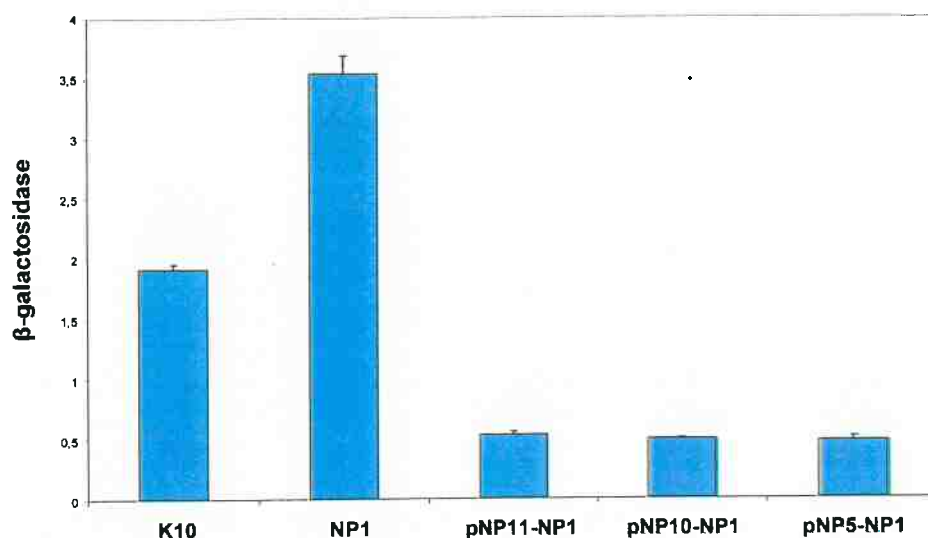


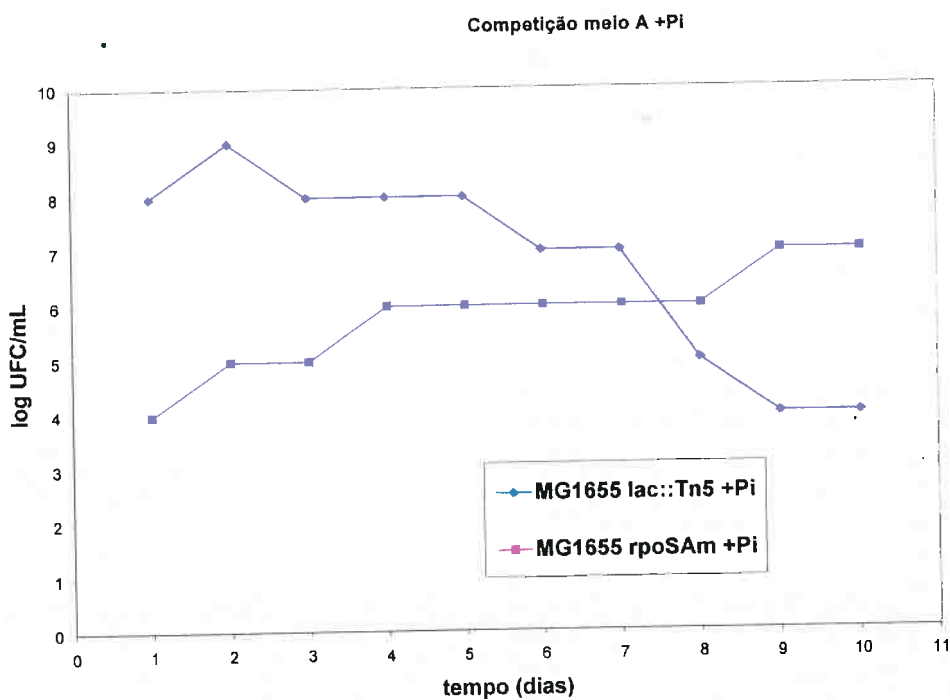
Figura 26 – Efeito dos alelos *rpoS* de MG1655 (pNP5), C600 (pNP10) e K10 (pNP11) sobre a expressão de *lacZ*. A- MG1655 e seus derivados, B- C600 e seus derivados e C- K10 e seus derivados. Bactérias foram cultivadas durante a noite em meio LB, acrescido de 1 mM IPTG. As barras representam média e desvio padrão de 3 ensaios.

4.3.6 Competição entre bactérias contendo as formas longa e truncada de σ^S

É sabido que a perda parcial de σ^S resulta em um fenótipo conhecido como GASP (Growth Advantage in Stationary Phase) (Zambrano e Kolter, 1996). Cepas que apresentam a mutação âmbar no gene *rpoS* retêm apenas parcialmente a função de genes dependentes de σ^S , conforme evidenciado pelos testes de catalase (Tabela 4 e Subbarayan e Sarkar, 2004). Subbarayan e Sarkar (2004) atestaram a ocorrência do fenótipo GASP em mutantes âmbar de *rpoS*, que quando cultivados em co-cultura em meio LB com uma cepa que expressa σ^S selvagem, passaram a dominar a cultura em 3 dias.

Resolvemos, portanto, testar a capacidade de uma cepa contendo somente a versão truncada de σ^S em competir com outra cepa contendo a versão longa de σ^S em condições de carência de Pi. Para tanto, foi necessário construir um mutante MG1655 *rpoSAm* isogênico. Este mutante foi obtido através de duas transduções sequenciais com o fago P1 conforme detalhado em Métodos, e resultou em uma cepa MG1655 portando o alelo *rpoSAm* e com uma marca de resistência à tetraciclina inserida no gene *zfi*. A cepa MG1655 contendo o alelo normal de *rpoS* e tendo o transposon Tn5 inserido no gene *lacZ*, conferindo resistência à canamicina foi utilizada na competição. As cepas foram cultivadas em meio A, acrescido ou não de 1 mM K_2HPO_4 , por 10 dias. Amostras foram retiradas diariamente e o número de unidades formadoras de colônia foi determinado através de semeadura em placas de meio LB com os antibióticos apropriados. Os resultados de um típico experimento de competição estão expostos na Figura 27.

A



B

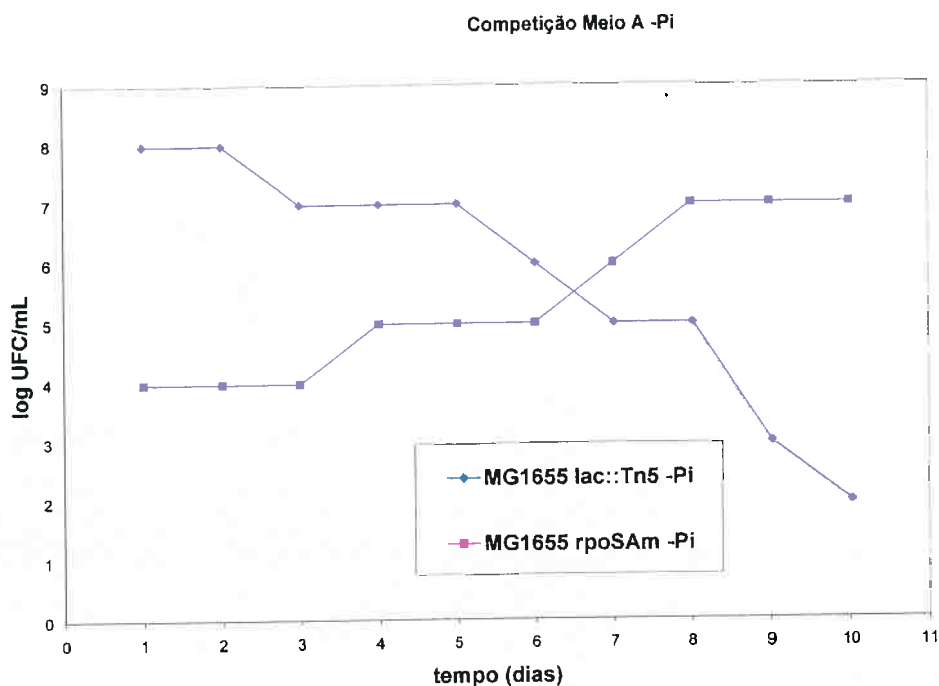


Figura 27 – Competição entre as cepas MG1655 *lacZ::Tn5* e MG1655 *rpoSAm zfi::Tn10* cultivadas em meio A +Pi (A) ou meio A -Pi (B). As curvas de crescimento representam os resultados de um ensaio típico de um total de dois ensaios idênticos realizados.

É possível observar que mesmo iniciando o competição com uma concentração de células bem inferior, a cepa *rpoSAm* dominou a cultura a partir do sétimo dia, em meio carente de Pi e a partir do oitavo dia, em meio abundante em Pi. Fenótipos relacionados a *rpoS* foram testados no decorrer do experimento através de testes qualitativos de catalase em amostras das culturas. Estes testes demonstraram que até o último dia, ambas as cepas mantiveram seus fenótipos originais em relação à σ^S , ou seja, a cepa selvagem apresentou efervescência vigorosa, enquanto o mutante âmbar apresentou efervescência moderada na presença de H_2O_2 . Concluimos, portanto, que o alelo truncado de *rpoS* confere o fenótipo GASP também em condições de carência de Pi.

5 DISCUSSÃO

5.1 O efeito negativo de σ^S sobre o regulon PHO

5.1.1 Competição entre fatores sigma

O efeito repressor de σ^S sobre o regulon PHO foi demonstrado para os genes *phoA*, *phoE*, *phoB* e *ugpB*. Uma vez que os genes de PHO são transcritos pela holoenzima $E\sigma^D$ (Makino et al, 1988, 1989), a competição entre os fatores σ^S e σ^D pelo cerne da RNA polimerase deve ser o provável mecanismo pelo qual σ^S reprime a expressão dos genes de PHO.

A repressão por σ^S como resultado da competição com σ^D já foi observada para outros genes, tais como *mal* e *mgl* (Notley-McRobb et al, 2002), *fimA* e *fimB* (Dove et al, 1997), *ompF* (Pratt et al, 1996) e *uspA* (Farewell et al, 1998). A competição entre fatores sigma está também provavelmente relacionada ao aumento na expressão de diversos genes em mutantes *rpoS* (Xu e Johnson, 1995, Farewell et al, 1998). Há evidências de competição entre o fator σ^{32} e o fator σ^D , afetando a expressão relativa de diversos genes (Farewell et al, 1998). Portanto, é possível afirmar que a competição entre fatores sigma é um mecanismo que modula o padrão geral de transcrição da bactéria, de maneira que a substituição de uma holoenzima por outra, em resposta a mudanças nas condições ambientais, altera este padrão (Zhou et al, 1992, Jishage e Ishihama, 1999, Maeda et al, 2000).

A carência de Pi é uma condição comum nos ambientes naturais habitados por *E. coli* (Barik et al, 2001, Sundareshwar et al, 2003). Espera-se, portanto, que na natureza, o regulon PHO seja expresso constantemente. Por outro lado, a ativação da resposta geral ao estresse, coordenada por σ^S , é também ativada em situações de carência de Pi, e, portanto, igualmente freqüente na natureza (Hengge-Aronis, 2002).

Estes dois mecanismos de resposta ao mesmo tipo de estresse deveriam ser complementares. Contudo, demonstramos neste trabalho um aparente antagonismo entre a resposta geral ao estresse (coordenada por σ^S), e a resposta específica à carência de Pi (indução do regulon PHO). Em situação de carência de Pi, os genes de PHO são induzidos, e requerem o fator σ^D associado à RNA polimerase para sua transcrição. Por outro lado, σ^S , que também responde à carência de Pi, acumula-se no citosol, e promove a transcrição de genes relacionados à sobrevivência, ao mesmo tempo em que reprime indiretamente a transcrição dos genes dependentes de σ^D , entre eles os genes de PHO, através do mecanismo de competição. Neste caso, não há aparentemente nenhum benefício proveniente deste tipo de regulação, pois dois sistemas igualmente importantes em situação de carência de nutrientes estão competindo entre si. Entretanto, é preciso frisar que os genes do regulon PHO estão diretamente envolvidos nos processos de nutrição e proliferação celular. Desta forma, o aparente antagonismo causado pela competição entre os fatores σ^S e σ^D pode ser explicado pelo modelo evolutivo conhecido como *trade-off* (Nystrom, 2003, 2004, Ferenci, 2003).

Este modelo propõe que existe um balanço entre sobrevivência e proliferação celular, envolvendo a competição entre os fatores σ^S e σ^D . O fator σ^D está geralmente envolvido na transcrição de genes relacionados ao crescimento e proliferação celular, enquanto o fator σ^S transcreve genes relacionados à sobrevivência em situações de estresse. Assim, quando a célula enfrenta situações de estresse, que ameaçam sua sobrevivência, o fator σ^S promove a transcrição dos seus genes dependentes, ao mesmo tempo em que reprime a transcrição dos genes relacionados ao crescimento (por exemplo, genes de PHO), competindo com o fator σ^D pela ligação ao cerne da RNA polimerase.

Diferentemente dos demais genes de PHO, *pstS*, o primeiro gene do operon *pst*, não foi afetado pela competição entre os fatores sigma. Pelo contrário, seu nível de transcrição foi moderadamente estimulado pela super-expressão de σ^S , e moderadamente inibido em sua ausência (Figuras 16 e 18).

5.1.2 Por que *pstS* é diferente?

Dentre os genes de PHO, *pstS* é o único que possui uma citosina na posição -13 de sua região promotora (Figura 6). A presença de -13C foi descrita como um fator importante para o reconhecimento do promotor pelo fator σ^S (Lee e Gralla, 2001, Becker e Hengge-Aronis 2001, Hengge-Aronis, 2002, Lacour et al, 2003) e consta de duas seqüências consenso propostas para a região -10 (-13 a -7) de genes dependentes de σ^S , CTACACT (Lee e Gralla, 2001) e CYACACT (Lacour et al, 2003).

A substituição da citosina na posição -13 por uma timina reverteu o fenótipo diferenciado de *pstS*, fazendo com que sua expressão passasse a ser reprimida pelo fator σ^S , assemelhando-se aos demais genes de PHO (Figura 16). Por outro lado, a substituição de uma timina na posição -13 da região promotora de *phoA* por uma citosina não conferiu a este gene a possibilidade de ser transcrito por $E\sigma^S$, mas apenas prejudicou sua transcrição por σ^D , já que este fator sigma é repellido por -13C (Figura 17) (Lee e Gralla, 2001, Hengge-Aronis, 2002). Claramente, -13C não é o único fator responsável pela transcrição de *pstS* mediada por $E\sigma^S$.

Outro fator que pode contribuir para a transcrição por $E\sigma^S$ é a proteína IHF. A região regulatória de *pstS* possui um sítio de ligação para IHF localizado entre a seqüência -10 e o sítio de ligação ao ribossomo (Spira e Yagil, 1999).

A atividade de *pstS* diminuiu significativamente no mutante *ihfB*, quando comparado à cepa selvagem. Já na ausência de *rpoS*, IHF não mostrou nenhum efeito positivo sobre a expressão de *pstS*. Estes resultados indicam que IHF contribui para a transcrição mediada por $E\sigma^S$ (Figura 18). A ausência de IHF impediu o reconhecimento por σ^S , de maneira que *pstS* pôde ser transcrito apenas por σ^D , e sofreu, portanto, o efeito repressor de σ^S descrito para os demais genes de PHO.

Concluimos, portanto, que apesar da região -10 de *pstS* (CTATTTT) encaixar-se no consenso para genes dependentes de σ^S , a transcrição de *pstS* por $E\sigma^S$ também requer a presença de IHF.

Há outros exemplos de genes dependentes de σ^S regulados por IHF, como *ihfA*, *dps*, *osmY* e *sra* (Arfin et al, 2000; Lange et al, 1993; Colland et al, 2000, Izutsu et al, 2001). Para *osmY*, por exemplo, que pode ser transcrito *in vivo* tanto por σ^S como por σ^D , o fator IHF inibe a transcrição mediada por ambos os fatores sigma, mas uma vez que possui uma afinidade maior por σ^D , acaba favorecendo a ligação de $E\sigma^S$ ao promotor (Colland et al, 2000). *ihfA* é reprimido por IHF, cujo sítio de ligação coincide com a seqüência promotora do gene (Aviv et al. 1994). IHF liga-se a um sítio localizado acima de região promotora de *dps*, aumentando sua transcrição em fase estacionária de crescimento (Altuvia et al. 1994; Arfin et al. 2000) e *sra* também tem sua expressão em fase estacionária aumentada por IHF (Izutsu et al. 2001).

Explica-se assim, do ponto de vista molecular, a diferença no padrão de transcrição de *pstS* em relação aos demais genes de PHO. Mas qual seria a razão evolutiva para esta diferença? Existe alguma vantagem seletiva que tenha levado à seleção de um promotor "promíscuo", capaz de ser reconhecido por 2 fatores sigma antagônicos, aparentemente "escapando" do balanço energético entre crescimento e proteção? Propomos o seguinte modelo hipotético: uma vez que o operon *pst* regula negativamente os genes de PHO, quanto maior sua expressão, menor o nível de transcrição dos demais genes de PHO, dependentes de σ^D . Desta maneira, restaria mais cerne de RNA polimerase livre para ligar-se ao fator σ^S e promover a transcrição de seus genes dependentes.

Portanto, a transcrição de *pst* por $E\sigma^S$ estaria contribuindo para manter os demais genes de PHO reprimidos, liberando mais unidades de RNA polimerase para transcrever genes relacionados à sobrevivência. A promiscuidade do promotor de *pstS* não escapa ao modelo de *trade-off*, mas pelo contrário, reforça o balanço energético da célula, ajudando a atingir o equilíbrio entre crescimento e proteção, benéfico para a bactéria em situação de carência extrema de Pi.

5.2 Polimorfismo de *rpoS*

O gene *rpoS* é necessário para a sobrevivência da bactéria em fase estacionária de crescimento, adaptação a choque osmótico, termotolerância e outros estresses (Atlung et al, 2002). Variações neste gene são muito comuns em populações de *E. coli* (Ferenci, 2003). Além do mais, *rpoS* está localizado em uma porção bastante instável do cromossomo (Kotewicz et al, 2003). Algumas mutações em *rpoS* resultam na completa inativação deste gene, e outras levam à redução da atividade de σ^S (Robey et al, 2001). Mutações em *rpoS* são geralmente adquiridas durante o crescimento prolongado em fase estacionária (Farrel e Finkel, 2003), em estoques de bactérias (Sutton et al, 2000) e em situações de carência de nutrientes (Notley McRobb et al, 2002)

Dentre as mutações comumente encontradas em *rpoS* está uma transição C→T na posição 99, que resulta em um códon de parada TAG (âmbar) na posição 33 da proteína. A presença deste mutante âmbar já foi descrita por diversos autores (Atlung et al, 2002, Rajkumari e Gowrishankar, 2002, Subbarayan e Sarkar, 2003 e 2004). Subbarayan e Sarkar (2003 e 2004) demonstraram que estes mutantes sintetizam uma proteína σ^S menor do que a selvagem, que retém parcialmente sua função, ou seja, é capaz de transcrever genes dependentes de σ^S , ainda que em menor proporção. Esta proteína truncada seria composta por 277 aminoácidos, 53 a menos do que a σ^S selvagem, e seria traduzida a partir de um início de tradução alternativo, localizado na posição 157, e um possível sítio Shine-Dalgarno na posição 143 (Figura 2) (Rajkumari e Gowrishankar, 2002, Subbarayan e Sarkar, 2003 e 2004).

Neste trabalho, dentre as 7 cepas de *E. coli* analisadas, descobrimos 2 cepas que portam a mutação âmbar em seus alelos de *rpoS*, C600 e K10. Estas cepas apresentaram um padrão de atividade de FA e catalase diferente das demais. Quando transformado em MG1655 *rpoS*::Tn10, o alelo *rpoS**Am* não inibiu a atividade de FA e restaurou apenas parcialmente a atividade de catalase, mas quando inserido nos mutantes *rpoS*::Tn10 de C600 ou K10, o nível de catalase observado foi

igual ao das demais cepas (Tabela 3). Estes resultados aparentemente contraditórios foram explicados através de análises de western-blot das proteínas σ^S , que mostraram que as cepas C600 e K10 produzem uma proteína σ^S longa de 38 KDa, apesar da seqüência de *rpoS* nestas cepas possuir a mutação âmbar no códon 33. Por outro lado, o alelo *rpoS* de C600 e K10 quando transformado em MG1655, apresentou uma proteína σ^S truncada.

Para explicar a presença de uma proteína longa nos mutantes âmbar, sugerimos a presença de uma mutação supressora nestas cepas. Mutações supressoras são freqüentes em cepas de *E.coli* K12 (Belin, 2003) e podem suprimir até 60% de um códon âmbar (Eggertson e Soll, 1988, Belin, 2003). Ou seja, até 60% dos tRNAs de anticódon AUC estariam carregando aminoácidos ao invés de estarem vazios, conforme esperado para tRNAs com este anticódon, e dariam continuidade à síntese da proteína longa. Quando os alelos foram introduzidos em BS16 (MG1655 *rpoS*::Tn10), uma cepa não supressora, observou-se apenas a proteína truncada de 30 kDa.

Para explicar como a proteína σ^S truncada estimula a síntese de FA, propomos que o fator σ^S truncado associado à RNA polimerase seja capaz de transcrever *phoA*. As cepas C600 e K10 não suprimem completamente o códon âmbar, de maneira que ainda sintetizam a proteína truncada em quantidade considerável, o que explicaria os níveis elevados de FA destas cepas. Quando os mesmos alelos estão presentes em uma cepa não supressora (por exemplo, MG1655), contribuem para a transcrição de *phoA*, ao contrário do fator σ^S selvagem, que a inibe.

O efeito positivo de σ^S truncado sobre *phoA* parece ser exclusivo para os genes de PHO. Quando analisamos o efeito de *rpoS^{Am}* sobre outro gene dependente de σ^D , o gene *lacZ*, foi observada a repressão da expressão de *lacZ*, da mesma maneira observada para o fator σ^S selvagem (Figura 26). Sugerimos que a transcrição de *phoA* pelo fator σ^S truncado deve ser resultado de uma interação deste com a proteína PhoB, lembrando que PhoB fosforilada (PhoB-P) é essencial para a transcrição dos genes de PHO, interagindo ao mesmo tempo com o PHO-box e com o fator sigma (Makino et al, 1988).

Resta ainda explicar as diferenças encontradas nos ensaios de FA entre as cepas C600 e K10, apesar destas cepas portarem alelos *rpoS* idênticos (Tabela 4). Provavelmente C600 e K10 apresentam mutações supressoras diferentes, que sintetizam proteínas σ^S de 38 KDa, mas com a inserção de um aminoácido diferente no códon 33. Existem 9 tipos de mutação supressora de códons âmbar em *E.coli*, que podem introduzir glutamina, leucina, serina, tirosina ou triptofano (Eggertsson e Soll, 1998). A hipótese de que C600 e K10 carregam aminoácidos distintos na posição 33 de σ^S será testada através do sequenciamento das proteínas σ^S destas cepas. As proteínas σ^S de C600 e K10 já foram extraídas e purificadas e aguardam a determinação da seqüência de aminoácidos em espectrômetro de massa.

5.3 Vantagens de ser um mutante âmbar

Segundo King et al (2004), níveis diferenciados de *rpoS* estão relacionados à variações fenotípicas diversas em *E. coli*. Por exemplo, há uma relação inversamente proporcional entre capacidade nutricional (adaptabilidade a fontes alternativas de carbono) e resistência ao estresse em bactérias que apresentam níveis baixos ou altos de σ^S , respectivamente. Esta relação estaria sendo coordenada pela concentração e funcionalidade de σ^S na célula.

O nível de atividade de σ^S é determinante para a sobrevivência em certos ambientes. Experimentos comprovaram que quando cultivadas em meio com baixa concentração de glicose em co-cultura, a linhagem de *E. coli* que expressa baixos níveis de σ^S sempre acaba prevalecendo em detrimento da outra linhagem que expressa níveis mais altos deste fator sigma (King et al, 2004). O mesmo ocorreu em nossos experimentos de competição, em carência de Pi (Figura 27). Esta vantagem seletiva ficou conhecida como GASP (*Growth Advantage in Stationary Phase*) (Zambrano et al, 1993, Zambrano e Kolter, 1996, Finkel, 2006). Mas qual seria a vantagem em perder ou atenuar o fator σ^S , relacionado à transcrição de genes necessários em situações de estresse, em uma situação de baixa concentração de nutrientes, que claramente constitui um estresse?

Mutações em *rpoS* são muito comuns em cepas de laboratório (Nystrom, 2003), e foi demonstrado que há de fato uma vantagem em perder σ^S durante crescimento em quimiostato em meio contendo baixa concentração de carbono, por exemplo, pois a perda de σ^S acarretou uma expressão elevada de genes envolvidos na captação de glicose, dependentes do fator σ^D (Notley-McRobb et al, 2002). Subbarayan e Sarkar (2004) mostraram que uma cepa *rpoSAm* não supressora venceu uma cepa contendo o alelo *rpoS* selvagem após 4 dias de competição em meio LB. Devido à alta frequência de mutantes âmbar encontradas em populações de *E. coli* K-12, alguns autores sugerem que este representaria a versão ancestral de *rpoS* (Atlung et al, 2002, Subbarayan e Sarkar, 2004).

A aplicação do fenomeno de *trade-off* (Nystrom, 2003, 2004, Ferenci, 2003) sugere que há uma vantagem seletiva em perder ou atenuar a atividade de σ^S . Isto ajudaria a entender a forte presença dos mutantes âmbar em cepas de *E. coli* na natureza. A perda ou diminuição da capacidade competitiva de σ^S frente à σ^D acarreta uma maior disponibilidade de cernes da RNA polimerase livres para serem ligados pelo fator σ^D , que pode transcrever mais livremente os genes relacionados à nutrição. Esta vantagem seletiva, no entanto, é contra balanceada pela resistência ao estresse conferida por σ^S (Nystrom, 2003). Portanto, o crescimento e a resistência ao estresse impõem pressões seletivas opostas, resultando em polimorfismos que afetam *rpoS* (Ferenci, 2005).

Em condições de estresse, que levam a um aumento na expressão de σ^S , combinadas com situações de carência de nutrientes, onde a expressão de genes dependentes de σ^D é necessária, são preferencialmente selecionadas mutações que atenuem a expressão de σ^S em relação a mutações nulas em *rpoS* (Ferenci, 2003). O mesmo ocorre em fase estacionária tardia, em que a bactéria tem de lidar com a escassez nutricional, stress oxidativo e alterações de pH. Eliminar completamente o fator σ^S nestes casos implicaria em perder completamente a resistência ao estresse. Além disso, a proteína Rsd, que funciona como um fator anti- σ^D , inibindo sua atividade, é transcrita a partir de um promotor dependente de σ^S (Jishage e Ishihama, 1999), contribuindo para diminuir ainda mais a expressão de genes dependentes de σ^D na presença de um fator σ^S plenamente funcional.

Portanto, a seleção de mutações âmbar em *rpoS*, que conferem uma atividade parcial de σ^S à célula, parece solucionar o balanço necessário em condições combinadas de estresse e carência nutricional extrema.

A competição entre fatores sigma e a seleção de mutações *rpoS* em determinadas condições parecem indicar uma limitação no aparelho de regulação da bactéria (Ferenci, 2003), que busca eliminar ou atenuar o fator σ^S , para que, através do mecanismo de competição, σ^D possa aumentar a transcrição dos seus genes dependentes, relacionados à nutrição. Este equilíbrio entre reprodução e estresse, quando aplicado ao nível mutacional, ou seja, como um mecanismo de seleção natural, foi denominado SPANC (Self-Preservation And Nutricional Competence (Ferenci, 2005). SPANC é caracterizado pela seleção de mutações que alterem o balanço *trade-off* da célula, de maneira que uma população possa se adaptar a tipos específicos de estresse. Ou seja, o balanço *trade-off* é um mecanismo de regulação da bactéria, que permite que um indivíduo responda a situações de estresse, enquanto o equilíbrio SPANC implica na seleção de mutações que alterem este *trade-off*, através, por exemplo, de mutações em *rpoS*.

O equilíbrio SPANC é diretamente afetado pela competição entre fatores sigma, e variações nos níveis de *rpoS*. As cepas com maiores níveis endógenos de *rpoS* são precisamente aquelas com a taxa metabólica mais baixa (Ferenci, 2005). Estas cepas estão em desvantagem competitiva em ambientes de limitação nutricional, já que genes de captação e transporte de nutrientes são reprimidos pelo antagonismo de *rpoS* (Notley McRobb, 2002). Assim, ambientes com pressões seletivas variadas resultam na evolução de equilíbrios SPANC específicos (Ferenci, 2005). Desta forma, o sinergismo entre regulação da expressão gênica e mutação (equilíbrio SPANC) é a causa mais provável do sucesso evolutivo das bactérias (Ferenci, 2005).

6 CONCLUSÕES

Foi demonstrado que σ^S afeta negativamente a expressão de vários genes de PHO, com exceção do operon *pst*. Este efeito foi atribuído a uma competição entre os fatores σ^S e σ^D pela ligação ao cerne da RNA polimerase. O efeito diferencial observado para o operon *pst* foi atribuído à presença de uma citosina na posição -13 na região promotora de *pstS*, conjuntamente com a presença de um sítio de ligação para a proteína IHF, localizado abaixo da região promotora deste gene. Um modelo baseado em *trade-off* foi proposto para explicar a dinâmica da relação entre σ^S e os genes de PHO. Já que os genes de PHO são dependentes de σ^D , o acúmulo de σ^S durante a carência de Pi reduz a transcrição dos mesmos. Por outro lado, *pst*, que tem papel negativo na regulação de PHO, pode ser transcrito tanto por σ^D como por σ^S . Desta forma, *pst* contribui para reprimir os demais genes de PHO, auxiliando a manter um equilíbrio entre nutrição e sobrevivência durante carência extrema de Pi.

O estudo de polimorfismo de *rpoS* detectou 2 cepas que contem um códon TAG na posição 97-99 deste gene, caracterizando uma mutação âmbar, que provoca a síntese de uma proteína truncada (30 kDa), com 53 aminoácidos a menos do que a proteína selvagem (38 kDa).

As cepas portadoras do alelo *rpoS* âmbar (C600 e K10) possuem provavelmente um fenótipo supressor, e sintetizam uma proteína longa (38 kDa) além da proteína truncada (30 kDa). Sugerimos que a proteína truncada é capaz de transcreever *phoA*, já que sua super-expressão aumenta a atividade de FA nas cepas selvagens. Por outro lado, σ^S truncada não teve efeito positivo sobre a expressão de *lacZ*, outro gene dependente de σ^D , sugerindo que a transcrição de *phoA* por $E\sigma^S$ deve ser decorrente de uma interação entre σ^S truncada e PhoB. C600 e K10 também apresentaram diferenças entre si, em relação ao padrão de expressão de FA, o que pode ser explicado pela presença de diferentes tipos de supressão.

7 BIBLIOGRAFIA

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

Altuvia S, Almiron M, Huisman G, Kolter R, Storz G. The *dps* promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and sigma S in stationary phase. *Mol Microbiol*. 1994. 13(2):265-72.

Arfin SM, Long AD, Ito ET, Toller L, Riehle MM, Paegle ES, Hatfield GW. Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of integration host factor. *J Biol Chem*. 2000. 275(38):29672-84.

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

Aviv M, Giladi H, Schreiber G, Oppenheim AB, Glaser G. Expression of the genes coding for the *Escherichia coli* integration host factor are controlled by growth phase, *rpoS*, *ppGpp* and by autoregulation. *Mol Microbiol*. 1994. 14:1021-1031

Barik, SK, Prurshothaman C, Mohanty AN. Phosphatase activity with reference to bacteria and phosphorus in tropical freshwater aquaculture pond systems. *Aquac Res*. 2001. 32: 819-832.

Becker G, Hengge-Aronis R. What makes an *Escherichia coli* promoter sigma(S) dependent? Role of the -13/-14 nucleotide promoter positions and region 2.5 of sigma(S). *Mol Microbiol*. 2001. 39(5): 1153-65.

Becker G, Klauck E, Hengge-Aronis R. Regulation of RpoS proteolysis in *Escherichia coli*: the response regulator RssB is a recognition factor that interacts with the turnover element in RpoS. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1999. 96(11): 6439-44.

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

Bordes P, Repoila F, Kolb A, Gutierrez C. Involvement of differential efficiency of transcription by σ factors and σ^{70} RNA polymerase holoenzymes in growth phase regulation of the *Escherichia coli osmE* promoter. *Mol Microbiol*. 2000. 35(4):845-53.

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

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

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

Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987. 162(1):156-9.

Claverie-Martin F, Magasanik B. Role of integration host factor in the regulation of the *glnHp2* promoter of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991. 88(5):1631-5.

Collado-Vides J, Magasanik B, Gralla JD. Control site location and transcriptional regulation in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*. 1991. 55(3):371-94.

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

Dombroski AJ, Walter WA, Gross CA. The role of the sigma subunit in promoter recognition by RNA polymerase. *Cell Mol Biol Res.* 1993. (4):311-7.

Dove SL, Smith, SG, Dorman, CJ. Control of *Escherichia coli* type 1 fimbrial gene expression in stationary phase: a negative role for Rpos. *Mol Gen Genet* 1997 254: 13-20.

Eggertsson G, Soll D. Transfer ribonucleic acid mediated suppression of termination codons in *Escherichia coli*. *Microbiological reviews* 1988. 52(3): 354-374

Espinosa-Urgel M, Chamizo C, Tormo A. A consensus structure for sigma S-dependent promoters. *Mol Microbiol.* 1996. 21(3):657-9.

Estrem ST, Ross W, Gaal T, Chen ZW, Niu W, Ebright RH, Gourse RL. Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the carboxy-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit. *Genes Dev.* 1999. 13(16):2134-47

Estrem ST, Gaal T, Ross W, Gourse RL. Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998. 95(17):9761-6.

Farewell A, Kvint K, Nystrom T. Negative regulation by RpoS: a case of sigma factor competition. *Mol Microbiol.* 1998. 29(4):1039-51.

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

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

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

- Finkel SE.** Long-term survival during stationary phase: evolution and the GASP phenotype. *Nat Rev Microbiol.* 2006. 4(2):113-20.
- Friedman DI.** Integration host factor: a protein for all reasons. *Cell.* 1988. 55(4):545-54.
- Gaal T, Ross W, Estrem ST, Nguyen LH, Burgess RR, Gourse RL.** Promoter recognition and discrimination by EsigmaS RNA polymerase. *Mol Microbiol.* 2001. 42(4):939-54.
- Gentry D, Xiao H, Burgess R, Cashel M.** The omega subunit of *Escherichia coli* K-12 RNA polymerase is not required for stringent RNA control in vivo. *J Bacteriol.* 1991. 173(12):3901-3.
- Gentry DR, Hernandez VJ, Nguyen LH, Jensen DB, Cashel M.** Synthesis of the stationary-phase sigma factor sigma s is positively regulated by ppGpp. *J Bacteriol.* 1993. 175(24):7982-9.
- Germer J, Becker G, Metzner M, Hengge-Aronis R.** Role of activator site position and a distal UP-element half-site for sigma factor selectivity at a CRP/H-NS-activated sigma(s)-dependent promoter in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2001.41(3):705-16.
- Giladi H, Gottesman M, Oppenheim AB.** Integration host factor stimulates the phage lambda pL promoter. *J Mol Biol.* 1990. 213(1):109-21.
- Giladi H, Igarashi K, Ishihama A, Oppenheim AB.** Stimulation of the phage lambda pL promoter by integration host factor requires the carboxy terminus of the alpha-subunit of RNA polymerase. *J Mol Biol.* 1992. 227(4):985-90.
- Goosen N, van de Putte P.** The regulation of transcription initiation by integration host factor. *Mol Microbiol.* 1995. 16(1):1-7.

Ghosh P, Ishihama A, Chatterji D. *Escherichia coli* RNA polymerase subunit omega and its N-terminal domain bind full-length beta' to facilitate incorporation into the alpha2beta subassembly. *Eur J Biochem.* 2001. 268(17):4621-7.

Gourse RL, Ross W, Gaal T. UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol Microbiol.* 2000. 37(4):687-95.

Gowrishankar J, Yamamoto K, Subbarayan PR, Ishihama A. In vitro properties of RpoS (sigma(S)) mutants of *Escherichia coli* with postulated N-terminal subregion 1.1 or C-terminal region 4 deleted. *J Bacteriol.* 2003. 185(8):2673-9.

Hengge-Aronis R. Back to log phase: sigma S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 1996. 21(5):887-93.

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

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

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

Hengge-Aronis R. Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter sigmaS-selective? *Curr Opin Microbiol.* 2002b. 5(6):591-5.

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

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

Hiratsu K, Nakata A, Shinagawa H, Makino K. Autophosphorylation and activation of transcriptional activator PhoB of *Escherichia coli* by acetyl phosphate in vitro. *Gene*. 1995. 161(1):7-10.

Hoover TR, Santero E, Porter S, Kustu S. The integration host factor stimulates interaction of RNA polymerase with NIFA, the transcriptional activator for nitrogen fixation operons. *Cell* 1990. 63:11-22

Ishihama A. Modulation of the nucleoid, the transcription apparatus, and the translation machinery in bacteria for stationary phase survival. *Genes Cells*. 1999 4(3):135-43.

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

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

Izutsu K, Wada C, Komine Y, Sako T, Ueguchi C, Nakura S, Wada A. *Escherichia coli* ribosome-associated protein SRA, whose copy number increases during stationary phase. *J Bacteriol*. 2001. 183(9):2765-73.

Jishage M, Ishihama A. Regulation of RNA polymerase sigma subunit synthesis in *Escherichia coli*: intracellular levels of sigma 70 and sigma 38. *J Bacteriol*. 1995. 177(23): 6832-5.

Jishage M, Ishihama A. Variation in RNA polymerase sigma subunit composition within different stocks of *Escherichia coli* W3110. *J Bacteriol*. 1997. 179(3): 959-63.

Jishage M, Ishihama A. A stationary phase protein in *Escherichia coli* with binding activity to the major sigma subunit of RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998. 95(9):4953-8.

Jishage M, Ishihama A. Transcriptional organization and in vivo role of the *Escherichia coli* *rsd* gene, encoding the regulator of RNA polymerase sigma D. J Bacteriol. 1999. 181(12):3768-76.

Kapanidis AN, Margeat E, Laurence TA, Dose S, Ho SO, Mukhopadhyay J, Kortkhonja E, Mekler V, Ebright RH, Weiss S. Retention of transcription initiation factor sigma70 in transcription elongation: single-molecule analysis. Mol Cell. 2005. 20(3):347-56.

King T, Ishihama A, Kori A, Ferenci T. A regulatory trade-off as a source of strain variation in the species *Escherichia coli*. J Bacteriol. 2004. 186(17):5614-20.

Kotewicz ML, Brown EW, Eugene LeClerc J, Cebula TA. Genomic variability among enteric pathogens: the case of the *mutS-rpoS* intergenic region. Trends Microbiol. 2003. 11(1):2-6.

Krause HM, Higgins NP. Positive and negative regulation of the Mu operator by Mu repressor and *Escherichia coli* integration host factor. J Biol Chem. 1986. 261(8):3744-52.

Kusano S, Ding Q, Fujita N, Ishihama A. Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase E sigma 70 and E sigma 38 holoenzymes. Effect of DNA supercoiling. J Biol Chem. 1996. 271(4):1998-2004.

Kvint K, Farewell A, Nystrom T. RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate for induction even in the presence of high levels of sigma(s). J Biol Chem. 2000. 275(20):14795-8.

Lacour S, Landini P. SigmaS-dependent gene expression at the onset of stationary phase in *Escherichia coli*: function of sigmaS-dependent genes and identification of their promoter sequences. J Bacteriol. 2004. 186(21):7186-95.

Lacour S, Kolb A, Landini P. Nucleotides from -16 to -12 determine specific promoter recognition by bacterial sigma^S-RNA polymerase. *J Biol Chem.* 2003. 278(39): 37160-8.

Lange R, Barth M, Hengge-Aronis R. Complex transcriptional control of the sigma^S-dependent stationary-phase-induced and osmotically regulated *osmY* (*csi-5*) gene suggests novel roles for Lrp, cyclic AMP (cAMP) receptor protein-cAMP complex, and integration host factor in the stationary-phase response of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1993. 175(24): 7910-7.

Lange R, Hengge-Aronis R. Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 1991. 5(1):49-59.

Lange R, Hengge-Aronis R. The cellular concentration of the sigma^S subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli* is controlled at the levels of transcription, translation, and protein stability. *Genes Dev.* 1994. 8(13): 1600-12.

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

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

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

Loewen PC, Triggs BL. Genetic mapping of *katF*, a locus that with *katE* affects the synthesis of a second catalase species in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1984. 160(2): 668-75.

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

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.* 1988. 203(1):85-95.

Makino K, Shinagawa H, Amemura M, Kawamoto T, Yamada M, Nakata A. Signal transduction in the phosphate regulon of *Escherichia coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J Mol Biol.* 1989. 210(3):551-9.

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

Mika F, Hengge R. A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA, and RssB coordinates synthesis and proteolysis of sigmaS (RpoS) in *E. coli*. *Genes Dev.* 2005. 19(22): 2770-81.

Miller HI, Friedman DI. An *E. coli* gene product required for lambda site-specific recombination. *Cell.* 1980. 20(3):711-9.

Miller JH. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. 1992. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory.

Muffler A, Traulsen DD, Lange R, Hengge-Aronis R. Posttranscriptional osmotic regulation of the sigma(s) subunit of RNA polymerase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1996. 178(6):1607-13.

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

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

Nguyen LH, Jensen DB, Thompson NE, Gentry DR, Burgess RR. In vitro functional characterization of overproduced *Escherichia coli katF/rpoS* gene product. *Biochemistry.* 1993. 32(41): 11112-7.

Nickels BE, Mukhopadhyay J, Garrity SJ, Ebright RH, Hochschild A. The sigma 70 subunit of RNA polymerase mediates a promoter-proximal pause at the *lac* promoter. *Nat Struct Mol Biol.* 2004. 11(6): 544-50

Notley-McRobb L, King T, Ferenci T. *rpoS* mutations and loss of general stress resistance in *Escherichia coli* populations as a consequence of conflict between competing stress responses. *J Bacteriol.* 2002. 184(3): 806-11.

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

Nystrom T. Growth versus maintenance: a trade-off dictated by RNA polymerase availability and sigma factor competition? *Mol Microbiol.* 2004. 54(4): 855-62.

Pagel JM, Hatfield GW. Integration host factor-mediated expression of the *ilvGMEDA* operon of *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1991. 266(3): 1985-96.

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

Pratt LA, Hsing W, Gibson KE, Silhavy TJ. From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 1996. 20(5): 911-7.

Rajkumari K, Gowrishankar J. An N-terminally truncated RpoS (sigma(S)) protein in *Escherichia coli* is active in vivo and exhibits normal environmental regulation even

in the absence of *rpoS* transcriptional and translational control signals. *J Bacteriol.* 2002. 184(12):3167-75.

Rao NN, Roberts MF, Torriani A, Yashphe J. Effect of *glpT* and *glpD* mutations on expression of the *phoA* gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1993. 175(1):74-9.

Rice PA, Yang S, Mizuuchi K, Nash HA. Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell* 1996. 87:1295-1306

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

Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual.* 2001. Cold Spring Harbor, NY. Cold Spring Harbor Laboratory.

Sak BD, Eisenstark A, Touati D. Exonuclease III and the catalase hydroperoxidase II in *Escherichia coli* are both regulated by the *katF* gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989. 86(9): 3271-5.

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

Seong GH, Kobatake E, Miura K, Nakazawa A, Aizawa M. Direct atomic force microscopy visualization of integration host factor-induced DNA bending structure of the promoter regulatory region on the *Pseudomonas* TOL plasmid. *Biochem Biophys Res Commun* 2002. 291: 361-366

Sharp MM, Chan CL, Lu CZ, Marr MT, Nechaev S, Merritt EW, Severinov K, Roberts JW, Gross CA. The interface of sigma with core RNA polymerase is extensive, conserved, and functionally specialized. *Genes Dev.* 1999. 13(22): 3015-26.

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

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

Subbarayan PR, Sarkar M. A comparative study of variation in codon 33 of the *rpoS* gene in *Escherichia coli* K12 stocks: implications for the synthesis of sigma(s). *Mol Genet Genomics.* 2003. 270(6): 533-8.

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

Sundareshwar PV, Morris JT, Koepfler EK, Fornwalt B. Phosphorus limitation of coastal ecosystem processes. *Science.* 2003. 299(5606): 563-5.

Sutton A, Buencamino R, Eisenstark A. *rpoS* mutants in archival cultures of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *J Bacteriol.* 2000. 182(16): 4375-9.

Tanaka K, Takayanagi Y, Fujita N, Ishihama A, Takahashi H. Heterogeneity of the principal sigma factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product, sigma 38, is a second principal sigma factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993. 90(17): 8303.

Torriani A. From cell membrane to nucleotides: the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *Bioessays.* 1990. 12(8): 371-6.

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

Touati E, Dassa E, Boquet PL. Pleiotropic mutations in *appR* reduce pH 2.5 acid phosphatase expression and restore succinate utilisation in CRP-deficient strains of *Escherichia coli*. *Mol Gen Genet.* 1986. 202(2):257-64.

Tsui P, Huang L, Freundlich M. Integration host factor binds specifically to multiple sites in the *ompB* promoter of *Escherichia coli* and inhibits transcription. *J Bacteriol.* 1991. 173(18):5800-7.

Tuveson RW, Jonas RB. Genetic control of near-UV (300-400 NM) sensitivity independent of the *recA* gene in strains of *Escherichia coli* K12. *Photochem Photobiol.* 1979. 30(6):667-76.

Typas A, Hengge R. Differential ability of sigma(s) and sigma70 of *Escherichia coli* to utilize promoters containing half or full UP-element sites. *Mol Microbiol.* 2005. 55(1): 250-60.

Typas A, Hengge R. Role of the spacer between the -35 and -10 regions in sigma promoters selectivity in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2006 59(3):1037-51.

Vrentas CE, Gaal T, Ross W, Ebright RH, Gourse RL. Response of RNA polymerase to ppGpp: requirement for the omega subunit and relief of this requirement by DksA. *Genes Dev.* 2005. 19(19): 2378-87.

Visick JE, Clarke S. RpoS- and OxyR-independent induction of HPI catalase at stationary phase in *Escherichia coli* and identification of *rpoS* mutations in common laboratory strains. *J Bacteriol.* 1997. 179(13): 4158-63.

Wanner B. Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology.* 1996. Neidhardt & others. Washington DC, American Society for Microbiology. P1357-1381.

Weisberg RA, Freundlich M, Friedman D, Gardner J, Goosen N, Nash H, Oppenheim A, Rouviere-Yaniv J. Nomenclature of the genes encoding IHF. *Mol Microbiol.* 1996. 19(3): 642.

Wilson C, Dombroski AJ. Region 1 of sigma70 is required for efficient isomerization and initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *J Mol Biol.* 1997. 267(1): 60-74.

Wise A, Brems R, Ramakrishnan V, Villarejo M. Sequences in the -35 region of *Escherichia coli* *rpoS*-dependent genes promote transcription by E sigma S. *J Bacteriol.* 1996. 178(10):2785-93.

Xu J, Johnson RC. Identification of genes negatively regulated by Fis: Fis and RpoS comodulate growth-phase-dependent gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1995. 177(4):938-47.

Zambrano MM, Kolter R. GASping for life in stationary phase. *Cell.* 1996. 86(2): 181-4.

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

Zhou YN, Walter WA, Gross CA. A mutant sigma 32 with a small deletion in conserved region 3 of sigma has reduced affinity for core RNA polymerase. *J Bacteriol.* 1992. 174(15): 5005-12.

Zhou Y, Gottesman S, Hoskins JR, Maurizi MR, Wickner S. The RssB response regulator directly targets sigma(S) for degradation by ClpXP. *Genes Dev.* 2001. 15(5): 627-37.

8 ANEXOS

A differential effect of σ^S on the expression of the PHO regulon genes of *Escherichia coli*

Natalia Pasternak Taschner,¹ Ezra Yagil² and Beny Spira¹

Correspondence
Beny Spira
benys@usp.br

¹Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Professor Lineu Prestes, 1374, São Paulo-SP CEP:05508-900, Brazil

²Department of Biochemistry, Tel-Aviv University, Tel-Aviv 69978, Israel

The RNA polymerase core associated with σ^S transcribes many genes related to stress or to the stationary phase. When cells enter a phase of phosphate starvation, the transcription of several genes and operons, collectively known as the PHO regulon, is strongly induced. The promoters of the PHO genes hitherto analysed are recognized by σ^D -associated RNA polymerase. A mutation in the gene that encodes σ^S , *rpoS*, significantly increases the level of alkaline phosphatase activity and the overproduction of σ^S inhibits it. Other PHO genes such as *phoE* and *ugpB* are likewise affected by σ^S . In contrast, *pstS*, which encodes a periplasmic phosphate-binding protein and is a negative regulator of PHO, is stimulated by σ^S . The effect of σ^S on the PHO genes is at the transcriptional level. It is shown that a cytosine residue at position -13 is important for the positive effect of σ^S on *pst*. The interpretation of these observations is based on the competition between σ^S and σ^D for the binding to the core RNA polymerase.

Received 27 February 2004
Revised 31 May 2004
Accepted 14 June 2004

INTRODUCTION

The RNA polymerase holoenzyme of *Escherichia coli* is formed by the subunits α , β , β' and ω that compose the core of the enzyme and a σ subunit. The σ subunit, or σ factor, is responsible for promoter recognition and transcription initiation, while the core enzyme executes transcription elongation. Seven different σ factors have been identified in *E. coli*. The two most important ones are σ^D (also known as σ^{70}) and σ^S (or σ^{38}). σ^D , when associated with the core enzyme ($E\sigma^D$), initiates transcription of the majority of the *E. coli* genes while $E\sigma^S$ recognizes promoters and initiates transcription of genes associated with stationary phase survival and with the response to different stresses, such as osmolarity, pH and temperature shifts (Hengge-Aronis, 2000). More than 70 σ^S -dependent genes have so far been identified and more will probably be found in the future (Hengge-Aronis, 2002a).

$E\sigma^D$ and $E\sigma^S$ recognize similar promoter sequences (Wise *et al.*, 1996; Espinosa-Urgel *et al.*, 1996; Gaal *et al.*, 2001; Lee & Gralla, 2001) and *in vitro* studies have shown that many genes are transcribed by both $E\sigma^D$ and $E\sigma^S$ (Nguyen *et al.*, 1993; Tanaka *et al.*, 1993; Kusano *et al.*, 1996; Colland *et al.*, 2000; Bordes *et al.*, 2000), indicating that there is some overlap in promoter recognition by the two sigma factors. However, despite the similarities in promoter recognition *in vitro*, the two sigma factors are normally able to distinguish *in vivo* between σ^D - and σ^S -dependent

promoters. No significant differences were found in the consensus sequence of the σ^D - and σ^S -dependent -35 elements (Becker & Hengge-Aronis, 2001; Lee & Gralla, 2001) except that the -35 region in σ^S promoters can be more degenerate than in σ^D promoters (Gaal *et al.*, 2001), suggesting that $E\sigma^S$ interacts weakly or not at all with the -35 element. *In vitro* selection of an optimized σ^S promoter ended with identical consensus elements that agree with those of σ^D -dependent promoters, both in the -10 and -35 positions (Gaal *et al.*, 2001). However, a compilation of 41 σ^S -dependent promoters has led to the consensus CTACACT at positions -13 to -7 (Lee & Gralla, 2001) and another compilation of 56 promoters reached the consensus TG(n)₀₋₂CYATACT (Lacour *et al.*, 2003). These studies have revealed that over 80% of the natural σ^S -controlled promoters possess a cytosine at the -13 position (Espinosa-Urgel *et al.*, 1996; Becker & Hengge-Aronis, 2001).

The PHO regulon of *E. coli* consists of more than 40 genes and operons whose transcription is induced under conditions of inorganic phosphate (Pi) starvation and that are related to the uptake and assimilation of Pi and phosphorylated compounds. The best characterized ones are *phoA*, *phoE*, the *pst* operon and the *ugp* operon, which encode, respectively, alkaline phosphatase (AP), the anion porin PhoE, the Pi transporter Pst and the glycerol-3-phosphate transporter Ugp. Apart from its role as a Pi-transporter, the Pst system also functions as a negative regulator of the PHO regulon, because most mutations in the *pst* operon lead to the constitutive synthesis of all PHO genes (Wanner, 1996). The promoters of the PHO genes display one or more

Abbreviations: AP, alkaline phosphatase; CAT, chloramphenicol acetyl transferase.

consensus regulatory sequences known as PHO-boxes that replace the -35 element. Transcription is regulated by a two-component system that is composed of the proteins PhoB and PhoR. When the concentration of Pi in the medium decreases below a certain level, the sensor protein PhoR auto-phosphorylates and transfers the Pi group to the regulatory protein PhoB, which in turn binds to the PHO-boxes and allows transcription of the PHO genes by interacting with σ^D (Wanner, 1996; Makino *et al.*, 1996).

In preliminary experiments we have noticed that in *rpoS* mutants the expression of AP was considerably stronger than in the wild-type strain, implying that σ^S is involved in the regulation of AP. Here we demonstrate that σ^S negatively affects the expression of *phoA*, *phoB*, *phoE* and *ugpB*, but not *pstS*. The competition between σ^S and σ^D for the core RNA polymerase is proposed to explain this differential effect of σ^S on the expression of the PHO genes.

METHODS

Strains and plasmids. These are listed in Table 1.

Growth media and growth conditions. The rich medium was LB (Miller, 1992). Medium A is a semi-rich medium that is low in Pi (Levinthal *et al.*, 1962). T-salts medium is a Tris-buffered minimal medium supplemented with 0.4% glucose (Echols *et al.*, 1961) that contains either 1 mM KH_2PO_4 in the high-Pi minimal medium or 0.1 mM KH_2PO_4 in the low-Pi minimal medium. For the assay of the kinetics of AP induction, cells were grown in a high-Pi minimal medium until they reached an OD_{540} of 0.2–0.3. They were then washed and resuspended in a minimal low-Pi medium. Samples were taken at 30 min intervals for AP assays. For RNA extraction, a 20 ml sample was taken from bacteria growing in minimal high-Pi medium and a second sample was taken from a culture grown for 2 h in minimal low-Pi medium. For the assays of AP and chloramphenicol acetyl transferase (CAT), cells were grown overnight in medium A, and in medium A supplemented with 1 mM KH_2PO_4 .

PCR amplifications. The *rpoS* fragment was amplified using genomic DNA extracted from strain MG1655 as template and the oligonucleotides *rpoS*⁺ (ATACTGCAGGCAGCAAAGGACAGG) and *rpoS*⁻ (CGTCGCGGCTGAAGCTTACAACAC). Bold letters indicate restriction sites. The DNA fragments used as probes for *phoA*, *phoB*, *phoE*, *pstS* and *ugpB* were amplified as above using the oligonucleotides *phoA*⁺ (CAGCATTCTGCAGACGATAC) and *phoA*⁻ (GATCAAGCTTAATGTATTTGTACATGGAGAA), *phoB*⁺ (TCAAACACCTCAAGCGCGAG) and *phoB*⁻ (GCTCCAGTGCTT-TACGCA), *phoE*⁺ (ACCTGGGGGCGTTGTATGAC) and *phoE*⁻ (TTGGTGGGATCTGAGTTGGTAT), *pstS*⁺ (CTTCCCTGCGCCG-TGTATGC) and *pstS*⁻ (TCAGCGGAGATCAGTTTGGTGT) and *ugpB*⁺ (GACGCGGTGCTGGAGTTCAATA) and *ugpB*⁻ (CCGC-CCCTGGGTTTTTCTCATA), respectively.

Plasmid construction. Plasmids pNP1 and pNP5 were constructed by digesting the *rpoS* PCR fragment with *Pst*I and *Hind*III followed by ligation to the same sites of plasmids pKK223-3 and pACT3, respectively. Plasmid pBS11 was constructed by digesting a *pst* PCR fragment with *Dra*I and *Bst*YI followed by ligation to pKK232-8 digested with *Sma*I and *Bam*HI.

Enzyme assays. AP was assayed using *p*-nitrophenyl-phosphate (*p*-NPP) as substrate as described by Spira *et al.* (1995). AP-specific activity is represented by the increase in absorbance at 410 nm min^{-1} (cell density)⁻¹. Catalase activity was measured qualitatively by mixing 50 μ l cells (OD_{540} = 3.0) with 50 μ l 3% hydrogen peroxide and observing the appearance of bubbles caused by the release of O_2 . CAT assays were performed essentially as described by Shaw (1975). Cells were disrupted by sonication and protein concentration was determined by the method of Bradford (1976). The substrate was 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) together with acetyl-CoA and chloramphenicol in a total volume of 500 μ l. The reaction was started by adding chloramphenicol at a final concentration of 0.1 mM to a cuvette containing 0.4 mg DTNB, 0.5 mM acetyl-CoA and cell extract. The absorbance increase rate at 412 nm was recorded. CAT activity was calculated as nmoles min^{-1} (mg protein)⁻¹.

RNA extraction and Northern-blot analysis. RNA was extracted by the guanidine thiocyanate method, as described by Chomczynski & Sacchi (1987). RNA (20 μ g) was electrophoresed in a 1% agarose

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strain	Genotype	Source
BS7	MG1655 Δ (<i>pstSCAB-phoU</i>) 560:: <i>KmR</i>	Spira <i>et al.</i> (1995)
BS16	MG1655 <i>rpoS</i> ::Tn10 (P1 transduction from RH90 into MG1655)	This work
BW17335	DE3(<i>lac</i>)X74 Δ (<i>pstCAB-phoU</i>) 560:: <i>kan</i>	Steed & Wanner (1993)
MG1655	Wild-type <i>E. coli</i> K-12	Lab collection
NP34	BS16 Δ (<i>pstSCAB-phoU</i>) 560:: <i>KmR</i> (P1 transduction from BW17335 into BS16)	This work
RH90	MC4100 <i>rpoS</i> ::Tn10	Lange & Hengge-Aronis (1991)
Plasmids		
pACT3	Cloning vector	Dykxhoorn <i>et al.</i> (1996)
pBS11	<i>pstS</i> - <i>cat</i> transcriptional fusion	This work
pKK223-3	Cloning vector	Amersham Pharmacia Biotech
pKK232-8	Cloning vector	Amersham Pharmacia Biotech
pMRG7	<i>rpoD</i> ⁺ cloned under <i>Ptac</i>	R. Burgess
pNP1	<i>rpoS</i> ⁺ cloned in pKK223-3 under <i>Ptac</i>	This work
pNP5	<i>rpoS</i> ⁺ cloned in pACT3 under <i>Ptac</i>	This work
pNP6	pBS11 that carries a -13 C→T transition in the <i>pstS</i> promoter	This work
pRPOD	<i>rpoD</i> ⁺ in pBR322	K. Makino

gel containing 7% formaldehyde for 3 h. The RNA was transferred to a nylon membrane by capillary action. Probes for *phoA*, *phoB*, *phoE*, *pstS* and *ugpB* were synthesized with [α - 32 P]dCTP by random primer labelling using the DNA fragments obtained by PCR, as described above. For synthesis of the *rpoD* probe, a 1.5 kb fragment digested from plasmid pRPOD with *Bam*HI and *Sac*I was used. The labelled probes were hybridized with the membranes at 42 °C for 16–20 h and the membranes were exposed to X-ray films.

Site-directed mutagenesis and DNA sequencing. Site-directed mutagenesis was performed by the circular mutagenesis method, using double stranded DNA templates and selection with *Dpn*I, as described by Sambrook & Russell (2001). Plasmid pBS11, carrying a *pstS-cat* fusion, was used as a template for the PCR reaction. The oligonucleotides *pstSmut*+ (CTGTCACCTGTTTGTCTTATTTGCTTCTCGTAGCCAACAAC) and *pstSmut*- (GTTTGTGGCTAGGAGCAAATAAGACAAACAGGTGACAG) contain the desired mutation (underlined). The product of the amplification was treated with *Dpn*I and transformed into strains MG1655 and BS16. Both wild-type and mutated plasmids were sequenced in an automatic sequencer type ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems/Hitachi) to confirm the presence of the point mutation.

RESULTS

Effect of *rpoS* inactivation on AP synthesis

Overnight-grown cultures of the wild-type strain (MG1655) and its isogenic *rpoS*::Tn10 mutant (BS16) grown in excess or limited Pi media were assayed for AP activity. As expected, cells grown in limited Pi expressed high levels of AP (Fig. 1) while cells grown in excess Pi media showed only a basal level of AP activity that did not exceed a specific activity of 0.015 (not shown). The *rpoS* mutation caused a threefold increase in AP activity (bar b) when compared to the wild-type strain (bar a), indicating that σ^S negatively affected the expression of AP. When a multicopy plasmid that carries the wild-type *rpoS*⁺ gene under the control of the *tac* promoter (plasmid pNP1) was introduced into the wild-type strain (bar c) and into the *rpoS* mutant (bar d), the

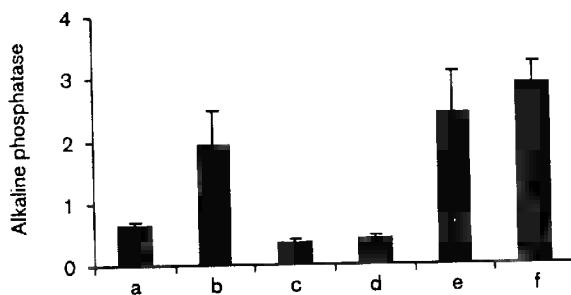


Fig. 1. Effect of *rpoS* on AP activity. Cells were grown overnight in medium A and assayed for AP activity. Bars: a, wild-type (strain MG1655); b, *rpoS*::Tn10 (strain BS16); c, wild-type transformed with *prpoS*⁺ (plasmid pNP1); d, *rpoS*::Tn10 transformed with pNP1; e, wild-type transformed with *prpoD*⁺ (plasmid pMRG7); f, *rpoS*::Tn10 transformed with pMRG7. Bars represent the means \pm SE of at least four independent experiments.

level of AP activity dropped to approximately half the level of the wild-type parent, suggesting that an excess of σ^S inhibited AP expression. Introducing plasmid pMRG7, which overexpresses *rpoD*⁺, into the wild-type (bar e) and the *rpoS* mutant (bar f) increased AP activity by 3.7- and 1.5-fold above the level of their untransformed parents, respectively. The elevated expression of AP in the presence of the multicopy *rpoD*⁺ plasmid supports a previous observation that *phoA* transcription is driven by $E\sigma^D$ (Makino *et al.*, 1993).

The concentration of σ^S is known to increase progressively in cells that enter the stationary growth phase and in cells that undergo carbon or Pi-starvation (Hengge-Aronis, 1993; Gentry *et al.*, 1993; Ruiz & Silhavy, 2003). To test at what stage of the Pi-starvation process σ^S affects the expression of AP, exponentially growing cultures of the wild-type strain, *rpoS*::Tn10 mutant and its transformant carrying plasmid pNP5 (*rpoS*⁺ under the control of *Ptac* and the *lacI*^q allele that overproduces the *Ptac* repressor LacI) were suspended in a low-Pi minimal medium and monitored for AP activity for several hours (Fig. 2). All of them entered the Pi-starvation phase between 30 and 60 min as seen by the induction of AP and the subsequent deceleration of the growth rate (insert). The induced enzyme activity of the wild-type strain reached its maximal level at 90 min (Fig. 2, \blacklozenge), while the activity of the *rpoS* mutant kept rising and reached a threefold increase over the wild-type at 210 min (Fig. 2, \blacksquare). The data suggest that at the early starvation phase (as of 90 min) the amount of σ^S in the cell was already sufficient to prevent further induction of AP. The pNP5 transformant showed a similar pattern of AP induction even in the absence of the inducer (IPTG), suggesting that the *tac* promoter was sufficiently leaky to suppress the effect

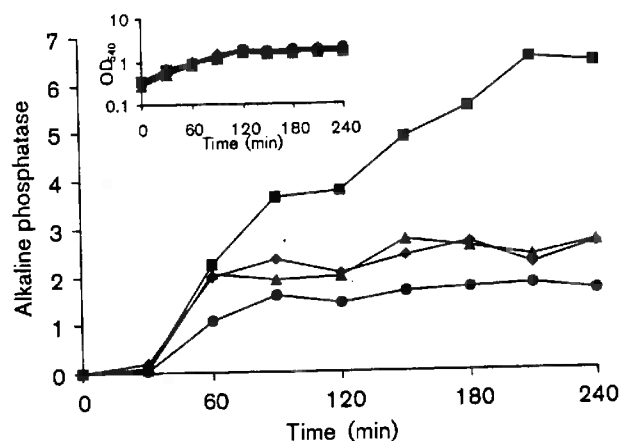


Fig. 2. Kinetics of the effect of *rpoS* on AP activity during Pi starvation. Exponential-phase cells were suspended in a low-Pi minimal medium and monitored for growth (insert) and AP activity. Wild-type strain (\blacklozenge); *rpoS*::Tn10 (\blacksquare); *rpoS*⁺ plasmid pNP5 in *rpoS*::Tn10 without IPTG (\blacktriangle) and with 100 μ M IPTG (\bullet).

of the *rpoS* mutation (Fig. 2, ▲). However, the presence of 100 μ M IPTG caused a further inhibition of AP activity from the very beginning of the starvation phase (Fig. 2, ●). These results indicate that the negative effect of σ^S on AP synthesis has already begun at the early Pi-starvation phase and that it is stronger when σ^S is overexpressed.

***rpoS* inhibits AP expression in non-starved cells**

To test if σ^S is able to inhibit AP expression of non-starved cells, the *rpoS::Tn10* mutation was introduced into a strain that carries a deletion of the entire *pst* operon (strain NP34). This is a constitutive mutant that produces AP independently of the external Pi concentration. Samples were withdrawn every hour from cultures of this mutant and of its *rpoS*⁺ parent grown in LB medium (a medium that contains excess Pi). The samples were assayed for growth rate, for AP activity and for catalase activity. Synthesis of catalase (encoded by *katE*) is strongly dependent on the presence of σ^S (Schellhorn *et al.*, 1998). The insert in Fig. 3(a) shows that both strains grew exponentially for the first 120 min and entered the stationary phase thereafter. Fig. 3(a) shows that during the first 120 min of exponential growth, both strains presented a similar level of constitutive AP activity. Upon entry into the stationary phase, cells growth was drastically reduced and in the *rpoS*⁺ strain the enhanced formation of E σ^S polymerase led to the expression of genes related to cell survival, such as catalase, and caused the arrest of AP synthesis. Due to its

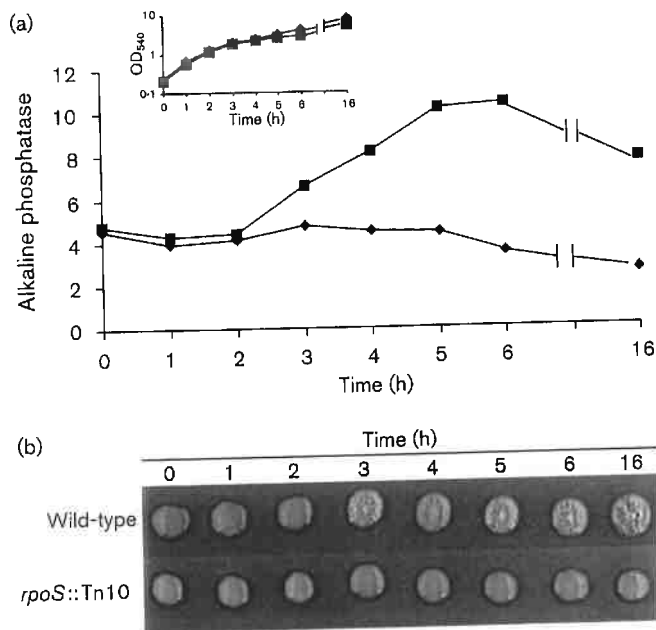


Fig. 3. Effect of *rpoS* on AP activity of PHO-constitutive non-starved cells. Exponential growing cells BS7 (Δ *pst*; ◆) and NP34 (Δ *pst rpoS::Tn10*; ■) were suspended in LB medium and monitored for growth (insert), for AP activity (a) and for catalase activity, which is observed by the bubbled spots (b).

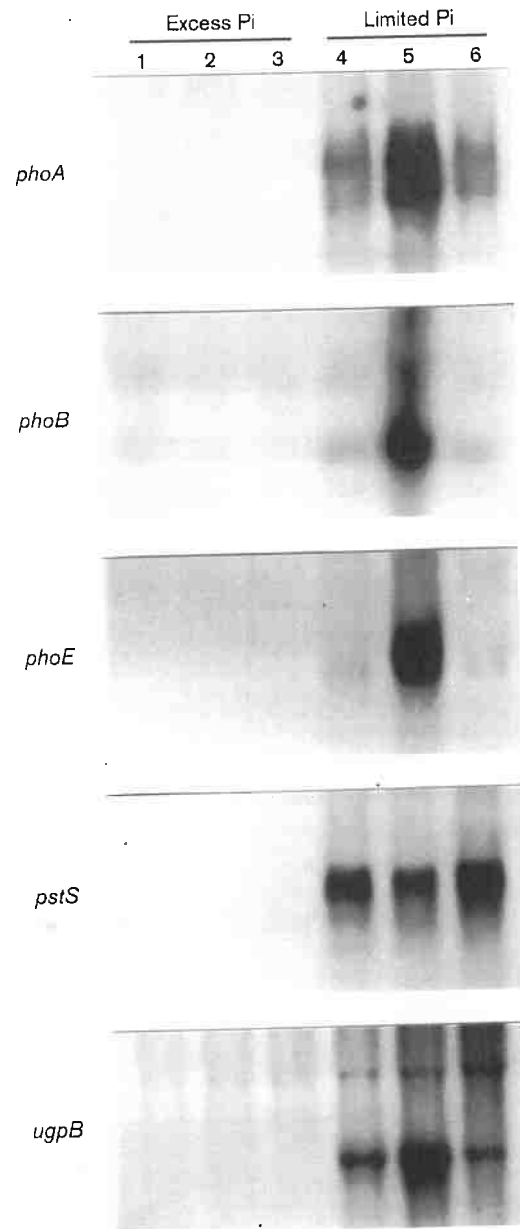


Fig. 4. Effect of *rpoS* on the mRNA level of *phoA*, *phoB*, *phoE*, *pstS* and *ugpB*. Exponential-phase wild-type cells (strain MG1655), *rpoS::Tn10* mutant (strain BS16) and the *rpoS* mutant transformed with plasmid pNP1 were resuspended in medium A supplemented or not with Pi and grown for 2 h. RNA was extracted and probed with labelled *phoA*, *phoB*, *phoE*, *pstS* and *ugpB* DNA fragments as described in Methods. To confirm that equal amounts of RNA were applied to the gels, the membranes were stripped and rehybridized with a labelled *rpoD* probe (not shown). Lanes 1 and 4, wild-type; 2 and 5, *rpoS::Tn10*; 3 and 6, plasmid pNP1 (*rpoS*⁺) in *rpoS::Tn10*. Lanes 1–3, cells grown in excess Pi; 4–6, cells grown in limited Pi.

strong stability (Torriani, 1960) the activity of AP remained constant. The slight and gradual decline of its specific activity [EU (cell density)⁻¹] is due to the gradual increase in the optical density of the stationary cells (see insert). In contrast, in the *rpoS*⁻ cells, no σ^S is formed to compete with σ^D , and many of the $E\sigma^D$ -dependent housekeeping genes cease to transcribe, providing excess $E\sigma^D$ available for the increased expression of AP that is evident in these cells. The appearance of catalase activity at the onset of the stationary phase (Fig. 3b) testifies to the induction of σ^S . These results demonstrate that σ^S down-regulates AP expression also in the presence of excess Pi and therefore this inhibition is not related to the mechanism of PHO induction by Pi-starvation.

rpoS inhibits the transcription of *phoA*, *phoB*, *phoE* and *ugp* but not that of *pst* mRNA

To test whether the effect of σ^S on AP is at the transcriptional level and if the expression of other genes that belong to the PHO regulon are also affected by σ^S , Northern blot analyses were conducted. DNA probes that are specific for the genes *phoA*, *phoB*, *phoE*, *pstS* and *ugpB* were hybridized with RNA extracted from Pi-starved and from non-starved wild-type cells, *rpoS*::Tn10 mutants and *rpoS*::Tn10 mutants transformed with a *prpoS*⁺ plasmid (pNP1). Fig. 4 shows that, as expected, all probes strongly hybridized with mRNA extracted from Pi-starved cells (lanes 4, 5 and 6), while no signal was detected from hybridization of the probes with mRNA extracted from cells grown in excess Pi (lanes 1, 2 and 3). The signals corresponding to *phoA*, *phoB*, *phoE* and *ugpB* were significantly stronger in the *rpoS* mutant (lane 5 as compared to the wild-type lane 4) and were reduced by the overexpression of *rpoS* (lane 6), indicating that the negative effect on σ^S is at the transcriptional level. In contrast, the signal corresponding to *pstS* was moderately weaker in the *rpoS* mutant than in the wild-type and slightly stronger in the presence of the multicopy plasmid that expresses σ^S . These results suggest that σ^S inhibits the transcription of *phoA*, *phoB*, *phoE* and *ugp* and moderately stimulates the transcription of *pstS*.

A cytosine residue at position -13 is important for σ^S recognition of the *pst* promoter

The inconsistency between *pstS* and the other PHO genes with regard to their response to σ^S may reflect sequence differences in their promoters. PHO promoters are devoid of a -35 sequence, carrying one or more PHO-boxes instead. The -10 regions of all known PHO promoters are depicted in Fig. 5. *phoA*, *phoE*, *phnC*, *psiE* and *ugpB* all carry a thymine residue at position -13, *phoH* has an adenine and *phoB* a guanine residue, while *pstS* carries a cytosine at that position. Previous reports have suggested that promoters carrying a C residue at position -13 are preferred by $E\sigma^S$ (Espinosa-Urgel *et al.*, 1996; Bordes *et al.*, 2000; Gaal *et al.*, 2001; Becker & Henge-Aronis, 2001; Lee & Gralla, 2001). Therefore, the presence of the -13C residue might confer on the *pst* operon the ability to be transcribed also by $E\sigma^S$ explaining why, in contrast to the other PHO genes, the expression of *pstS* is reduced rather than induced by the *rpoS* mutation.

To test this hypothesis, the promoter of *pstS*, the first gene of the *pst* operon and which governs the transcription of the entire operon (Aguena *et al.*, 2002), was cloned in plasmid pKK232-8, creating an operon fusion between the *pstS* promoter and the reporter gene that encodes CAT (*cat*, plasmid pBS11). The -13 cytosine residue of the *pst* promoter in this fusion was replaced by a thymine by site-directed mutagenesis (plasmid pNP6). Both plasmids were transformed into the wild-type strain (MG1655) and into its isogenic *rpoS*::Tn10 mutant. The transformants were grown overnight under limited Pi concentrations and in excess Pi and were assayed for AP and CAT activity. Fig. 6 depicts the ratios of enzyme activities between the *rpoS* mutant and the wild-type strain transformants, grown under conditions of Pi-starvation. As before, AP activity was twofold higher in the *rpoS* mutant than in the wild-type (bar a). CAT activity that represents the wild-type *pstS* promoter (-13C) was 25% lower in the *rpoS* mutant when compared to its *rpoS*⁺ parent (bar c), confirming the lower *pstS* mRNA level in the absence of σ^S (Fig. 4). In contrast, the modified promoter where the -13C residue

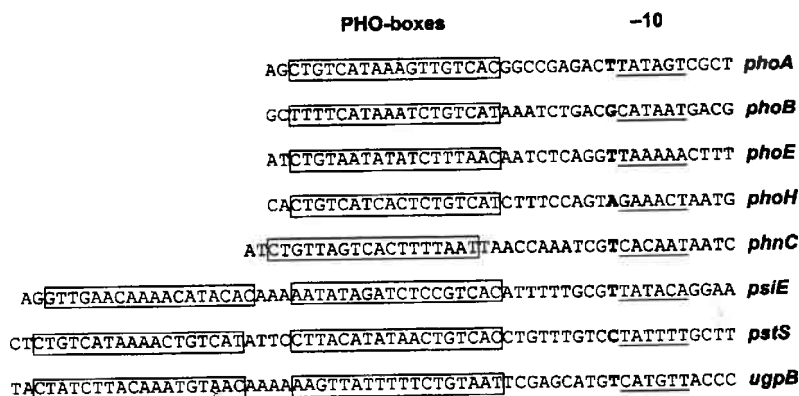


Fig. 5. DNA sequences of PHO promoters. The PHO-boxes are framed and the -10 sequences are underlined. The -13 position is in bold.

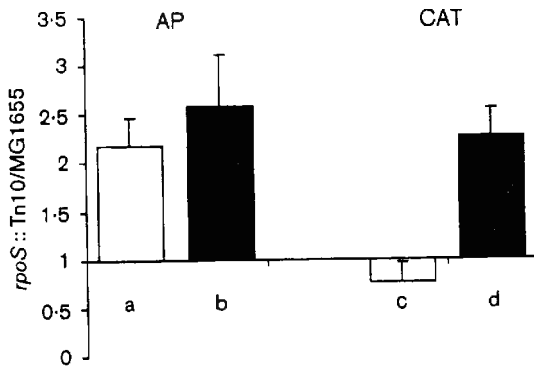


Fig. 6. Effect of *rpoS* on AP and CAT activities in strains carrying a plasmid with a $-13T$ mutation in the promoter region of *pstS*. Cells were grown overnight in medium A and assayed for AP and CAT. Bars represent the enzyme levels of the *rpoS*::Tn10 mutant (strain BS16) divided by those of the wild-type strain (strain MG1655). Bars a and c, strains carrying the wild-type *pst* promoter (plasmid pBS11, $-13C$); b and d, strains carrying the mutated ($-13T$) *pst* promoter (pNP6). Each bar represents the mean \pm SE of at least five independent experiments.

was replaced by a T ($-13T$) showed more than a twofold increase in CAT activity in the *rpoS* mutant (bar d) that was similar to the stimulation of AP activity (bar b). Thus, the C \rightarrow T transition at the -13 position of the *pst* promoter caused it to act like the promoters of *phoA*, *phoE* and *ugp*. Under excess Pi the cells showed only low basal levels of both enzymes, indicating that transcription of the mutant *pstS* is also PhoB-dependent (not shown). These results suggest that the presence of a $-13C$ residue in the *pst* promoter is important for σ^S recognition of this promoter and below we present an evolutionary rationale to this observation.

DISCUSSION

Phosphorus limitation is very common in natural environments (Barik *et al.*, 2001; Sundareshwar *et al.*, 2003); hence the PHO regulon of bacteria growing in their natural habitats should be constantly expressed. The activation of the general stress response controlled by σ^S is also frequent in nature (Hengge-Aronis, 2002b). At first sight, the molecular mechanisms used by bacteria to protect themselves against both types of stress should be compatible, if not synergistic. However, during its evolution, *E. coli* developed two separate and apparently antagonistic mechanisms to cope with each type of stress, the σ^S regulon and the PHO regulon. When cells enter the Pi-starvation phase, the PHO regulon is activated and σ^S starts to accumulate in the cytosol (Gentry *et al.*, 1993; Wanner, 1996; Ruiz & Silhavy, 2003). The simultaneity of these events creates a situation where, on one hand, the PHO genes, whose expression is σ^D -dependent, demand their own transcription and, on the other hand, σ^S accumulates

and competes with σ^D for the core RNA polymerase. Thus, in this case there is no apparent benefit from the competition between the sigma factors and therefore it is paradoxical that σ^S , which controls the general cell response to stress, inhibits the expression of genes related to phosphate starvation.

In *E. coli*, σ^S and the alarmone guanosine tetraphosphate (ppGpp) are the key factors that promote the transition from growth proliferation to stasis, where proteins related to protection against the deleterious effects of oxidation are expressed. This led to the suggestion that there is a trade-off between bacterial survival and proliferation, such that the expression of genes encoding proteins involved in cell growth is inhibited by factors that promote survival and vice-versa (Nyström, 2003). The PHO regulon genes, whose function is to acquire and assimilate Pi in order to restore cell growth, are inhibited by σ^S whose main concern is with the expression of genes related to cell survival. The competition between σ^S and σ^D for the core RNA polymerase inhibits the σ^D -transcribed PHO genes either directly or indirectly via the σ^S -promoted inhibition of the positive regulator PhoB.

Unlike all other PHO genes tested, *pstS* was somewhat stimulated by the induction of σ^S . In addition to its role in Pi transport the *pst* operon also serves as a negative regulator of the PHO genes (Wanner, 1996). Moreover, its promoter carries a feature shared by many σ^S -promoters (Hengge-Aronis, 2000), namely, the presence of a functional IHF binding site that helps elevate its expression and thereby reduce the expression of AP (Spira & Yagil, 1999). The *pst* promoter is the only one of eight known PHO promoters that possesses a cytosine residue at the -13 position (Fig. 5). Our results suggest that *pst* may be transcribed *in vivo* by both $E\sigma^D$ and $E\sigma^S$, and that the other PHO genes are transcribed only by $E\sigma^D$. Is there a teleological reason for the differential behaviour of *pstS* in relation to the other PHO genes? Being a negative regulator of PHO, an increase in Pst expression would reduce the transcription of the other PHO genes that are driven by σ^D , thereby providing more RNA polymerase core enzyme to interact with σ^S . As a result, σ^S -dependent genes that are important to bacterial survival during stress could be more readily transcribed. In such a trade-off way, the controlled repression of the PHO genes by Pst might be beneficial for cell survival during prolonged Pi starvation periods. The negative effect of *rpoS* on gene expression as a result of σ^S competition against σ^D was already reported for other σ^D -transcribed systems. These include the glucose transport-related genes *mal* and *mgl* (Notley-McRobb *et al.*, 2002), the type 1 fimbrial genes *fimA* and *fimB* (Dove *et al.*, 1997), *ompF* (Pratt *et al.*, 1996), the stress-induced gene *uspA* (Farewell *et al.*, 1998) and several other genes that were found to be hyperexpressed in the absence of a functional σ^S (Xu & Johnson, 1995; Farewell *et al.*, 1998).

Ruiz & Silhavy (2003) have recently shown that in a *pstS* mutant that causes PHO constitutivity σ^S is already strongly

expressed in the exponential growth phase. The results shown in Fig. 3(b), where σ^S -dependent catalase activity was induced only upon entry into the stationary phase, suggest that even if σ^S is expressed at high levels in the exponential phase in PHO-constitutive mutants, it is not able to induce the synthesis of σ^S -dependent promoters. Also, there was no significant difference in the level of AP between the wild-type and the *rpoS* mutant during the exponential phase (Fig. 3a). Kvint *et al.* (2000) have demonstrated that σ^S -dependent promoters require ppGpp for induction in the stationary phase, but PHO-constitutive mutants present a low level of ppGpp in the exponential phase of growth (Spira *et al.*, 1995). Thus, if σ^S is present in the exponential phase, it is probably inactive.

In conclusion, we have shown that σ^S negatively affects the expression of several PHO genes, but not that of the *pst* operon. We suggest that this effect is due to a competition between σ^S and σ^D for the core RNA polymerase. Since the PHO genes are transcribed by $E\sigma^D$, accumulation of σ^S in the cytosol during the starvation phase reduces their transcription. In contrast, *pst*, which is also a negative regulator of PHO, may be transcribed by both σ^S and σ^D . Through this mechanism the PHO regulon has evolved to maintain a trade-off balance between cell nutrition and cell survival during severe Pi-starvation stress.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). E. Y. was supported by the Kurt Lion Foundation. We thank Barry Wanner, Mike Cashel, Regine Hengge-Aronis and Kozo Makino for supplying strains.

REFERENCES

- Aguena, M., Yagil, E. & Spira, B. (2002). Transcriptional analysis of the *pst* operon of *Escherichia coli*. *Mol Genet Genomics* **268**, 518–524.
- Barik, S. K., Prurshothaman, C. S. & Mohanty, A. N. (2001). Phosphatase activity with reference to bacteria and phosphorus in tropical freshwater aquaculture pond systems. *Aquac Res* **32**, 819–832.
- Becker, G. & Hengge-Aronis, R. (2001). What makes an *Escherichia coli* promoter σ^S dependent? Role of the -13/-14 nucleotide promoter positions and region 2.5 of σ^S . *Mol Microbiol* **39**, 1153–1165.
- Bordes, P., Repoila, F., Kolb, A. & Gutierrez, C. (2000). Involvement of differential efficiency of transcription by $E\sigma^S$ and $E\sigma^{70}$ RNA polymerase holoenzymes in growth phase regulation of the *Escherichia coli* *osmE* promoter. *Mol Microbiol* **35**, 845–853.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248–254.
- Chomczynski, P. & Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate phenol chloroform extraction. *Anal Biochem* **162**, 156–159.
- Colland, F., Barth, M., Hengge-Aronis, R. & Kolb, A. (2000). σ factor selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase: role for CRP, IHF and *lrp* transcription factors. *EMBO J* **19**, 3028–3037.
- Dove, S. L., Smith, S. G. & Dorman, C. J. (1997). Control of *Escherichia coli* type 1 fimbrial gene expression in stationary phase: a negative role for RpoS. *Mol Gen Genet* **254**, 13–20.
- Dykxhoorn, D. M., St Pierre, R. & Linn, T. (1996). A set of compatible *tac* promoter expression vectors. *Gene* **177**, 133–136.
- Echols, H., Garen, A., Garen, S. & Torriani, A. (1961). Genetic control of repression of alkaline phosphatase in *E. coli*. *J Mol Biol* **3**, 425–438.
- Espinosa-Urgel, M., Chamizo, C. & Tormo, A. (1996). A consensus structure for σ^S -dependent promoters. *Mol Microbiol* **21**, 657–659.
- Farewell, A., Kvint, K. & Nyström, T. (1998). Negative regulation by RpoS: a case of sigma factor competition. *Mol Microbiol* **29**, 1039–1051.
- Gaal, T., Ross, W., Estrem, S. T., Nguyen, L. H., Burgess, R. R. & Gourse, R. L. (2001). Promoter recognition and discrimination by $E\sigma^S$ RNA polymerase. *Mol Microbiol* **42**, 939–954.
- Gentry, D. R., Hernandez, V. J., Nguyen, L. H., Jensen, D. B. & Cashel, M. (1993). Synthesis of the stationary-phase sigma factor σ^S is positively regulated by ppGpp. *J Bacteriol* **175**, 7982–7989.
- Hengge-Aronis, R. (1993). Survival of hunger and stress: the role of *rpoS* in early stationary phase gene regulation in *E. coli*. *Cell* **72**, 165–168.
- Hengge-Aronis, R. (2000). The general stress response in *Escherichia coli*. In *Bacterial Stress Responses*, pp. 161–178. Edited by G. Storz & R. Hengge-Aronis. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Hengge-Aronis, R. (2002a). Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the σ^S (RpoS) subunit of RNA polymerase. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 373–395.
- Hengge-Aronis, R. (2002b). Stationary phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter σ^S -selective? *Curr Opin Microbiol* **5**, 591–595.
- Kusano, S., Ding, Q., Fujita, N. & Ishihama, A. (1996). Promoter selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase $E\sigma^{70}$ and $E\sigma^{38}$ holoenzymes. Effect of DNA supercoiling. *J Biol Chem* **271**, 1998–2004.
- Kvint, K., Farewell, A. & Nyström, T. (2000). RpoS-dependent promoters require guanosine tetraphosphate for induction even in the presence of high levels of σ^S . *J Biol Chem* **275**, 14795–14798.
- Lacour, S., Kolb, A. & Landini, P. (2003). Nucleotides from -16 to -12 determine specific promoter recognition by bacterial σ^S -RNA polymerase. *J Biol Chem* **278**, 37160–37168.
- Lange, R. & Hengge-Aronis, R. (1991). Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**, 49–59.
- Lee, S. J. & Gralla, J. D. (2001). Sigma38 (*rpoS*) RNA polymerase promoter engagement via -10 region nucleotides. *J Biol Chem* **276**, 30064–30071.
- Levinthal, C., Signer, E. R. & Fetherolf, K. (1962). Reactivation and hybridization of reduced alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **48**, 1230–1237.
- Makino, K., Amemura, M., Kim, S. K., 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.
- Makino, K., Amemura, M., Kawamoto, T., Kimura, S., Shinagawa, H., Nakata, A. & Suzuki, M. (1996). DNA binding of PhoB and its interaction with RNA polymerase. *J Mol Biol* **259**, 15–26.
- Miller, J. H. (1992). *A Short Course in Bacterial Genetics: a Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

- Nguyen, L. H., Jensen, D. B., Thompson, N. E., Gentry, D. R. & Burgess, R. R. (1993). *In vitro* functional characterization of overproduced *Escherichia coli* *katE/rpoS* gene product. *Biochemistry* **32**, 11112–11117.
- Notley-McRobb, L., King, T. & Ferenci, T. (2002). *rpoS* mutations and loss of general stress resistance in *Escherichia coli* populations as a consequence of conflict between competing stress responses. *J Bacteriol* **184**, 806–811.
- Nyström, T. (2003). Conditional senescence in bacteria: death of the immortals. *Mol Microbiol* **48**, 17–23.
- Pratt, L. A., Hsing, W., Gibson, K. E. & Silhavy, T. J. (1996). From acids to *osmZ*: multiple factors influence synthesis of the OmpF and OmpC porins in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **20**, 911–917.
- Ruiz, N. & Silhavy, T. J. (2003). Constitutive activation of the *Escherichia coli* Pho regulon upregulates *rpoS* translation in an Hfq-dependent fashion. *J Bacteriol* **185**, 5984–5992.
- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schellhorn, H. E., Audia, J. P., Wei, L. I. & Chang, L. (1998). Identification of conserved, RpoS-dependent stationary-phase genes of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**, 6283–6291.
- Shaw, W. V. (1975). Chloramphenicol acetyltransferase from chloramphenicol-resistant bacteria. *Methods Enzymol* **43**, 737–755.
- Spira, B. & Yagil, E. (1999). The integration host factor (IHF) affects the expression of the phosphate-binding protein and of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* **38**, 80–85.
- 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, P. M. & Wanner, B. L. (1993). Use of the *rep* technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in the phosphate regulon. *J Bacteriol* **175**, 6797–6809.
- Sundareshwar, P. V., Morris, J. T., Koepfler, E. K. & Fornwalt, B. (2003). Phosphorus limitation of coastal ecosystem processes. *Science* **299**, 563–565.
- Tanaka, K., Takayanagi, Y., Fujita, N., Ishihama, A. & Takahashi, H. (1993). Heterogeneity of the principal σ factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product, σ^{38} , is a second principal σ factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 3511–3515.
- Torriani, A. (1960). Influence of inorganic phosphates in the formation of phosphatases of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **38**, 460–469.
- Wanner, B. (1996). Phosphorus assimilation and control of the phosphate regulon. In *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, pp. 1357–1381. Edited by F. C. Neidhardt & others. Washington, DC: American Society for Microbiology.
- Wise, A., Brems, R., Ramakrishnan, V. & Villarejo, M. (1996). Sequences in the –35 region of *Escherichia coli* *rpoS*-dependent genes promote transcription by $E\sigma^S$. *J Bacteriol* **178**, 2785–2793.
- Xu, J. & Johnson, R. C. (1995). Identification of genes negatively regulated by Fis: Fis and RpoS comodulate growth-phase-dependent gene expression in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **177**, 938–947.

Natalia Pasternak Taschner · Ezra Yagil
Beny Spira

The effect of IHF on σ^S selectivity of the *phoA* and *pst* promoters of *Escherichia coli*

Received: 23 August 2005 / Revised: 13 December 2005 / Accepted: 20 December 2005 / Published online: 11 January 2006
© Springer-Verlag 2006

Abstract The *pst* operon, a member of the PHO regulon of *Escherichia coli*, encodes a high-affinity phosphate transport system whose expression is induced when the cells enter a phase of phosphate starvation. The expression of *pst* is stimulated by the integration host factor (IHF). Transcription of the PHO regulon genes is initiated by the RNA polymerase complexed with σ^D ($E\sigma^D$). Owing to a cytosine residue at position -13 of the *pst* promoter its transcription can also be initiated by $E\sigma^S$. Here, we show that inactivation of IHF in vivo abolishes the σ^S -dependent transcription initiation of the *pst* operon, indicating that both -13 C residue and IHF are required to confer on *pst* the ability to be transcribed by $E\sigma^S$. Introduction of a -13 C residue in the promoter region of *phoA*, another PHO regulon gene that is not directly affected by IHF, did not affect its exclusive transcription initiation by $E\sigma^D$.

Keywords PHO regulon · *pst* operon · IHF · *rpoS* · *Escherichia coli*

Introduction

Escherichia coli possesses several architectural proteins that mimic the function of histones by assisting DNA folding and compaction. One of the best-characterised histone-like proteins is the integration host factor (IHF), which is a relatively abundant small DNA-bending

protein (Goosen and van de Putte 1995). IHF is an asymmetric protein that binds DNA at specific sites, causing a bent of 160° in the DNA molecule (Rice et al. 1996). It is a heterodimer composed of subunits IhfA and IhfB that are encoded by *ihfA* and *ihfB*, formerly known as *himA* and *himD* or *hip* (Weisberg et al. 1996).

Integration host factor has first been characterized as an accessory protein in the site-specific recombination process of phage λ (Miller and Friedman 1980), but it is also involved in the modulation of bacterial gene expression (Goosen and van de Putte 1995). The level of IHF increases in the stationary growth phase (Ditto et al. 1994) and several stress-specific σ^S -dependent promoters, such as *ihfA*, *dps*, *osmY* and *sra*, are known to be regulated by IHF (Arfin et al. 2000; Langè et al. 1993; Izutsu et al. 2001). In some cases, the presence of an IHF binding site in the promoter region favours transcription by the σ^S factor, while in others transcription is inhibited by IHF (Aviv et al. 1994; Colland et al. 2000).

The PHO regulon of *E. coli* consists of more than 40 genes and operons whose transcription is induced by inorganic phosphate (Pi) starvation. Among them are *phoA*, which encodes alkaline phosphatase (AP) and the *pst* operon, that encodes the high affinity Pi uptake system Pst. Pst also possesses a negative regulatory function, as most mutations in the *pst* operon impose constitutivity on all PHO genes (Wanner 1996). Despite being stress-dependent, transcription of the PHO genes is initiated by RNA polymerase complexed with σ^D ($E\sigma^D$; Makino et al. 1996). The only exception is *pst*, which, in addition to its transcription by $E\sigma^D$, can also be transcribed by $E\sigma^S$ (Taschner et al. 2004). A reason for that is probably the unique presence of a cytosine residue in the -13 position at the *pst* promoter region, a feature shared by most σ^S dependent promoters (Lacour et al. 2003; Lee and Gralla 2001; Weber et al. 2005). It has also been demonstrated that the *pst* promoter region possesses a functional IHF binding site that is located between the *pst* promoter and the Shine-Dalgarno sequence, and that IHF stimulates *pst* transcription (Spira and Yagil 1999).

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

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

In the present report we show that IHF plays a positive role in the $E\sigma^S$ -dependent transcription of the *pst* operon and that a $-13T$ to $-13C$ mutation in the IHF-independent promoter of *phoA* does not permit its transcription by $E\sigma^S$.

Methods

Strains and plasmids

These are listed in Table 1.

Growth media and growth conditions

Medium A is a semi-rich medium that is low in Pi (Levinthal et al. 1962). In the high-Pi medium it is supplemented with 1 mM KH_2PO_4 . For the assays of AP and chloramphenicol acetyl transferase (CAT), cells were grown overnight in low-Pi medium A.

Enzyme assays

Alkaline phosphatase was assayed using *p*-nitrophenylphosphate (*p*-NPP) as substrate as described (Spira et al. 1995). AP activity is represented by the increase in absorbance at 410 nm min^{-1} per OD unit at 540 nm. CAT assays were performed essentially as described (Taschner et al. 2004) using 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) together with acetyl-CoA and chloramphenicol as substrates. The increase rate in absorbance at 412 nm was recorded and CAT activity was calculated as nmoles min^{-1} (mg protein) $^{-1}$.

Plasmid construction

Plasmid pNP4 was constructed by amplifying the *phoA* fragment from the chromosome of strain MG1655 using the oligonucleotides CAGCATTCCTGCAGACGAT

AC and ATTTTCATAGCAGGATCCCTCTTCA (bold letters indicate the restriction sites for PstI and BamHI introduced by point modifications). The *phoA* PCR fragment was then digested with BamHI and PstI and ligated to the same sites of plasmid pUC19. Plasmid pNP8 was constructed by digesting plasmid pNP4 with BamHI and *Hind*III and ligating the resulting *phoA* fragment to the same sites of the low-copy plasmid pGB2.

Site-directed mutagenesis and DNA sequencing

Site-directed mutagenesis was performed by the circular mutagenesis method, using double stranded DNA template and selection with DpnI, as described (Sambrook and Russel 2001). Plasmid pNP8, carrying the intact *phoA* gene, was used as template for the PCR reaction. The oligonucleotides CTGTCATAAAGTTGTCACG GCCGAGACCTATAGTCGCTTTG and CAAAGCG ACTATAGG TCTCGGCCGTGACAACTTTATGAC AG carried the desired mutation (underlined). The amplification product was treated with DpnI and transformed into strains JY16 and NP23. Both wild type and mutated plasmids were sequenced in an automatic sequencer type ABI Prism 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems/Hitachi, Warrington, UK) to confirm the presence of the point mutation.

Results and discussion

In a previous report we have demonstrated that replacing the cytosine residue at position -13 of the *pst* promoter with a thymine abolishes its ability to be transcribed by $E\sigma^S$ (Taschner et al. 2004), indicating that the $-13C$ residue is important for promoter recognition by σ^S . Since the *pst* promoter is the only PHO promoter that can be recognized by σ^S and is the only one that displays the consensus binding site of σ^S (-13 -CTANNNT) (Lee and Gralla 2001; Weber et al. 2005), we tested if this σ^S -10 consensus site is sufficient to

Table 1 Strains and plasmids used in this study

Strains and plasmids	Genotype	Source
Bacteria		
JY16	<i>phoA</i>	(Rao et al. 1993)
NP23	JY16 <i>rpoS</i> ::Tn10	This study
NP69	RW1370 <i>rpoS</i> ::Tn10	This study
NP108	RW1369 <i>rpoS</i> ::Tn10	This study
RW1369	F ⁻ <i>thyA strA</i>	(Weisberg et al. 1996)
RW1370	F ⁻ <i>thyA strA ihfB (hip157)</i>	(Weisberg et al. 1996)
Plasmids		
pBS11	<i>pstS-cat</i> transcriptional fusion	(Taschner et al. 2004)
pGB2	Cloning vector	(Churchward et al. 1984)
pNP4	<i>phoA</i> ⁺ cloned in pUC19	Lab collection
pNP8	<i>phoA</i> ⁺ cloned in pGB2	This study
pNP9	<i>phoA</i> (carrying a $-13T \rightarrow C$ point mutation) cloned in pGB2	This study
pUC19	Cloning vector	(Yanisch-Perron et al. 1985)

allow transcription of other PHO genes by $E\sigma^S$. The -10 region of the *phoA* promoter (-13 -TTATAGT) differs from the σ^S consensus in that it carries a -13 thymine residue. The -13 thymine of the *phoA* promoter was therefore replaced with a cytosine residue (plasmid pNP9) to test if *phoA* would now be able to be transcribed by $E\sigma^S$. Plasmid pNP8 carries the wild-type promoter. Two isogenic *phoA*-mutant strains, one with and the other without an *rpoS* knockout mutation, were transformed with each of these plasmids and were assayed for AP activity under conditions of Pi-starvation (Fig. 1). The untransformed *rpoS*⁺ and *rpoS*⁻ control strains (Fig. 1, columns a, b) show only a negligible AP activity. The assay of these two host strains transformed with pNP8 that expresses *phoA* under the wild-type promoter (columns c, d) confirms that the presence of σ^S partially represses AP activity (Taschner et al. 2004). When the two host strains were transformed with pNP9 that expresses *phoA* under the $-13C$ promoter mutation (columns e, f) the expression of AP was strongly diminished, but the presence of σ^S still inhibited AP activity, i.e., unlike the *pst* promoter, the σ^S consensus of the *phoA* promoter, provided by the $-13T \rightarrow C$ substitution does not support any $E\sigma^S$ -mediated transcription of *phoA*. This suggests that another factor is required by $E\sigma^S$ to initiate transcription from a *phoA* promoter. This extra factor could be the presence of a functional IHF binding site, which is present in the control region of *pst* (Spira and Yagil 1999).

To test if IHF is involved in the σ^S -promoted transcription initiation of the *pst* operon, a strain carrying a mutation in the *ihfB* locus and its isogenic *ihf*⁺ parent, each with and without an *rpoS* knockout mutation, were transformed with plasmid pBS11 that carries a truncated

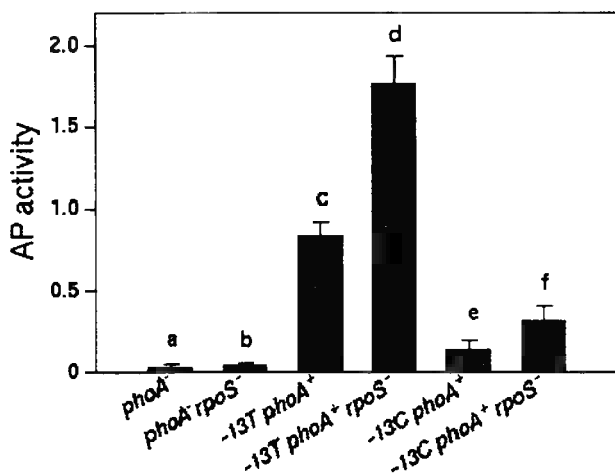


Fig. 1 Effect of *rpoS* on AP activity of bacteria carrying a $-13T \rightarrow C$ mutation in the *phoA* promoter. Cells were grown overnight in medium A and assayed for AP. a) *phoA*-negative mutant JY16; b) *phoA rpoS* double mutant NP23; c) plasmid pNP8 (*pphoA*⁺) in strain JY16; d) plasmid pNP8 in strain NP23; e) plasmid pNP9 (*phoA*⁺ carrying a $-13T \rightarrow C$ mutation) in strain JY16; f) plasmid pNP9 in strain NP23. Bars represent the means \pm SD of three independent experiments

pst operon fused to the promoterless *cat* gene. Thus, the product of the *cat* gene, CAT, served as a reporter for the expression of the *pst* promoter. The transformants were grown overnight under limited Pi concentration and assayed for CAT activity (Fig. 2). In an IHF⁺ background, the activity of CAT was mildly inhibited by the *rpoS* mutation (Fig. 2; columns a, b), confirming that σ^S contributes to the overall transcription level of *pst* (Taschner et al. 2004). However, in the absence of IHF, *pst* expression was significantly inhibited by σ^S (Fig. 2, columns c, d), suggesting that IHF plays a positive role in the σ^S -transcription initiation of *pst*. In other words, in the absence of IHF $E\sigma^S$ has lost its ability to compete with $E\sigma^D$ in recognizing the *pst* promoter causing it to behave like *phoA* and the other PHO genes, which are inhibited by the presence of σ^S (Taschner et al. 2004). Moreover, the positive effect of IHF on overall *pst* transcription (compare columns a, c in Fig. 2) is abolished in the absence of a functional σ^S (compare columns b, d). These data indicate that the combination of the -10 σ^S consensus and the presence of IHF are important for *pst* transcription by $E\sigma^S$. Though the -10 region of *pst* (CTATTTT) follows the consensus of a σ^S -dependent promoter (Lee and Gralla 2001; Weber et al. 2005), in vivo it still requires IHF in order to be transcribed by $E\sigma^S$. Furthermore, the *phoA* promoter bearing the $-13T \rightarrow C$ mutation does carry the σ^S -10 consensus (CTATAGT), nevertheless it is still unable to be transcribed by $E\sigma^S$. A direct effect of *rpoS* on *ihfB* expression and vice-versa cannot be completely ruled out, but it is unlikely. This is because the expression of *ihfB* is only slightly affected by σ^S (Aviv et al. 1994) and because σ^S is mostly post-transcriptionally regulated in starved cells (Zgurskaya et al. 1997). It should be mentioned that the promoter region of *phoA* also carries a putative IHF-binding site that deviates from the IHF-binding site consensus by two

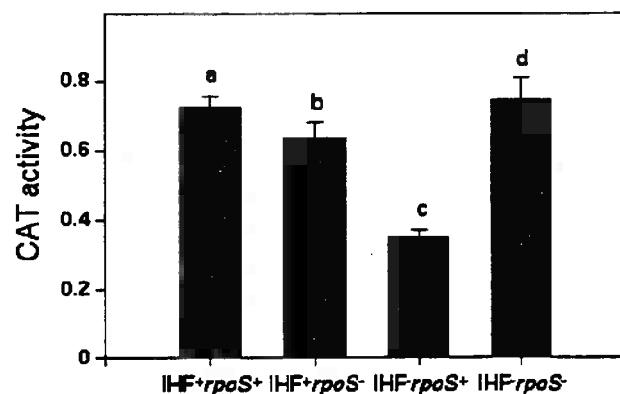


Fig. 2 Effect of IHF and of *rpoS* on the expression of the *pst* operon. Cells transformed with plasmid pBS11 (*pst-cat* fusion) were grown overnight in medium A and assayed for CAT activity. a) plasmid pBS11 in strain RW1369 (*ihf*⁺ *rpoS*⁺); b) plasmid pBS11 in strain NP108 (*ihf*⁺ *rpoS*⁻); c) plasmid pBS11 in strain RW1370 (*ihfB rpoS*⁺); d) plasmid pBS11 in strain NP69 (*ihfB rpoS*⁻). Bars represent the means \pm SD of three independent experiments

base pairs, but an in vitro analysis showed that it is not functional (Spira and Yagil 1999).

Four other genes (*osmY*, *sra*, *ihfA* and *dps*) have hitherto been reported to be regulated by both σ^S and IHF (Izutsu et al. 2001; Aviv et al. 1994; Colland et al. 2000; Altuvia et al. 1994). *dps* and *sra* are positively regulated, while *osmY* and *ihfA* are negatively affected by IHF. The *pst* operon can be added to the list of genes and operons that are positively regulated by σ^S and IHF.

In conclusion, although *pst* is predominantly transcribed by $E\sigma^D$, we suggest that the interaction between IHF, $E\sigma^S$ and the *pst* promoter with its $-13C$ residue, enables *pst* to be transcribed also by $E\sigma^S$. As suggested before (Taschner et al. 2004), the elevated transcription level of *pst* by $E\sigma^S$ inhibits the expression of the other PHO genes (that are transcribed by $E\sigma^D$ alone) and consequently provides free RNA polymerase core units to interact with σ^S . This fine-tuning is responsible for the trade-off between the expression of genes related to survival and expression of genes related to growth.

References

- Altuvia S, Almiron M, Huisman G, Kolter R, Storz G (1994) The *dps* promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and sigma S in stationary phase. *Mol Microbiol* 13:265–272
- Arfin SM, et al. (2000) Global gene expression profiling in *Escherichia coli* K12. The effects of integration host factor. *J Biol Chem* 275:29672–29684
- Aviv M, Giladi H, Schreiber G, Oppenheim AB, Glaser G (1994) Expression of the genes coding for the *Escherichia coli* integration host factor are controlled by growth phase, *rpoS*, ppGpp and by autoregulation. *Mol Microbiol* 14:1021–1031
- Churchward G, Belin D, Nagamine Y (1984) A pSC101-derived plasmid which shows no sequence homology to other commonly used cloning vectors. *Gene* 31:165–171
- Colland F, Barth M, Hengge-Aronis R, Kolb A (2000) Sigma factor selectivity of *Escherichia coli* RNA polymerase: role for CRP, IHF and *lrp* transcription factors. *EMBO J* 19:3028–3037
- Ditto MD, Roberts D, Weisberg RA (1994) Growth phase variation of integration host factor level in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 176:3738–3748
- Goosen N, van de Putte P (1995) The regulation of transcription initiation by integration host factor. *Mol Microbiol* 16:1–7
- Izutsu K, et al (2001) *Escherichia coli* ribosome-associated protein SRA, whose copy number increases during stationary phase. *J Bacteriol* 183:2765–2773
- Lacour S, Kolb A, Landini P (2003) Nucleotides from -16 to -12 determine specific promoter recognition by bacterial sigma S-RNA polymerase. *J Biol Chem* 278:37160–37168
- Lange R, Barth M, Hengge-Aronis R (1993) Complex transcriptional control of the sigma S-dependent stationary-phase-induced and osmotically regulated *osmY* (*csi-5*) gene suggests novel roles for Lrp, cyclic AMP (cAMP) receptor protein-cAMP complex, and integration host factor in the stationary-phase response of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175:7910–7917
- Lee SJ, Gralla JD (2001) Sigma38 (*rpoS*) RNA polymerase promoter engagement via -10 region nucleotides. *J Biol Chem* 276:30064–30071
- Levinthal C, Signer ER, Fetherolf K (1962) Reactivation and hybridization of reduced alkaline phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* 48:1230–1237
- Makino K, Amemura M, Kawamoto T, Kimura S, Shinagawa H, Nakata A, Suzuki M (1996) DNA binding of PhoB and its interaction with RNA polymerase. *J Mol Biol* 259:15–26
- Miller HI, Friedman DI (1980) An *E. coli* gene product required for lambda site-specific recombination. *Cell* 20:711–719
- Rao NN, Roberts MF, Torriani A, Yashpbe J (1993) Effect of *glpT* and *glpD* mutations on expression of the *phoA* gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 175:74–79
- Rice PA, Yang S, Mizuuchi K, Nash HA (1996) Crystal structure of an IHF-DNA complex: a protein-induced DNA U-turn. *Cell* 87:1295–1306
- Sambrook J, Russel D (2001) Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor
- 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
- Spira B, Yagil E (1999) The integration host factor (IHF) affects the expression of the phosphate-binding protein and of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol* 38:80–85
- Taschner NP, Yagil E, Spira B (2004) A differential effect of sigma S on the expression of the PHO regulon genes of *Escherichia coli*. *Microbiology* 150:2985–2992
- Wanner B (1996) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. In: Neidhardt FC, Curtiss RI (eds) ASM Press, Washington DC, pp 1357–1381
- Weber H, Polen T, Heuveling J, Wendisch VF, Hengge R (2005) Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigma S-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol* 187:1591–1603
- Weisberg RA, et al (1996) Nomenclature of the genes encoding IHF. *Mol Microbiol* 19:642
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103–119
- Zgurskaya HI, Keyhan M, Matin A (1997) The sigma S level in starving *Escherichia coli* cells increases solely as a result of its increased stability, despite decreased synthesis. *Mol Microbiol* 24:643–651