

MEIRE AGUENA

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

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

São Paulo

2007

MEIRE AGUENA

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

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

**Área de concentração:
Microbiologia**

Orientador: Profº Drº Beny Spira

São Paulo

2007

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

©reprodução total

Aguena, Meire

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

Orientador: Beny Spira

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

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

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

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

AGRADECIMENTOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

Lista de Ilustrações

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

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

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

Gracias por visitar este Libro Electrónico

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

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

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

