UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

**CARACTERIZAÇÃO DE FATORES SIGMA DA
SUBFAMÍLIA ECF EM *Caulobacter crescentus***

Cristina Elisa Alvarez Martinez

Tese de Doutorado

Orientadora: Profa. Dra. Suely Lopes Gomes

São Paulo
5/11/2004
(cinco de novembro de 2004)

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Alvarez Martinez, Cristina Elisa
A473c Caracterização de fatores sigma da subfamília ECF
em *Caulobacter crescentus* / Cristina Elisa Alvarez
Martinez. -- São Paulo, 2004.
134p.

Tese (doutorado) - Instituto de Química da Universidade
de São Paulo, Departamento de Bioquímica.
Orientador : Gomes, Suely Lopes

I. Biologia molecular 2. Regulação gênica I. T.
II. Gomes, Suely Lopes, orientador.

574.88 CDD

“Caracterização de fatores sigma da subfamília
ECF em *Caulobacter crescentus*”

CRISTINA ELISA ALVAREZ MARTINEZ

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Ciências – Área: Bioquímica.

Aprovado(a) por:

Profa. Dra. **SUELY LOPES GOMES**
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. **SHAKER CHUCK FARAH**
IQ – USP

Prof. Dr. **FREDERICO JOSÉ GUEIROS FILHO**
IQ – USP

Prof. Dr. **LUIS CARLOS DE SOUZA FERREIRA**
ICB - USP

Prof. Dr. **BENY SPIRA**
ICB - USP

SÃO PAULO
13 DE DEZEMBRO 2004

Aos meus amados pais, que souberam compreender a necessidade da distância, me deram todas as oportunidades e todo o apoio. Pela enorme dedicação e amor. Aos meus queridos irmãos, Ger e Cláudio, pelo apoio incondicional e, principalmente, pela amizade e companheirismo.

Aos meus amados pais, que souberam compreender a necessidade da distância, me deram todas as oportunidades e todo o apoio. Pela enorme dedicação e amor. Aos meus queridos irmãos, Ger e Cláudio, pelo apoio incondicional e, principalmente, pela amizade e companheirismo.

Ao Rodrigo, meu grande amor, companheiro e amigo.
Sua presença constante, seu amor e companheirismo me
dão força e estímulo todos os dias.

AGRADECIMENTOS

- À Prof. Dra. Suely Lopes Gomes, pela orientação, sempre disponível e competente, e por ser um grande exemplo de dedicação e seriedade ao trabalho.
- À Regina Lúcia Baldini, pela colaboração durante o trabalho, pelo apoio, disponibilidade, sugestões e pela convivência.
- À Rita de Cássia Simão, pela imensa ajuda durante o início deste trabalho, pelas discussões científicas e, principalmente, pela amizade e companheirismo, com os quais sempre pude contar.
- À Tie Koide, pela ajuda indispensável e sempre disponível nas análises dos dados de “microarray”, pela amizade e por sua “calma contagiante”.
- Ao Ricardo Vêncio, pela ajuda também indispensável com a análise estatística dos dados de “microarrays” e pela convivência sempre alegre.
- À Sandra Mara e Luci Cattapan (meu “guiaSP”), pela enorme competência, estando sempre prontas a ajudar, pela torcida sincera e pela convivência sempre divertida. Vocês são insubstituíveis!
- À Ivone, pelo auxílio técnico e pelo alto astral e disponibilidade de sempre.
- Aos amigos que fiz no laboratório durante todo este tempo de convivência: Karina (a gente vai conseguir!), Rafaela, Sílvia, Michelle (pela grande ajuda no início do trabalho e em minha nova vida “paulistana”), Humberto, Rogério, Luciana, Luciano e Antônio Carlos (Tie, Luci e Sandra, de novo...) pela união, disponibilidade em ajudar e pelos momentos compartilhados, sempre tão alegres e divertidos.
- À Dra. Lucy Shapiro e aos membros de seu laboratório: Ann Reinsenauer, Maliwan Meewan e Alison Kay Hotes, pela realização dos experimentos de “microarray” e o auxílio com a discussão e análise dos dados.

- À Profª Marilis do Valle Marques, pelas sugestões e contribuições, sempre tão pertinentes. A todo o pessoal do seu laboratório, pela convivência, sugestões e pelo “troca-troca” de cepas, anticorpos e primers.....
- Aos funcionários do biotério do IQ, em especial à Flávia, pelo cuidado com os coelhos utilizados para a obtenção de anticorpos.
- Ao pessoal do Lab. do Profº. Carlos Menck, pela convivência, pelos encontros, sempre tão divertidos e pela torcida sincera.
- À Helô, pela torcida, amizade e convivência.
- À Maria Irma e ao Odoardo, pela amizade e carinho.
- Aos meus queridos sogros, Jaime e Laura, pelo grande carinho e apoio.
- À minha querida amiga e companheira de vida paulistana, Denise, pelo imenso carinho, pela torcida e por compartilhar os momentos alegres e difíceis.
- Aos meus queridos amigos de ontem, hoje e sempre, Jorge, Léo, Bia, Rê, Rafinha e Tati que, mesmo à distância, estão sempre torcendo por mim. Vocês moram no meu coração.
- À bolsa e apoio financeiro concedido pela FAPESP.

ÍNDICE

RESUMO	viii
ABSTRACT	ix
ABREVIATURAS	x
1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - <i>Caulobacter crescentus</i> : Fisiologia e Ciclo Celular	1
1.2 - Os Fatores Sigma Procarióticos	4
1.2.1 - Regulação da Transcrição em Procariotos: os Fatores Sigma	4
1.2.2 - Estrutura dos Fatores Sigma da Família σ^{70}	7
1.3 - A Subfamília ECF de Fatores Sigma	9
1.3.1 - Identificação e Função dos Fatores ECF	9
1.3.2 - Regulação da Atividade de Fatores ECF: os Fatores Anti-Sigma	13
1.4 - A Resposta a Estresses em Bactérias e o Papel de Fatores Sigma ECF	16
1.4.1 - Resposta a Choque Térmico	16
1.4.2 - Resposta a Estresse Osmótico e Salino	19
1.4.3 - Resposta a Estresse Oxidativo	21
1.4.4 - Resposta à Fase Estacionária	24
1.5 - Os Fatores ECF de <i>C. crescentus</i>	26
2 - OBJETIVOS	31
3 - MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 - Linhagens, meios e condições de cultura	32
3.2 - Vetores, construções e oligonucleotídeos	33
3.3 - Isolamento de plasmídeos, digestão com enzimas de restrição, ligação e sequenciamento	36
3.4 - Transformação e Conjugação	36
3.5 - Obtenção da Cepa Mutante por Deleção em Fase no Gene <i>sigF</i> (SG16)	37
3.6 - Obtenção do Mutante Condiciona no Gene <i>sigF</i> (SG16C)	38
3.7 - Obtenção da Cepa Mutante no Gene <i>sigU</i> (SG546)	39
3.8 - Marcação de Sondas e Hibridização	39
3.9 - Ensaios de Atividade de β -Galactosidase	41
3.10 - Ensaios de Viabilidade e Curvas de Crescimento	41
3.11 - Extração de RNA de <i>Caulobacter crescentus</i>	43
3.11.1 - Extração pelo Método de Fenol Quente	43
3.11.2 - Extração com Trizol	44
3.12 - Ensaios de Extensão de Oligonucleotídeo com Transcriptase Reversa	45
3.13 - RT-PCR Semi-Quantitativos	46
3.14 - Obtenção de Anticorpos Policlonais: anti-SigF e anti-SigU	48
3.14.1 - Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes SigF e SigU em <i>E. coli</i>	48
3.14.2 - Imunização dos Coelhos. Extração e Teste dos Anti-Soros	50
3.14.3 - Purificação do Soro anti-SigU	51
3.15 - Obtenção de Extratos Totais de Proteína de <i>C. crescentus</i> e “Western-Blots”	51
3.16 - “Microarrays”	53
4 - RESULTADOS	55
4.1 - Estudo do Papel dos Genes <i>sigL</i> , <i>sigM</i> e <i>N</i> na Resposta a Estresses em <i>C. crescentus</i>	55
4.2 - Caracterização do Gene <i>sigF</i>	58
4.2.1 - Análise do Fenótipo das Cepas Mutantes em <i>sigF</i>	58

4.2.2 - Análise da Expressão de <i>sigF</i>	74
4.2.2.1 - Regulação da Expressão de <i>sigF</i> na Resposta a Choque Térmico	74
4.2.2.2 - Regulação da Expressão de <i>sigF</i> na Resposta a Fase Estacionária e Estresse Oxidativo	77
4.2.2.3 - Análise da Super-expressão de <i>sigF</i>	80
4.2.3 - Identificação de Genes Regulados por SigF: Análise do Perfil Global de Expressão Gênica da Cepa SG16 por Microarranjos de DNA (“Microarrays”)	82
4.2.4 - Análise dos Níveis de KatG na cepa SG16	90
4.3 - Caracterização do Gene <i>sigU</i>	91
4.3.1 - Análise da Regulação Transcricional de <i>sigU</i> na Resposta a Estresses	91
4.3.2 - Obtenção e Caracterização da Cepa Mutante em <i>sigU</i>	97
4.3.3 - Análise dos Níveis da Proteína SigU	101
5 - DISCUSSÃO	105
5.1 - Caracterização das Cepas Mutantes em Fatores ECF: Sobreposição Funcional	105
5.2 - Papel de SigF na Regulação da Expressão Gênica durante a Fase Estacionária	109
5.3 - Regulação da Expressão de <i>sigF</i>	116
5.4 - Regulação da Expressão de <i>sigU</i>	118
6 - CONCLUSÕES	121
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123

RESUMO

Em bactérias, os fatores sigma alternativos permitem a rápida adaptação da célula a alterações no ambiente. Dentre estes, os fatores sigma ECF (função extra-citoplasmática) caracterizam-se pelo envolvimento na resposta a sinais da região extra-citoplasmática da célula. O sequenciamento do genoma de *Caulobacter crescentus* indicou a presença de 13 ORFs codificando fatores ECF. Este trabalho descreve a caracterização de cepas mutantes em cinco genes que codificam fatores sigma ECF de *C. crescentus*, sendo eles *sigL*, *sigM*, *sigN*, *sigU* e *sigF*. A regulação da expressão destes genes em respostas a diferentes estresses foi também analisada, pelo uso de fusões de transcrição de suas regiões promotoras ao gene reporter *lacZ*. Todos os mutantes mostraram-se viáveis, sendo também tão resistentes quanto a cepa parental a uma série de estresses ambientais testados, indicando que estes genes não são essenciais. Verificou-se, porém, que os mutantes nos genes *sigL* e *sigM* são mais sensíveis ao choque térmico extremo (48°C). A caracterização da cepa mutante em *sigF* mostrou que este gene é essencial para a resistência da célula a estresse oxidativo durante a fase estacionária. A análise da expressão de *sigF* indicou um controle pós-transcricional, com o acúmulo da proteína SigF durante esta fase do crescimento, sem um aumento na transcrição do gene. Oito genes regulados por σ^F durante a fase estacionária foram identificados em experimentos de “microarray”, incluindo os genes de resposta a estresse oxidativo, *sodA* e *msrA*. A análise da atividade do promotor de *sigU* mostrou sua indução na entrada na fase estacionária e após estresse salino e osmótico. No entanto, o mutante nulo em *sigU* não se apresentou mais sensível que a cepa parental a esses estresses. Os resultados aqui descritos permitiram identificar a importância de alguns dos fatores ECF de *C. crescentus* na resposta a estresses nesta bactéria.

ABSTRACT

Alternative sigma factors permit the rapid adaptation to environmental changes in bacteria. Among them, members of the ECF subfamily (extracytoplasmic function) are characterized by their involvement in responses to changes in the extracytoplasmic compartment of the cell. Analysis of the complete genome sequence of *Caulobacter crescentus* has led to the identification of 13 ORFs encoding putative sigma factors of the ECF subclass. The present work describes the characterization of mutant strains in five genes encoding ECF sigma factors from *C. crescentus*, named *sigL*, *sigM*, *sigN*, *sigU* and *sigF*. The expression of these genes in response to distinct stress conditions was also investigated, using transcriptional fusions of their promoter regions to the *lacZ* reporter gene. The five mutants strains obtained were viable and did not show increased sensitivity, when compared to the parental strain, to a series of environmental stress conditions, indicating that these genes are not essential. However, the *sigL* and *sigM* mutant strains were shown to be more sensitive to extreme heat shock (48°C). Furthermore, the characterization of the *sigF* mutant strain demonstrated that this gene is essential for oxidative stress survival during stationary phase. Analysis of *sigF* expression indicated a post-transcriptional control, with an increase in the levels of SigF protein during this growth phase, without changes in the transcription rate of the gene. Eight genes regulated by σ^F during stationary phase were identified in microarray experiments, including the oxidative stress response genes *sodA* and *msrA*. Analysis of *sigU* promoter activity in response to distinct stress conditions showed induction upon entry into stationary phase and during saline and osmotic stress. Nevertheless, the *sigU* null mutant did not show increased sensitivity to these stresses. The results described here identified the importance of some of the *C. crescentus* ECF sigma factors in the response to stresses in this bacterium.

ABREVIATURAS

°C - graus Celsius

cDNA – DNA complementar

dCTP - 2'-desoxirribonucleotídeo-5' trifosfato de citidina

DEPC - Dietilpirocarbonato

DNA - Ácido desóxiribonucleico

DNase - Desoxirribonuclease

DO - Densidade ótica

DOC – Deoxicolato de sódio

DTT – Ditioneitol

ECF – “extracytoplasmic function”

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

g – Unidades de gravidade

h - Hora

IPTG - Isopropil β -D-galactopiranosídeo

kb - Quilobase

kDa - Quilodáltons

M - Molar

mg - Miligrama

Min - Minutos

ml - Mililitro

mM - Milimolar

MOPS – Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico

NBT - Nitro-azul de tetrazólio

nm - Nanômetro

PAGE - “polyacrylamide gel electrophoresis”

pb - Pares de base

PCR - reação em cadeia pela polimerase

PYE - “Peptone Yeast Extract”

RNA - ácido ribonucleico

RNase - Ribonuclease

RT-PCR - “reverse transcriptase PCR”

SDS - Dodecilsulfato de sódio

TBE - Tris Borato EDTA

TEMED - N,N,N',N' Tetrametiletilenodiamina

Tris - hidroxometil aminometano

UV – luz ultravioleta (254 nm)

µg - micrograma

µl – microlitro

1) INTRODUÇÃO

1.1) *Caulobacter crescentus*: Fisiologia e Ciclo Celular

Caulobacter crescentus é uma bactéria Gram-negativa de vida livre, que faz parte da subdivisão α de Proteobacteria. Esta espécie está presente em ambientes aquáticos, especialmente de água doce, sendo mais encontrada em ambientes pobres em nutrientes (Poindexter, 1981). Esta bactéria também é frequentemente encontrada em associação a cianobactérias, estando provavelmente exposta a altas concentrações de oxigênio, devido à atividade fotossintética destes organismos (Poindexter, 1981, Lapteva, 1987).

C. crescentus apresenta um ciclo celular bastante característico, no qual células-filha distintas são formadas após a divisão. A divisão celular assimétrica em *Caulobacter* gera uma célula móvel, que possui um flagelo polar, e uma célula sésil, que apresenta um talo, a célula talo (figura 1). A célula móvel apresenta também grande quantidade de fímbrias no mesmo pólo onde se localiza o flagelo e não possui capacidade replicativa. Em resposta a sinais internos, a célula móvel perde o flagelo e retrai as fímbrias e inicia-se a formação de um talo no local anteriormente ocupado pelo flagelo. O talo é um prolongamento da membrana e parede celular e possui também um material adesivo em sua extremidade. A formação do talo coincide com a descondensação do cromossomo e o início da replicação do DNA. A medida em que o DNA é replicado, a célula cresce e começa a expressar os genes que codificam proteínas responsáveis pela biogênese do flagelo, cujos produtos mantêm-se concentrados no pólo da célula oposto àquele que contém o talo. Nesta fase, inicia-se a biossíntese do flagelo e das fímbrias no pólo oposto ao talo, produzindo uma célula assimétrica, denominada célula pré-divisional (figura 1). Por fim, esta célula completa sua divisão, formando novamente dois tipos celulares distintos (revisado em Martin & Brun, 2000). A célula talo atua como uma

célula-tronco, reiniciando imediatamente um novo ciclo de divisão celular, enquanto a célula móvel retarda este processo até se diferenciar em uma nova célula talo.

Figura 1: O ciclo celular de *Caulobacter crescentus*. 1) célula móvel; 2) célula-talo; 3) célula pré-divisional. Adaptado de Janakiraman & Brun, 1999.

Os dois tipos celulares característicos de *C. crescentus* exercem papéis específicos para a adaptação da bactéria em seu habitat natural e sua capacidade de propagação em ambientes extremamente diluídos (Poindexter, 1981). Assim, a célula móvel, que é quimiotaticamente competente, é importante para a dispersão da população e busca de novas fontes de nutrientes. Por outro lado, o talo presente na célula sésil é uma extensão do envelope celular, levando a um aumento na superfície de absorção de nutrientes sem causar aumento no volume do citoplasma. Desta forma, a célula sésil é a forma predominante em ambientes diluídos, e na ausência de nutrientes, este tipo celular concentra suas atividades no alongamento do talo, que pode chegar a um comprimento até dez vezes maior que o tamanho da célula (Poindexter, 1981; Schmidt, 1968; Schmidt & Stainer, 1966). Além disto, em condições de laboratório, a entrada na fase estacionária induz a diferenciação das células móveis em células sésseis, que iniciam o alongamento progressivo do talo durante a fase estacionária tardia (Poindexter, 1981; Wortinger et al., 1998). Assim, o alongamento do talo é uma resposta morfogenética à queda nos níveis de nutrientes disponíveis.

As células móveis e sésseis presentes em culturas líquidas de *C. crescentus* podem ser facilmente separadas por centrifugação em gradiente de densidade. Populações contendo apenas células móveis assim obtidas são capazes de prosseguir em sincronia ao longo do ciclo celular, o que permite a análise das características de cada evento de diferenciação ao longo do ciclo. Devido a estas características e à facilidade de cultivo e manipulação genética, *C. crescentus* tornou-se um organismo amplamente estudado e um modelo para o estudo dos eventos que levam à diferenciação celular.

A seqüência completa do genoma de *C. crescentus* foi determinada recentemente e algumas características importantes para a fisiologia desta bactéria foram identificadas (Nierman et al., 2001). Um total de 3.763 ORFS (seqüências abertas de leitura) foi encontrado e dentre estas, 53,9% apresentam similaridade a proteínas com função conhecida. Observou-se que *C. crescentus* possui o maior número de proteínas envolvidas em transdução de sinal (sistemas de dois componentes) dentre as bactérias cujo genoma já foi seqüenciado, o que sugere que esta bactéria tenha desenvolvido vários mecanismos para a percepção e resposta a alterações no ambiente.

A análise comparativa do genoma de *C. crescentus* ao de outras bactérias demonstrou a conservação de um grande número de genes presentes em bactérias de solo, como algumas espécies de *Pseudomonas* e *Rhizobium*. Dentre estes, destacam-se homólogos a genes envolvidos no metabolismo intermediário e genes para a degradação de compostos aromáticos identificados em bactérias de solo. Verifica-se também uma alta conservação na organização estrutural destes genes entre *C. crescentus* e essas bactérias. Estes dados sugerem a ocorrência de transferência lateral entre estas espécies (Nierman et al., 2001).

1.2) Os Fatores Sigma Procarióticos

1.2.1) Regulação da Transcrição em Procariotos: os Fatores Sigma

A RNA polimerase é um grande complexo protéico responsável pela transcrição em procariotos, eucariotos e arquea. Em procariotos, o cerne da RNA polimerase é composto pelas subunidades β , β' , ω e 2 subunidades α , cujas estruturas e funções são evolutivamente conservadas em eucariotos e arquea (Ebright, 2000). O cerne da RNA polimerase é responsável pela atividade catalítica da enzima, atuando no alongamento e término da transcrição, não é, porém, capaz de iniciar a transcrição na ausência da subunidade σ . A subunidade σ atua no reconhecimento específico das regiões promotoras localizadas a 5' dos genes e na desnaturação do DNA no sítio de início da transcrição, e exerce estas funções após sua associação ao cerne da RNA polimerase, formando a holoenzima (Burgess et al., 1969). A interação entre o fator σ e a RNA polimerase ocorre através de múltiplos contatos com as subunidades β e β' do cerne, que também estão envolvidas na catálise e, no caso da subunidade β' , na desnaturação do DNA antes do início da transcrição (Gruber et al., 2001; Young et al., 2004).

Assim, o cerne da RNA polimerase liga-se inespecificamente e com baixa afinidade ao DNA na ausência do fator σ . Entretanto, a partir da formação da holoenzima, esta se torna capaz de associar-se com alta afinidade e especificidade às regiões promotoras dos genes a serem transcritos. O complexo assim formado, contendo a holoenzima associada ao DNA em dupla fita é denominado complexo binário fechado. As subunidades σ e β' promovem então, a desnaturação do DNA, que ocorre na região entre os nucleotídeos -11 e +2 em relação ao nucleotídeo iniciador da transcrição, denominado +1, dando origem ao complexo binário aberto. A abertura das fitas do DNA permite que a RNA polimerase tenha acesso à fita molde e inicie a síntese do RNA. Este complexo contendo o RNA nascente, a holoenzima e a fita molde é denominado complexo ternário. Após a síntese de 8-10 nucleotídeos, a subunidade σ

desliga-se da holoenzima, o que permite que o cerne, que possui alta processividade, realize o alongamento e o término da transcrição. O complexo contendo o cerne da RNA polimerase, a fita molde do DNA e o RNA nascente é denominado complexo ternário de alongamento (revisado em Murakami & Darst, 2003).

A maioria das bactérias possui um fator sigma vegetativo (também denominado sigma principal), homólogo aos fatores σ^{70} de *Escherichia coli* e σ^A de *Bacillus subtilis*, que são responsáveis por grande parte da transcrição em condições ótimas de crescimento. Entretanto, as bactérias possuem também fatores sigma alternativos, que atuam em condições específicas de crescimento, como por exemplo, durante a transição entre fases de crescimento e na resposta a estresses, ativando a transcrição de regulons especializados. Estes fatores tornam-se ativos e/ou tem sua concentração aumentada na célula em resposta a variações no ambiente e competem com o fator sigma vegetativo pelo cerne da RNA polimerase, alterando sua especificidade por promotores, e assim, alterando o padrão global de expressão gênica. Desta forma, os fatores sigma alternativos permitem que a célula se adapte rapidamente a alterações no ambiente (Gruber & Gross, 2003).

Os fatores alternativos apresentam similaridade de sequência e estrutura ao fator σ^{70} de *E.coli*, sendo agrupados dentro de uma grande família denominada σ^{70} . Esta família foi subdividida em grupos de acordo com características filogenéticas, cujos membros muitas vezes apresentam funções relacionadas (Lonetto et al., 1992; Wosten, 1998; Gruber & Gross, 2003). O grupo 1 é composto pelos fatores sigma vegetativos, homólogos a σ^{70} e σ^A e que são essenciais ao crescimento, enquanto os demais grupos são compostos por fatores sigma alternativos. O grupo 2 caracteriza-se por sigmas altamente similares aos membros do grupo 1, mas que se distinguem dos primeiros por não serem essenciais ao crescimento, como, por exemplo, os reguladores da resposta geral a estresses σ^S de *E.coli* e σ^B de *B. subtilis*. O grupo 3 é formado por fatores sigmas mais divergentes em sequência em relação aos sigmas

vegetativos e que estão envolvidos na resposta a choque térmico, na indução da biossíntese do flagelo e da esporulação. Posteriormente, verificou-se a presença de um grupo de fatores sigma com baixa similaridade de sequência aos demais grupos da família σ^{70} e cujos membros estavam envolvidos na resposta a alterações no compartimento extracitoplasmático da célula (periplasma e membranas) (Lonetto et al., 1994). Assim, esta nova subfamília foi denominada ECF (“extracytoplasmic function”) e inclui os fatores σ^F e FecI de *E.coli*, envolvidos na resposta a estresses e na absorção de citrato de ferro, respectivamente. Recentemente, sugeriu-se também a denominação de sigmas do grupo 4 para os fatores ECF, uma vez que membros desta subfamília envolvidos na resposta a estresses citoplasmáticos já foram identificados (Gruber & Gross, 2003; Helmann, 2002). O grupo 5 de fatores sigma foi recentemente sugerido por Helmann (2002), sendo composto por sigmas ainda mais divergentes em relação aos demais membros da família e que atuam como reguladores positivos de genes que codificam bacteriocinas e toxinas, como TxeR de *Clostridium difficile* (Mani & Dupuy, 2001).

Além da família σ^{70} , muitas bactérias contêm fatores sigma da família σ^{54} , que não apresentam similaridade de sequência aos membros da família σ^{70} , apresentando também estrutura e função bastante distintas (Buck et al., 2000). Estes fatores sigma também apresentam um mecanismo distinto de formação do complexo aberto de transcrição. Assim, enquanto a holoenzima contendo fatores da família σ^{70} é suficiente para iniciar a transcrição, a holoenzima contendo membros da família σ^{54} necessita de ATP e de ativadores para formar o complexo aberto (Buck et al., 2000). Membros desta família estão muitas vezes envolvidos na regulação de genes que atuam na fixação de nitrogênio, como σ^{54} de *E.coli* e SigL de *B. subtilis*. A análise do número de genes codificando fatores sigma presente em genomas bacterianos já sequenciados demonstrou que a maioria das bactérias possui apenas 1 membro desta família, não tendo sido encontrados representantes em cianobactérias e bactérias do

grupo de Gram-positivas com alto conteúdo de GC (Mittenhuber, 2002; Studholme & Buck, 2000).

1.2.2) Estrutura dos Fatores Sigma da Família σ^{70} :

A comparação entre as seqüências de vários fatores sigma da família σ^{70} levou à identificação de quatro regiões conservadas (Helmann & Chamberlin, 1988), que foram posteriormente subdivididas em subregiões (Lonetto et al., 1992) (figura 2). A subregião 1.1 é bastante variável e está presente apenas nos fatores sigma do grupo 1, atuando como um domínio auto-inibitório, que impede a ligação do sigma não associado ao cerne da RNA polimerase aos promotores por ele reconhecidos. Além disto, esta região regula a formação de um complexo aberto de transcrição estável, podendo induzir ou inibir este processo, de acordo com o promotor em questão (Wilson & Dombroski, 1997; Vuthoori et al., 2001). A presença desta região apenas nos fatores sigma vegetativos sugere que este grupo necessite de uma regulação mais rígida, provavelmente por estarem presentes no citoplasma em concentrações bem mais altas que os demais sigmas. Além disto, os sigmas do grupo 1 reconhecem um número maior de promotores e a região 1.1 pode atuar conferindo maior flexibilidade no reconhecimento de promotores distintos. A região 1.2 também auxilia na formação do complexo aberto de transcrição (Wilson & Dombroski, 1997) e está presente em todos os grupos de fatores sigma, com exceção da subfamília ECF (grupo 4) (Wosten, 1998). A região NCR, presente entre as regiões 1 e 2, é bastante divergente e é encontrada apenas nos fatores sigma do grupo 1. Sua função ainda não é conhecida, embora evidências tenham sugerido que a NCR exerça um papel na ligação ao cerne da RNA polimerase (Vassylyev et al., 2002).

A região 2 é a mais conservada entre grupos distintos da família σ^{70} , estando presente em todos os fatores sigma, e foi subdividida em 4 subregiões (Lonetto et al., 1992)(figura 2). A região 2.3 atua na desnaturação do DNA durante a formação do complexo aberto de

transcrição e a região 2.1 possui resíduos para a interação com o cerne da RNA polimerase. A região 2.4 atua no reconhecimento de uma das sequências promotoras de procariotos, a região -10, que em geral consiste em um hexâmero localizado a aproximadamente 10 nucleotídeos a 5' do nucleotídeo iniciador da transcrição. A sequência -10 é muitas vezes conservada entre sigmas do mesmo grupo ou categoria funcional (no caso dos sigmas do grupo 3) em diferentes espécies de bactéria.

A região 3 está subdividida em três subregiões e está ausente nos fatores sigma ECF (Lonetto et al., 1994). A região 3.0 está envolvida no reconhecimento de sequências promotoras localizadas a aproximadamente 14-15 nucleotídeos do início da transcrição, denominadas regiões -10 estendidas. As regiões 3.1 e 3.2 estão envolvidas na ligação ao DNA e ao cerne da RNA polimerase, respectivamente (Wosten, 1998).

A região 4 está presente em todos os fatores sigma da família σ^{70} e possui um determinante de ligação ao DNA, a subregião 4.2, que atua no reconhecimento de sequências promotoras localizadas a aproximadamente -35 nucleotídeos do início da transcrição. Assim como as regiões -10, as sequências -35 apresentam bastante conservação entre sigmas de mesma função em diferentes espécies. A subregião 4.1 é um sítio de interação com ativadores durante o início da transcrição (Li et al., 1994).

Recentemente, a estrutura do fator σ^A de *Thermus aquaticus* foi determinada e verificou-se a presença de 3 domínios globulares, conectados por regiões flexíveis (figura 2) (Campbell et al., 2002). O domínio σ^2 consiste nas regiões 1.2-2.4, o domínio σ^3 inclui as regiões 3.0-3.1 e o domínio σ^4 consiste nas regiões 4.1 e 4.2. A estrutura do fator sigma ECF σ^E de *E.coli* também foi determinada e observou-se a ausência do domínio σ^3 , conforme havia sido sugerido pela análise das sequências primárias dos fatores σ desta subfamília, que não apresentam a região 3 (Lonetto et al., 1994, Campbell et al., 2003). Verificou-se porém, que a estrutura dos domínios σ^2 e σ^4 de σ^E é muito similar à descrita para os membros do

grupo 1, apesar da alta divergência entre as sequências primárias dos membros destes dois grupos. Esta alta conservação estrutural sugere que os mecanismos de reconhecimento dos promotores e de ligação à RNA polimerase sejam muito similares entre os membros da família σ^{70} (Campbell et al., 2003).

Figura 2: Esquema representando as regiões conservadas entre os membros da família σ^{70} e os domínios determinados por análises estruturais. As regiões e sub-regiões identificadas pela comparação entre a sequência primária de diversos fatores sigma estão representadas no esquema branco. As regiões 1.1 e NCR são encontradas apenas nos σ vegetativos (grupo 1). Um promotor procariótico típico está representado abaixo do esquema, com destaque para o nucleotídeo iniciador da transcrição (+1) e para as sequências promotoras -10, -35 e -10 estendida (10E). Em cinza claro, acima do esquema, estão representados os domínios determinados pela análise estrutural de σ^A de *T. aquaticus*. Adaptado de Gruber & Gross, 2003.

1.3) A Subfamília ECF de Fatores Sigma

1.3.1) Identificação e Função dos Fatores ECF

O primeiro membro da subfamília ECF foi identificado em dois estudos concomitantes de caracterização do controle transcricional do gene *rpoH* de *E.coli*, que codifica o fator de resposta a choque térmico σ^{32} (Erickson & Gross, 1989; Wang & Kaguni, 1989). Foi observado que a transcrição de *rpoH* ocorre por 4 diferentes promotores, denominados P1, P2,

P3 e P4. O fator σ^{70} é responsável pela transcrição a partir dos promotores P1, P2 e P4, porém, em temperaturas extremas (50°C), a transcrição deste gene ocorre de forma dependente do promotor P3 (Erickson et al., 1987). A holoenzima responsável pela transcrição a partir de P3 foi então purificada e desta isolou-se a subunidade σ^E , de 24 kDa (Erickson & Gross, 1989; Wang & Kaguni, 1989). Verificou-se também que este fator sigma é responsável pela regulação do gene *degP* (ou *htrA*), que codifica uma protease periplasmática essencial para sobrevivência a altas temperaturas em *E.coli*, sendo responsável pela indução deste gene durante o choque térmico (Erickson & Gross, 1989). Foi também demonstrado o aumento na atividade de σ^E pela superexpressão de proteínas de membrana externa, as OMP (Mecsas et al., 1993). Posteriormente, o gene que codifica σ^E foi isolado, sendo denominado *rpoE*, e sua transcrição mostrou-se aumentada após choque térmico a 42°C (Rouviere et al., 1995; Raina et al., 1995). Estes dados demonstraram, portanto, a existência de um segundo regulon de choque térmico em *E.coli*, induzido por alterações detectadas no compartimento extracitoplasmático da célula (Mecsas et al., 1993).

Entretanto, a existência de um grupo distinto dentro da família σ^{70} , responsável pela regulação de funções extracitoplasmáticas foi verificado posteriormente, durante o estudo do controle do gene *dagA* de *Streptomyces coelicolor* pelo fator σ^E (Lonetto et al., 1994). Neste estudo, foi demonstrado que o gene *sigE*, que codifica σ^E , possui alta similaridade de sequência a *rpoE* de *E.coli* e a fatores sigma presentes em outras bactérias e capazes de regular a expressão de genes cujos produtos localizam-se na região extracitoplasmática da célula. Assim, verificou-se a similaridade de *sigE* a *algU* de *Pseudomonas aeruginosa*, que até então havia sido identificado como um provável fator sigma capaz de regular genes envolvidos na biossíntese de alginato, exopolissacarídeo importante para a virulência (Martin et al., 1993), e a *carQ* de *Myxococcus xanthus*, que havia sido identificado como um regulador positivo da biossíntese de carotenóides de membrana em resposta a luz (McGowan

et al., 1993). Além disto, outros genes com similaridade aos descritos acima e cuja função ainda não havia sido determinada também foram encontrados na análise. Lonetto e colaboradores (1994) também observaram uma alta divergência entre as seqüências primárias deste grupo de fatores sigma e as de outros membros da família σ^{70} , uma vez que os primeiros não possuíam as regiões conservadas 1.2 e 3 (descritas anteriormente, no item 1.2.2). Por fim, a análise filogenética da família σ^{70} demonstrou que os fatores sigma ECF compõe uma subfamília distinta, mais próxima filogeneticamente do fator σ^H de *B.subtilis*, que atua na regulação da esporulação (Lonetto et al., 1994).

Desde então, fatores sigma ECF têm sido caracterizados em muitas bactérias, atuando na resposta a vários tipos de estresses ambientais, como: choque térmico, estresse oxidativo e tratamento com antibióticos (revisado em Helmann, 2002). A análise comparativa do número de genes codificando fatores ECF em genomas bacterianos já seqüenciados demonstrou que membros desta subfamília estão presentes em maior número em bactérias de vida livre e que apresentam a capacidade de colonizar diversos ambientes, como *P. aeruginosa* (19 genes que codificam ECFs), estando ausentes ou em menor número em bactérias patogênicas (Mittenhuber, 2002). Este dado indica a importância destes fatores sigma na adaptação ao ambiente e a alterações drásticas nas condições de crescimento.

A subfamília ECF possui também um subgrupo distinto, cujos membros estão envolvidos na resposta à queda nos níveis celulares de Fe, sendo homólogos ao fator *FecI* de *E.coli*. Estes fatores σ atuam no controle do operon *fecA*, que codifica os membros de um sistema de transporte de citrato férrico do ambiente. Em *E.coli*, a expressão do gene *fecI* (codifica σ^{FecI}) é induzida pela queda nos níveis intracelulares de Fe. Entretanto, o fator σ^{FecI} torna-se ativo apenas na presença de citrato férrico extracelular, que induz uma cascata de transdução de sinal (Braun, 1997).

Apesar da maioria dos membros da subfamília ECF já caracterizados atuar na regulação de funções extracitoplasmáticas, proteínas desta família envolvidas na resposta a estresses citoplasmáticos já foram descritas. Trata-se dos fatores RsrA de *S.coelicolor*, que regula genes de resposta à formação de pontes dissulfeto no citoplasma após estresse oxidativo, e σ^{H} de *Mycobacterium tuberculosis*, envolvido na resposta a choque térmico e estresse oxidativo (Paget et al., 1998; Paget et al., 2001; Raman et al., 2001). Os genes que codificam estes dois fatores sigma apresentam alta similaridade de sequência entre si.

A comparação entre promotores de genes regulados por fatores sigma ECF em diversas espécies de bactéria demonstra uma maior conservação na região -35, que em geral contém a sequência "AAC" (Hermann, 2002) (Tabela 1). O maior grau de divergência na região -10 deve-se provavelmente à menor conservação da região 2.4 entre os vários fatores ECF (Lonetto et al., 1994). Em algumas bactérias, fatores ECF distintos possuem a capacidade de reconhecer promotores bastante similares, o que gera sobreposição entre seus regulons. Esta sobreposição foi descrita em bactérias que contém vários fatores ECF, como por exemplo em *B.subtilis* e *M tuberculosis*, que possuem 7 e 10 fatores da família ECF, respectivamente (Huang et al., 1998; Raman et al., 2001). Em *B. subtilis*, demonstrou-se que σ^W e σ^X reconhecem alguns promotores em comum, embora possuam também exclusividade no reconhecimento de outros promotores (Huang et al., 1998). Verificou-se que a distinção entre promotores dependentes de σ^W e σ^X é determinada por variações na região -10, assim σ^W reconhece sequências -10 do tipo CGaC. σ^X apresenta especificidade por sequências CGTa e ambos são capazes de reconhecer promotores contendo a sequência CGTC na região -10 (Huang et al., 1998; Qiu & Hermann, 2001).

Em geral, os fatores sigma ECF regulam positivamente a expressão dos genes que os codificam (autorregulação positiva). Além disto, tem sido demonstrado que estes genes estão organizados em operons, sendo o primeiro gene responsável por codificar o fator sigma,

enquanto os genes a 3' deste codificam proteínas que atuam como reguladores negativos de sua atividade, denominados fatores anti-sigma (Hermann, 2002).

Tabela 1: Exemplo de promotores consenso reconhecidos por fatores ECF em diferentes bactérias. Os nucleotídeos representados em letras maiúsculas apresentam maior grau de conservação entre os diversos promotores identificados. As referências bibliográficas nas quais cada um dos consensos foi estabelecido estão indicadas abaixo da tabela. Adaptado de Hermann, 2002.

Fator ECF	Promotor Consenso	Sinais Indutores / Função
σ^X (<i>B.subtilis</i>)	tGtAAC (15-16) CGwC	Modificação do Envelope Celular em Resposta a Presença de Compostos Antimicrobianos ^a
σ^R (<i>S.coelicolor</i>)	GGGAAT (17) cGTTg	Resposta a estresse por formação de pontes dissulfeto no citoplasma ^b
σ^E (<i>E.coli</i>)	ggAACtttt (16) tCaaa	Resposta a choque térmico, choque osmótico. Regulação de proteases e chaperonas periplasmáticas ^c .
σ^{Hl} (<i>M.tuberculosis</i>)	C/gGGAAC (17) g/cGTTg/c	Resposta a choque térmico e estresse oxidativo ^d

a- Huang & Hermann, 1998. b- Paget et al., 2001. c- Rhodius. V. (Dados não publicados).
d- Manganelli et al., 2002.

1.3.2) Regulação da Atividade de Fatores ECF: os Fatores Anti-Sigma

Além da conservação de sequência e de especificidade por promotores-alvo verificada entre os membros da subfamília ECF, os mecanismos de resposta a sinais indutores extracitoplasmáticos têm se mostrado bastante similares nas espécies onde foram caracterizados. Assim, os fatores ECF são regulados negativamente pela presença de fatores anti-sigma, proteínas capazes de se associar ao sigma na ausência de sinais indutores, impedindo sua ligação à RNA polimerase e a ativação de seus promotores-alvo. Na maioria dos organismos nos quais esta regulação já foi elucidada, os fatores anti-sigma são proteínas de membrana, podendo conter apenas 1 domínio transmembrana, como os fatores RseA de *E.coli* e MucA de *P.aeruginosa* (De Las Penas et al., 1997; Mathee et al., 1997; Missiakas et al., 1997) ou até 6 domínios transmembrana, como o fator CarR de *M.xanthus* (McGowan et

al., 1993). Nestes casos, a porção amino-terminal dos fatores anti-sigma localiza-se no citoplasma, sendo responsável pela associação ao fator sigma, enquanto o domínio carboxi-terminal é periplasmático e atua na percepção dos sinais indutores extracitoplasmáticos (Campbell et al., 2003; Schobel et al., 2004). Entretanto, um fator anti-sigma solúvel foi descrito em *S.coelicolor* (RsrA) e regula o fator ECF RsrA, que atua na resposta a sinais citoplasmáticos (Kang et al., 1999).

A estrutura do complexo (σ -anti σ) foi elucidada em *E.coli* e *S.coelicolor* e verificou-se que a formação deste complexo envolve as regiões do fator σ responsáveis pela associação à RNA polimerase, impedindo, assim, a formação da holoenzima (Campbell et al., 2003; Li et al., 2002). Os mecanismos que levam à liberação do sigma após os sinais indutores extracitoplasmáticos são bastante conhecidos em *E.coli* (revisado em Alba & Gross, 2004). Neste modelo, a liberação de σ^E ocorre devido a proteólise seqüencial do anti-sigma, RseA, induzida pelo acúmulo de porinas desnoveladas no periplasma. Assim, a porção carboxi-terminal das porinas desnaturadas liga-se à protease de membrana DegS, induzindo-a a degradar o domínio periplasmático do anti-sigma (Walsh et al., 2003). A proteína RseA degradada em sua porção carboxi-terminal torna-se substrato para outra protease de membrana, denominada YaeL, que degrada a porção transmembranar de RseA, liberando o domínio amino-terminal de RseA associado a σ^E no citoplasma (Alba et al., 2002; Kanehara et al., 2002). O domínio citoplasmático de RseA é então degradado pela protease ClpX/P, liberando σ^E e permitindo sua associação à RNA polimerase (Flynn et al., 2004) (Figura 3). Um mecanismo similar foi descrito em *B.subtilis*, no qual a ativação de σ^W também depende da degradação do anti-sigma de membrana RsiW, mediada por uma protease ortóloga a YaeL, denominada YluC (Schobel et al., 2004). Além disto, ortólogos aos genes que codificam σ^E , RseA, DegS e YaeL foram encontrados em muitos membros da sub-divisão γ de

proteobacteria, sugerindo que este mecanismo seja conservado nestas bactérias (Alba & Gross, 2004).

Figura 3: Esquema representativo da sinalização responsável pela regulação da atividade de σ^E em *E. coli* (adaptado de Alba & Gross, 2004). Os eventos de proteólise sequencial de RseA estão indicados pelas setas 1, 2 e 3. Abreviaturas: M.E. = membrana externa; M.I. = membrana interna; Perip. = espaço periplasmático; OMPd = OMP desnaturada.

Além da organização em operon dos genes que codificam os fatores sigma e anti-sigma, em muitos casos há uma sobreposição entre o códon de término de tradução do fator sigma e o códon de início do anti-sigma, o que sugere um acoplamento traducional entre os dois fatores, conforme já demonstrado para os fatores CarQ e CarR em *M. xanthus* (Missiakas et al., 1997; Gorham et al., 1996). Foi sugerido que o acoplamento traducional seria importante por permitir que o σ recém-sintetizado se associe ao fator anti-sigma nascente antes de sua ligação à membrana, tornando esta associação mais provável que a ligação do σ à RNA polimerase (Gorham et al., 1996).

Além disso, a autorregulação positiva do operon contendo os genes para o fator sigma e seu anti-sigma correspondente permite a amplificação do sinal após a ativação do sigma e, posteriormente, o silenciamento da resposta pelo aumento nos níveis do anti-sigma presente na célula (Helmann, 2002).

1.4) A Resposta a Estresses em Bactérias e o Papel de Fatores Sigma ECF

1.4.1) Resposta a Choque Térmico

A maioria dos organismos apresenta mecanismos de resposta a aumentos drásticos na temperatura do ambiente em que habitam. Este aumento de temperatura promove a desnaturação de proteínas e impede o seu correto enovelamento, podendo levar à formação de grandes agregados protéicos.

A resposta a este tipo de estresse no citoplasma bacteriano é bastante conhecida e ocorre pela indução da síntese de um pequeno número de proteínas denominadas HSPs ("heat shock proteins"). Estas proteínas de choque térmico atuam principalmente como chaperones ou proteases, tendo papel fundamental também em condições fisiológicas normais. As chaperones interagem com polipeptídeos recém-sintetizados, promovendo o seu correto enovelamento e associam-se a proteínas a serem secretadas ou transportadas através de membranas, garantindo o seu correto endereçamento. Além disso, estas proteínas auxiliam na formação de complexos oligoméricos e são capazes de direcionar proteínas desnaturadas para degradação. Desta forma, o aumento na síntese de HSPs após o choque térmico restaura o balanço entre chaperonas e proteases e seus substratos. Em *E.coli*, a resposta ao choque térmico no citoplasma é desencadeada pelo fator σ^{32} , produto do gene *rpoH*, que regula positivamente a expressão de um regulon que codifica as principais HSPs, como DnaK, DnaJ, GroES e GroEL (Yura et al., 1993).

O estudo da resposta a choque térmico em *C. crescentus* mostrou a indução transitória de cerca de 20 polipeptídeos (Gomes et al., 1986). Vários genes de resposta ao choque

térmico já foram caracterizados em *C. crescentus*, incluindo *dnaKJ*, *groESL* e *hrcA/grpE* e todos eles são regulados positivamente pelo fator σ^{32} (Gomes et al., 1990; Avedissian et al., 1995; Avedissian & Gomes, 1996; Roberts et al., 1996; Reinsenuer et al., 1996; Wu & Newton, 1996). Verificou-se que DnaK atua como modulador negativo da resposta ao choque térmico em *C. crescentus*, por inibir a atividade de σ^{32} e estimular a sua degradação (da Silva et al., 2003). Além disto, o operon *groESL* também é regulado pela proteína repressora HrcA, que se associa ao elemento CIRCE, repetição invertida presente na região promotora do operon, inibindo a sua transcrição (Baldini et al., 1998; Roberts et al., 1996; Susin et al., 2004). Esta proteína está ausente em *E. coli*, sendo porém encontrada em diversas espécies de bactéria.

Em *E. coli*, verificou-se porém, que o fator σ^F controla um segundo regulon de resposta a choque térmico, cuja expressão é induzida apenas em temperaturas extremas, ou seja, acima de 45°C (Erickson & Gross, 1989; Wang & Kaguni, 1989). Em temperaturas extremas, a síntese de proteínas restringe-se àquelas necessárias para a resposta ao estresse. O regulon de σ^F foi identificado e verificou-se que, além de induzir a expressão de *rpoH*, este fator sigma é responsável pela indução de 20 genes cujos produtos estão envolvidos no enovelamento e degradação de proteínas periplasmáticas e na biogênese e transporte de lipopolissacarídeos (Dartigalongue et al., 2001). O enovelamento de proteínas periplasmáticas depende de duas classes principais de proteínas: as peptidil-prolil-isomerases (Ppiases), que atuam sobre substratos que contém resíduos de prolina, e as Dsbs (“dissulfide bonds”), que facilitam a formação de pontes dissulfeto, importantes para a estabilidade das proteínas secretadas para o periplasma (Missiakas & Raina, 1997). Além destas duas classes de proteínas, o periplasma bacteriano possui também chaperones, que apesar de atuarem de forma bastante distinta daquelas presentes no citoplasma, também previnem agregação e auxiliam no enovelamento e translocação do pilus, de lipoproteínas e de porinas (Missiakas & Raina, 1997). Dentre os

membros do regulon de σ^E podem ser destacados os genes que codificam as Ppiases SurA e FkpA, a proteína DsbC e as chaperones periplasmáticas HtrA (que também atua como protease) e Skp (Dartigalongue et al., 2001).

Fatores sigma ECF são importantes na resposta a choque térmico em várias outras bactérias. Assim, a análise do fenótipo de cepas mutantes no gene *algU* de *P. aeruginosa*, homólogo a *rpoE* e que codifica o fator σ^{AlgU} , demonstrou maior sensibilidade a choque térmico extremo (50°C) (Martin et al., 1994). A identificação do gene *rpoE*, que codifica um fator ECF em *Vibrio angustum*, também demonstrou seu papel na resposta a choque térmico extremo, uma vez que a cepa mutante em *rpoE* é bastante sensível ao tratamento a 40°C e o gene é altamente induzido por este tratamento (Hild et al., 2000). Além disto, a análise do perfil de proteínas de membrana da cepa mutante em *rpoE* de *V. angustum* demonstrou uma grande alteração na composição do envelope em comparação com a cepa selvagem, o que indica que este fator ECF também atua na resposta a alterações neste compartimento da célula (Hild et al., 2000). Em *B. subtilis*, a cepa mutante no gene que codifica σ^X apresenta maior sensibilidade a choque térmico, porém este gene não é induzido pelo estresse de temperatura e membros de seu regulon não estão envolvidos diretamente na resposta a choque térmico, o que indica que o fenótipo observado seja um efeito indireto relacionado a alterações na integridade da parede celular após o tratamento (Huang et al., 1997; Huang & Helmann, 1998).

O fator SigH de *M. tuberculosis* também está envolvido na resposta ao choque térmico, porém ao contrário dos fatores ECF citados acima, é responsável pela regulação de funções citoplasmáticas, atuando na indução de *clpB* e *dnaK*, membros do regulon de σ^{32} em *E. coli* (Raman et al., 2001). Da mesma forma, este fator σ^{ECF} regula a resposta citoplasmática a estresse oxidativo nesta bactéria (Manganelli et al., 2002). Um fator ECF com papel na resposta citoplasmática a choque térmico também foi identificado na bactéria *Deinococcus*

radiodurans. Assim, verificou-se que a cepa de *D. radiodurans* mutante no gene *sigl*, apresenta alta sensibilidade a choque térmico (48°C) e que este gene é necessário para a indução de *groESL* e *dnaKJ* após este estresse (Schmid & Lidstrom, 2002).

1.4.2) Resposta a Estresse Osmótico e Salino

Em condições fisiológicas de crescimento, as células procarióticas mantêm a pressão osmótica intracelular maior que a do ambiente, evitando a perda de água e mantendo o turgor celular, importante para sua morfologia e fisiologia. Porém, aumentos drásticos na osmolaridade do ambiente podem levar à morte celular por plasmólise devido ao efluxo rápido da água do interior da célula para o meio externo. Desta forma, as bactérias desenvolveram uma série de estratégias de resposta ao choque hiperosmótico, que se baseiam na regulação da concentração de solutos osmoticamente ativos no citoplasma (Bremer & Kramer, 2000).

O principal mecanismo de resposta celular ao choque hiperosmótico é o acúmulo de solutos compatíveis, ou seja, solutos orgânicos que podem estar presentes em altas concentrações sem afetar a fisiologia da célula, como a glicina betaína e a trealose. Este mecanismo leva ao aumento da pressão osmótica intracelular, equilibrando-a com o ambiente externo. O aumento da concentração destes solutos ocorre pela ativação de sistemas de transporte de alta afinidade e pela indução de genes para a biossíntese destas moléculas (Bremer & Kramer, 2000). Em bactérias Gram-negativas, estes solutos compatíveis precisam ser transportados também através da membrana externa, o que ocorre através da porina denominada OmpC, cuja expressão é bastante aumentada após choque osmótico.

Em *E.coli*, a resposta a choque osmótico durante a fase exponencial de crescimento é mediada principalmente pelo fator σ^S , produto do gene *rpoS*, que regula a expressão de genes que codificam as proteínas envolvidas no transporte e biossíntese dos solutos compatíveis

(Hengge-Aronis, 1996). Entretanto, verifica-se também a indução dos regulons de σ^{32} e σ^E em resposta a este tratamento (Bianchi & Baneyx, 1999). A indução destes dois regulons deve ser decorrente do acúmulo de proteínas desnaturadas no citoplasma e periplasma bacterianos durante a fase inicial do choque osmótico, período no qual ocorre um efluxo de água do interior da célula e uma redução transiente no turgor celular. Além disto, a indução de chaperones torna-se necessária devido ao aumento rápido na síntese de proteínas envolvidas na resistência ao estresse, que devem ser corretamente enoveladas e transportadas (Bianchi & Baneyx, 1999).

O papel de fatores σ da subfamília ECF na resposta a choque osmótico também foi demonstrado em outras bactérias. Em *B. subtilis*, parte da resposta a choque osmótico é mediada pelo fator σ^B , regulador global da resposta a estresses nesta bactéria. Porém, o fator ECF σ^M também se mostrou essencial para a resposta a estresse salino. Além do crescimento muito reduzido na presença de altas concentrações de sal, a cepa mutante no gene que codifica σ^M apresenta alterações drásticas em sua morfologia e um alto grau de lise celular, o que indica um papel de σ^M na manutenção da integridade da membrana durante o estresse salino (Horsburgh & Moir, 1999). Verificou-se que σ^M e σ^B possuem diferentes padrões temporais de expressão estando presentes em maiores concentrações na fase inicial e tardia do crescimento exponencial, respectivamente. Assim, foi sugerido que cada um deles atue na resposta a choque osmótico em fases diferentes do crescimento da bactéria (Horsburgh & Moir, 1999). Além disto, a expressão de σ^M também se mostrou induzida por outros estresses, como etanol, choque térmico e tratamento com antibióticos que inibem a biossíntese da parede celular, o que indica um papel deste fator na resposta a estresses que afetam a integridade do envelope em *B. subtilis* (Thackray & Moir, 2003).

Da mesma forma, o fator ECF AlgU de *Pseudomonas fluorescens* também mostrou-se essencial na resposta a choque hiperosmótico, pelo tratamento com NaCl e sorbitol (Schnider-Keel et al., 2001).

Em *C. crescentus*, a resposta a choque osmótico ainda é pouco conhecida. Recentemente, a varredura de uma biblioteca de mutantes de inserção do transposon Tn5 levou à identificação de cinco genes importantes para a resistência a estresse salino em *C. crescentus*. Dentre estes, três genes codificam proteínas envolvidas na biossíntese de LPS, um dos genes codifica uma proteína de transporte do tipo antiporte, envolvida no efluxo de Na⁺ e o produto do quinto gene é uma proteína com similaridade a Ppiase PpiD de *E.coli*, envolvida no enovelamento de proteínas no periplasma e citoplasma (Zuleta et al., 2003). Estes resultados demonstram a importância da manutenção da integridade e estabilidade do envelope celular na resposta a este estresse. A ausência de homólogos de *rpoS* em *C. crescentus* (Nierman et al., 2001) indica um papel de outros fatores sigma na resposta ao estresse osmótico.

1.4.3) Resposta a Estresse Oxidativo

O estresse oxidativo é causado pela exposição a espécies ativas de oxigênio (EAO), tais como, ânion superóxido (O₂^{•-}), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radical hidroxila (HO[•]). Estas espécies causam danos a proteínas, DNA e membranas e são um subproduto inevitável do modo de vida aeróbico, pois são geradas a partir da oxidação de componentes da cadeia respiratória mediada pelo oxigênio. Com o objetivo de evitar os efeitos danosos das EAO, as células expressam de forma constitutiva uma série de enzimas capazes de reparar os danos a biomoléculas e de detoxificar as EAO (revisado em Storz & Imlay, 1999). Entretanto, estes mecanismos de defesa tornam-se insuficientes quando ocorre um aumento na taxa de geração destas substâncias, dando origem ao estresse oxidativo.

As espécies $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 geram danos distintos às células, uma vez que apresentam diferente reatividade com biomoléculas. O principal efeito causado pelo ânion superóxido é a inativação de enzimas que contêm centros Fe-S, através da oxidação destes complexos. O H_2O_2 , por sua vez, é capaz de oxidar resíduos de metionina e cisteína em proteínas, causando a formação de pontes dissulfeto indesejáveis e a inativação de enzimas. Além disto, H_2O_2 reage com íons Fe^{2+} livres (reação de Fenton), gerando $HO^{\bullet}$, um potente oxidante capaz de reagir com diferentes biomoléculas. Uma vez que o Fe^{2+} livre tende a se localizar próximo aos ácidos nucleicos, o DNA é o principal alvo de oxidação por $HO^{\bullet}$, dando origem a um grande espectro de lesões na molécula. Além destes efeitos, as EAO causam danos a membrana através da peroxidação de lipídeos (Storz & Imlay, 1999).

Os mecanismos de resposta às diferentes EAO também são distintos. Assim, o acúmulo de $O_2^{\bullet-}$ induz os reguladores SoxR e SoxS, levando à indução de um regulon que inclui genes como *sodA*, que codifica uma das superóxido-dismutases citoplasmáticas bacterianas, enzimas que convertem o $O_2^{\bullet-}$ em H_2O_2 , e genes envolvidos no efluxo de compostos que geram $O_2^{\bullet-}$. Da mesma forma, a resposta ao acúmulo de H_2O_2 é mediada pela proteína OxyR, cujo regulon inclui o gene *katG*, que codifica a catalase, enzima responsável pela conversão do H_2O_2 em H_2O (Storz & Imlay, 1999). Além disto, verificou-se que o fator σ^S , importante na resposta à fase estacionária e a outros estresses, regula a expressão de vários genes que codificam proteínas antioxidantes. Esta regulação mediada por σ^S leva a uma resistência aumentada a estresse oxidativo durante a fase estacionária de crescimento em *E.coli* (Hengge-Aronis, 2000).

Entretanto, fatores sigma ECF também têm sido implicados na resistência a estresse oxidativo. A ausência de um fator ECF em *V. angustum* leva à sensibilidade ao estresse oxidativo (H_2O_2) após 24 h de carência de fontes de carbono, verificando-se muitas alterações na composição protéica do envelope nestas condições. Conforme citado anteriormente, este σ

também está envolvido na resposta a choque térmico extremo nesta bactéria (Hild et al., 2000). Da mesma forma, a ausência de σ^E em *Salmonella typhimurium* causa sensibilidade a estresse oxidativo (H_2O_2 e compostos que geram $O_2^{\bullet-}$) apenas durante a fase estacionária de crescimento. Verificou-se também a indução da expressão de σ^E na cepa mutante no gene *sodC*, que codifica uma superóxido-dismutase periplasmática, indicando um papel deste fator na resposta a alterações no equilíbrio redox do envelope celular em *Salmonella* (Testerman et al., 2002). Este fator σ mostrou-se essencial para a virulência de *Salmonella* em camundongos, devido provavelmente à sensibilidade às EAO liberadas pelo sistema imune durante a infecção (Testerman et al., 2002).

A regulação da resposta a estresse oxidativo dependente fator σ^R em *S. coelicolor* já é bem conhecida. Este σ , codificado pelo gene *sigR*, é essencial para a resistência a compostos que geram $O_2^{\bullet-}$ e a drogas como a diamida, que promovem a formação de pontes dissulfeto indesejadas em proteínas citoplasmáticas, devido à oxidação de grupamentos tiol (Paget et al., 1998). Foi demonstrado que σ^R é responsável pela indução do operon que codifica as enzimas tioredoxina e tioredoxina redutase (*trxB*), que atuam na redução das pontes dissulfeto geradas pelo tratamento com diamida. Este fator σ é regulado por um fator anti-sigma citoplasmático, denominado RsrA, que se associa a σ^R em condições redutoras, inibindo sua atividade. O tratamento com diamida promove a formação de pontes dissulfeto em RsrA, que assim perde a afinidade por σ^R , permitindo sua ligação a RNA polimerase e a ativação dos promotores-alvo (Kang et al., 1999). Posteriormente, demonstrou-se que o fator σ^H de *M. tuberculosis*, homólogo a σ^R , também está envolvido na resposta a diamida, regulando o operon *trxB*, e apresentando um mecanismo similar de regulação por um anti-sigma (RshA) (Manganelli et al., 2002; Song et al., 2003). Outros fatores σ importantes na resposta a

estresse oxidativo podem ser citados, como σ^{AlgU} de *P. aeruginosa* e σ^{M} de *B. subtilis* (Martin et al., 1994; Thackray & Moir, 2003).

1.4.4) Resposta à Fase Estacionária

Em seu habitat natural, as bactérias passam a maior parte de sua existência em condições de falta de nutrientes, e por isso, crescem e se dividem muito lentamente, ou seja, estão em fase estacionária de crescimento. A fase estacionária inicia-se quando a densidade ótica ou o número de unidades formadoras de colônia de uma cultura bacteriana param de aumentar, pelo esgotamento dos nutrientes disponíveis no meio externo. Assim, a carência nutricional é o principal sinal que desencadeia a entrada na fase estacionária, marcada por alterações no padrão global de expressão gênica, que modificam a morfologia e fisiologia bacterianas e permitem que as células sobrevivam na ausência de nutrientes. Em algumas bactérias, como *B. subtilis* e *S. coelicolor*, a carência nutricional leva à formação de esporos. Em *E. coli* e outras bactérias incapazes de formar esporos, a fase estacionária induz a resistência a uma série de estresses ambientais, como choque térmico, estresse oxidativo e osmótico (Jenkins et al., 1988; 1990). Estas respostas à entrada na fase estacionária são mediadas por fatores sigma, que têm sua concentração aumentada pela carência nutricional. Em *E. coli*, esta resposta depende do fator σ^{S} , que também é induzido durante a fase exponencial por alguns estresses ambientais (Hengge-Aronis, 2000). Outros reguladores porém, devem estar envolvidos nesta resposta em outras bactérias, uma vez que, até o momento, homólogos a σ^{S} foram encontrados apenas na subdivisão γ de proteobacteria (Hengge-Aronis, 2002).

As alterações morfológicas promovidas durante a fase estacionária em *C. crescentus* foram descritas por Wortinger e cols (1998). Verificou-se que, a partir de 18 h de crescimento em cultura, a grande maioria das células está no estágio sésil ou pré-divisional. Observou-se

também que há uma queda na viabilidade nos primeiros dias em cultura, que é recuperada a partir do 6º dia, o que coincide com o alongamento das células. Após este período de recuperação (6º ao 9º dias) há uma estabilização do número de células viáveis, que continuam alongando-se e passam a adquirir uma morfologia helicoidal. Foi sugerido que o aumento de viabilidade entre os dias 6 a 9 seja decorrente da capacidade das células sobreviventes aos primeiros dias de crescimento em cultura de utilizar nutrientes liberados pelas células mortas. Após este período de recuperação, a divisão celular cessa e as células se alongam, mantendo o número de células viáveis estável por até 3 semanas. Culturas de 24 h e de 2 semanas também apresentaram resistência aumentada a estresse oxidativo (H_2O_2), choque térmico e pH ácido e alcalino, quando comparadas a culturas em fase exponencial. Os mecanismos de regulação destas alterações morfológicas e fisiológicas não foram identificados até o momento.

Verificou-se também o papel de fatores ECF na adaptação à fase estacionária de crescimento. Em *E.coli*, a expressão de *rpoE* (codifica σ^E) é bastante aumentada na fase estacionária e observou-se que σ^E atua na indução da lise de células mortas e consequente liberação de seus nutrientes no meio durante esta fase de crescimento, o que é importante para a manutenção das células viáveis (Nitta et al., 2000). Além disto, conforme citado anteriormente (item 1.4.3), os fatores ECF σ^E de *V. angustum* e σ^E de *S. typhimurium* são essenciais para a resistência a estresse oxidativo apenas durante a fase estacionária (Hild et al., 2000; Testerman et al., 2002). Em *S. typhimurium*, verificou-se a indução da expressão de σ^E em resposta à fase estacionária, não havendo indução em resposta a estresse oxidativo, o que indica que o sinal indutor de σ^E seja a transição entre as fases de crescimento (Testerman et al., 2002).

1.5) Os Fatores ECF de *C. crescentus*

Caulobacter crescentus está sujeita a uma série de estresses ambientais, uma vez que é uma bactéria de vida livre, capaz de viver em ambientes oligotróficos e em altas concentrações de oxigênio (Poindexter, 1981). Assim, esta bactéria deve ter desenvolvido uma série de mecanismos de resposta a estresses e de captação de nutrientes do ambiente. O estudo destes mecanismos é de grande importância para a melhor compreensão da fisiologia desta bactéria.

O sequenciamento do genoma completo de *C. crescentus* demonstrou a presença de 13 genes que codificam fatores sigma da subfamília ECF nesta bactéria (Nierman et al., 2001). Um número maior de fatores ECF só foi encontrado em *S. coelicolor* (49 genes) e *P. aeruginosa* (19 genes) dentre os genomas já sequenciados (Helmann, 2002). Além disto, *C. crescentus* possui apenas 3 genes codificando outros fatores sigma, sendo eles: o fator vegetativo σ^{70} , σ^{32} , de resposta a choque térmico, e σ^{54} , que regula os genes para biossíntese de flagelo (Nierman et al., 2001). A análise filogenética dos membros da família ECF de *C. crescentus* indica que muitos dos genes que codificam estes fatores surgiram por duplicação gênica (Mittenhuber, 2002). O grande número de fatores sigma da subfamília ECF sugere que esta bactéria seja capaz de responder a uma série de estímulos extracelulares e que estas proteínas atuem como os principais reguladores da resposta a estresses ambientais em *C. crescentus*, compensando a falta de outros fatores sigma alternativos, como por exemplo, σ^S .

Através da análise estrutural do genoma de *Caulobacter*, essas proteínas podem ser subdivididas em 3 grupos, indicados na tabela 2. O primeiro grupo contém 4 membros e é composto por homólogos ao fator FecI de *E. coli* (cujas atividades são reguladas por ferro). Todos os membros deste grupo possuem um gene homólogo ao regulador de FecI, denominado FecR, no mesmo operon. A presença de 4 fatores FecI em *Caulobacter* sugere que estas proteínas exerçam outras funções além da regulação do metabolismo de ferro, uma vez que a

maioria das bactérias estudadas apresenta apenas um σ deste grupo. O segundo grupo de genes que codificam sigmas ECF de *Caulobacter* possui 2 membros, denominados *sigT* e *sigU*, ambos localizados próximo a genes que codificam histidina-quinases. Estes dois fatores sigma são transcritos especificamente na transição da célula móvel para célula talo e estão envolvidos na progressão do ciclo celular, sendo os mais similares dentre os 13 ECF encontrados (Laub et al., 2000). Os demais genes que codificam ECF foram agrupados em um terceiro grupo, não apresentando características em comum. Apenas um gene que codifica um potencial fator anti-sigma foi encontrado no genoma, localizado a 3' de *sigR*, em um mesmo operon. Este fator é homólogo ao anti-sigma ChrR de *Rhodobacter sphaeroides* (Newman et al., 2001).

Tabela 2: Os 13 ECF encontrados em *Caulobacter crescentus*, por similaridade de sequência. Estes fatores estão subdivididos de acordo com características estruturais comuns (Nierman et al., 2001). A nomenclatura utilizada foi fornecida por M.R.K. Alley (comunicação pessoal) e os números em parênteses correspondem à nomenclatura TIGR (www.tigr.org). Os fatores sigma estudados neste trabalho estão em negrito.

GRUPO 1: homólogos a <i>FecI</i>	GRUPO 2: próximos a histidina quinases — papel no ciclo	GRUPO 3: sem características comuns
Sig I (CC2707)	Sig T (CC3475)	Sig E (CC2751)
SigX (CC0561)	Sig U (CC2883)	Sig D (CC3266)
Sig P (CC0981)		Sig R (CC0648)
Sig C (CC1129)		Sig F (CC3253)
		Sig L (CC3310)
		Sig N (CC1646)
		Sig M (CC1649)

Previamente ao término do projeto de sequenciamento do genoma de *Caulobacter*, uma análise do banco de dados que continha a sequência parcial do genoma através da ferramenta BLAST levou à identificação de 5 ORFs capazes de codificar proteínas com similaridade a diversos ECF que já haviam sido descritos. Esta análise foi realizada em nosso laboratório pela então pós-doutoranda Regina Lúcia Baldini. Estas ORFs correspondem aos

genes *sigF*, *sigL*, *sigN*, *sigM* e *sigU* (nomenclatura fornecida por M.R.K. Alley, comunicação pessoal). A similaridade entre estes genes e genes que codificam fatores ECF de função conhecida em outras bactérias pode ser vista na Tabela 3. Além disto, a análise filogenética das proteínas codificadas pelos cinco genes em questão está indicada na figura 4A. Durante o trabalho realizado por R.L. Baldini, foram obtidos mutantes nulos para os genes *sigF* (SG447), *sigL* (SG678), *sigN* (SG1409-1) e *sigM* (SG1409-2), faltando apenas a obtenção do mutante no gene *sigU*. Construções contendo as regiões a 5' destes genes (potenciais promotores) fusionadas ao gene reporter *lacZ* também foram obtidas.

Tabela 3: Similaridade das regiões abertas de leitura que codificam os fatores ECF de *C. crescentus* estudados neste trabalho a fatores ECF caracterizados em outros organismos. A análise foi realizada pelo programa BLASTp do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O valor E corresponde ao “Evalue” e o número entre parênteses indica o “score”, ambos fornecidos pelo programa. (1) Wu et al., 1997; (2) Paget et al., 1998; (3) Chi & Bartlett, 1995; (4) Martinez-Salazar et al., 1996.

Orf	similaridade a σ^E de <i>E.coli</i>	proteína de função determinada com maior similaridade	Função
<i>SigF</i>	0.21 (37)	SigE de <i>M. tuberculosis</i> $E=3 \times 10^{-9}$ (63.2)	resposta a estresse oxidativo e ácido, exposição a detergente e choque térmico (1).
<i>SigU</i>	2×10^{-5} (50.8)	SigR de <i>S. coelicolor</i> $E = 1 \times 10^{-18}$ (94.4)	controle da expressão de tioredoxina em resposta a estresse oxidativo (2)
<i>SigL</i>	3×10^{-4} (46.2)	σ^E <i>Photobacterium profundum</i> $E = 7 \times 10^{-5}$ (48.1)	sobrevivência a alta pressão e baixa temperatura (3)
<i>SigN</i>	2×10^{-6} (53.1)	σ^{AlgU} <i>Azobacter vinelandii</i> $E= 5 \times 10^{-7}$ (55.5)	Biossíntese de alginato e resistência a compostos que geram $O_2^{\bullet}$ (4).
<i>SigM</i>	0.067 (39)	SigE <i>M.tuberculosis</i> $E = 2 \times 10^{-9}$ (63.9)	resposta a estresse oxidativo e ácido, exposição a detergente e choque térmico (1).

A análise estrutural das regiões contendo os genes que codificam os fatores ECF em estudo em nosso laboratório demonstra que 4 deles estão organizados em operons que incluem genes codificando proteínas contendo domínios transmembrana (Fig. 4B). Esta organização estrutural sugere que estes genes codificam fatores anti-sigma, que normalmente localizam-se na membrana interna. A única exceção a esta organização é o gene *sig U*, que não está em operon ou localizado próximo a genes codificando domínios transmembrana.

Figura 4: A) Árvore filogenética não-enraizada, construída pelo método de neighbor-joining utilizando as sequências codificadas pelos cinco genes caracterizados neste estudo. Os valores de “bootstrap” estão indicados em cada ramo. B) Análise estrutural das regiões contendo os genes que codificam os fatores ECF estudados neste trabalho (dados disponíveis no site da TIGR - www.tigr.org). As setas em laranja e amarelo correspondem a genes que codificam proteínas hipotéticas e hipotéticas conservadas, respectivamente. O número de domínios transmembrana está indicado nas proteínas hipotéticas onde foram encontrados. As setas azuis correspondem a genes que codificam fatores ECF. As setas em vermelho representam homólogos a genes com função determinada.

2) OBJETIVOS

Este trabalho tem como objetivo analisar o papel dos cinco genes que codificam fatores sigma extracitoplasmáticos já isolados em nosso laboratório (*sigF*, *sigU*, *sigL*, *sigM* e *sigN*) na resposta a estresses em *C. crescentus* e identificar possíveis genes-alvo de regulação por estas proteínas.

Para isso, a metodologia utilizada baseou-se na análise do fenótipo de cepas mutantes nestes genes em diversas condições de crescimento e estresses, além da análise da expressão destes genes nestas condições.

3) MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Linhagens, meios e condições de cultura.

As linhagens de *C. crescentus* e *E.coli* utilizadas estão descritas nas tabelas 4 e 5, respectivamente.

Tabela 4: Linhagens de *C. crescentus*.

Linhagens de <i>C. crescentus</i>	Características	Fonte ou Referência
NA1000	Sincronizável, derivada da CB15	Evinger & Agabian, 1977
SG447	Mutante em <i>sigF</i> por inserção de cassete de resistência a espectinomicina.	R.L. Baldini
SG678	Mutante em <i>sigL</i> por inserção de cassete de resistência a espectinomicina.	R.L. Baldini
SG1409-1	Mutante em <i>sigN</i> por inserção de cassete de resistência a espectinomicina.	R.L. Baldini
SG1409-2	Mutante em <i>sigM</i> por inserção de cassete de resistência a espectinomicina.	R.L. Baldini
SG546	Mutante em <i>sigU</i> por inserção de cassete de resistência a espectinomicina.	Este trabalho
SG16	Mutante por deleção em fase de <i>sigF</i>	Este trabalho
SG16C	Mutante condicional a presença de xilose no gene <i>sigF</i> . Derivado da cepa SG16.	Este trabalho
UJ270	Mutante condicional no gene <i>clpP</i>	Jenal et al., 1998
UJ271	Mutante condicional no gene <i>clpX</i>	Jenal et al., 1998

Tabela 5: Linhagens de *E. coli*.

Linhagens de <i>E. coli</i>	Características	Fonte ou Referência
S17-1	294::RP4-2 (Tc::Mu)(Km::Tn7)	Simon et al., 1983.
DH5 α	<i>supE44 lacU169</i> (80 <i>lacZ</i> M15) <i>hsdR17 recA1 endA11 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan, 1983.

As linhagens de *E. coli* foram cultivadas a 37°C, em meio LB (triptona 10 g/l; extrato de levedura 5 g/l; NaCl 10 g/l; pH 7,5). Os antibióticos utilizados para seleção foram: ampicilina (100 µg/ml), canamicina (50 µg/ml), tetraciclina (12,5 µg/ml), espectinomicina (30 µg/ml) ou cloranfenicol (30 µg/ml).

As linhagens de *C. crescentus* foram cultivadas a 30°C em meio PYE (peptona 2 g/l; extrato de levedura 1 g/l; MgSO₄ · 7H₂O 0,2 g/l; CaCl₂ 0,5 mM). Quando necessário, acrescentou-se tetraciclina (2 µg/ml), ácido nalidíxico (20 µg/ml), espectinomicina (40 µg/ml), cloranfenicol (1 µg/ml) e/ou canamicina (10 µg/ml).

Para o crescimento em meio sólido, adicionou-se 1,5% de ágar aos meios de cultura. Estoques de *E.coli* e *C. crescentus* foram mantidos em 10% de DMSO e armazenados a – 80°C.

3.2) Vetores, construções e oligonucleotídeos

As tabelas 6 e 7 descrevem os plasmídeos e construções utilizadas, respectivamente. Os oligonucleotídeos estão descritos na tabela 8 e foram sintetizados na escala de 200 nmol ou 10 nmol, desbloqueados e dessalinizados (Invitrogen e Promicro).

Tabela 6: Plasmídeos utilizados.

Plasmídeo	Características	Fonte ou referência
pUCBM21	Vetor de clonagem, replicon ColE1, Ap ^r	Böehringer Mannheim
pPROEX-HTa	Vetor de expressão em <i>E.coli</i> , que adiciona 6 resíduos de histidina na porção amino-terminal da proteína cujo gene foi clonado	GE Healthcare
PGEM T-Easy	Vetor de clonagem, Amp ^R	Promega
placZ290	Vetor para fusão de transcrição ao gene repórter <i>lac Z</i> , Tc ^r , replicon IncP1, oriT	Gober & Shapiro, 1992
pJS14	Derivado do pBBR1MCS, replicon ColE1 e P15a, Cm ^R , mob.	Kovach et al., 1995
pNPTS138	Replicon ColE1, oriT, <i>npt</i> (Km ^r), <i>sacB</i>	M.R.K. Alley
PNPT228XNE	Derivado do pNPT 228, contendo locus do gene <i>xytX</i> , Kan ^R	Jenal, U. & Fuchs, T.
pHP45Ω	Derivado do pBR322, contendo cassete de resistência a espectinomicina, Amp ^R	Prentki and Krisch, 1984

Tabela 7: Construções utilizadas.

Construção	Vetor	Descrição
pRB73	placZ290	Fragmento <i>EcoRI</i> / <i>Bam</i> HI (770 pb) com a potencial região regulatória do gene <i>sigL</i> (R.L. Baldini)
pRB74	placZ290	Fragmento de 480 pb <i>EcoRI</i> / <i>Xba</i> I com a potencial região regulatória do gene <i>sigN</i> (R.L. Baldini)
pRB75	placZ290	Fragmento <i>EcoRI</i> / <i>Bam</i> HI de 350 pb com a potencial região regulatória do gene <i>sigM</i> (R.L. Baldini)
pRB80	pUCBM21	Fragmento de 5,2 kb <i>Sac</i> I/ <i>Nco</i> I obtido de biblioteca parcial, contendo o gene <i>sigF</i> e regiões que o flanqueiam (R.L. Baldini).
pRB82	pUCBM21	Fragmento <i>Apa</i> I de 1,3 kb, obtido a partir da construção pRB80. Contém o gene <i>sigF</i> e regiões que o flanqueiam (155 pb a 3' e 698 pb a 5' do gene) (R.L. Baldini).
pRB83	pNPTS138	Fragmento <i>Apa</i> I (1,3 kb) obtido a partir da construção pRB82, contendo cassete Ω de resistência a espectinomicina inserido no sítio de <i>Sma</i> I do gene <i>sigF</i> (R.L. Baldini).
pRB84	pMR20	Fragmento <i>Apa</i> I de 1,3 kb obtido a partir da construção pRB82 (R.L. Baldini).
pCM20	pUCBM21	Fragmento contendo deleção em fase de 345 pb da região codificadora de <i>sigF</i> (este trabalho).
pCM21	pNPTS138	Fragmento de deleção obtido por digestão <i>EcoRI</i> / <i>Hind</i> III a partir da construção pCM20 (este trabalho).
pCM22	pNPT228XNE	Fusão de tradução de <i>sigF</i> ao sexto códon do gene <i>xytX</i> (este trabalho). O fragmento contendo o gene <i>sigF</i> foi obtido por PCR a partir da construção pRB82.
pRB70	placZ290	Fragmento <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III de 669 bp contendo a região regulatória de <i>sigF</i> (R.L. Baldini)
pCM70	pJS14	Fragmento <i>EcoRI</i> / <i>Kpn</i> I de 650 pb obtido por PCR, contendo a região codificadora de <i>sigF</i> (este trabalho).
pCM24	pPROEXHTa	Fusão de tradução de <i>sigF</i> à sequência que codifica cauda de 6 histidinas (este trabalho).
pRB60	pUCBM21	Fragmento de 1,9 kb <i>Sac</i> I/ <i>Xba</i> I contendo o gene <i>sigU</i> e regiões que o flanqueiam (R.L. Baldini).
pCM61	pNPTS138	Fragmento <i>Apa</i> I obtido a partir do pRB60 contendo o gene <i>sigU</i> interrompido pelo cassete Ω de resistência a espectinomicina em sítio de <i>Stu</i> I (este trabalho).
pRB72	placZ290	Fragmento <i>EcoRI</i> / <i>Bam</i> HI de 600 pb contendo a região regulatória do gene <i>sigU</i> (R.L. Baldini)
pCM62	pPROEXHTa	Fusão de tradução de <i>sigU</i> à sequência que codifica cauda de 6 histinas (este trabalho).

Tabela 8: Oligonucleotídeos utilizados.

Nome	Seqüência	Gene Alvo / utilização
pXNE5'	5' ATTGAATTCATGCTACGCGGCCTGGAC 3'	<i>sigF</i> (construções pCM24 e pCM22)
lac447for	5' TTAGGTACCTCGGCGAACAAAATTTCA 3'	<i>sigF</i> (construção pCM70).
lac447rev	5' TTAGAATTCCGGCCAGGGCGTCGATCA 3'	<i>sigF</i> (construções pCM 22, 24 e 70)
sigF-5'	5' AATTCTCGAGGCGGTAGGCGGCGGTGTC 3'	<i>sigF</i> (deleção em fase <i>sigF</i>)
sigF-3'	5' AATTCTCGAGCTGACGGGGTTGTCACTG 3'	<i>sigF</i> (deleção em fase <i>sigF</i>)
reverse (-24) M13	5' AACAGCTATGACCATG 3'	pUCBM21 (deleção em fase <i>sigF</i>)
forward (-20) M13	5' GTAAAACGACGGCCAGT 3'	pUCBM21 (deleção em fase <i>sigF</i>)
PesigU	5' GAGTCTGCTGGTCCATCT 3'	<i>sigU</i> (ensaio de extensão de oligonucleotídeo)
PESigE2	5' TCCAGGCCGCGTAGCATC 3'	<i>sigF</i> (ensaio de extensão de oligonucleotídeo)
Ei3	5' TATGAATTCTGACAACCCCGTCAGTT 3'	<i>sigF</i> (RT-PCR)
Ei5	5' TATGGATCCGATGTGGAGGATCTGGTG 3'	<i>sigF</i> (RT-PCR)
546a	5' GGAATTCGCCCCGCTCGCTGTGC 3'	<i>sigU</i> (RT-PCR e construção pCM62).
546b	5' TGGATCCAGCTCGGCGCGGGCGC 3'	<i>sigU</i> (RT-PCR)
lac546rev	5' AATGAATTCGGCTCCCTCCAAAGCTAA 3'	<i>sigU</i> (construção pCM62).
678RT1	5' CCACAACGCCGCCCTGAC 3'	RT-PCR <i>sigL</i>
678RT2	5' AGACGCGCCCCGACATTG 3'	RT-PCR <i>sigL</i>
MsrA	5' CGACCTATCGGGATGTCA 3'	RT-PCR <i>msrA</i>
MsrB	5' GTAGTCGCGGTGATATTC 3'	RT-PCR <i>msrA</i>
CC3252for	5' GGTGCTGGGCTGGCTTCA 3'	RT-PCR gene CC3252
CC3252rev	5' AAACCCAGCACCAAGAT 3'	RT-PCR gene CC3252
CC3255for	5' CGCGGCGTCCCGTCTCGCTA 3'	RT-PCR gene CC3255
CC3255rev	5' GACGAAGACGTTGTTGA 3'	RT-PCR gene CC3255
CC3572for	5' CAACCTGCTGACCAAGAA 3'	RT-PCR gene CC3572
CC3572rev	5' CGAGATTGCAGTTGAAGA 3'	RT-PCR gene CC3572
SodAfor	5' TATGTGAACGCGCTGAA 3'	RT-PCR gene <i>sodA</i>
SodArev	5' CTTTCCCTCGCTCCAGAT 3'	RT-PCR gene <i>sodA</i>

3.3) Isolamento de plasmídeos, digestão com enzimas de restrição, ligação e sequenciamento.

Os plasmídeos foram extraídos pelo método de lise alcalina, como descrito em Sambroock *et al.* (1989). As digestões com enzimas de restrição foram realizadas conforme especificações dos fabricantes.

Os fragmentos resultantes de digestão ou o DNA extraído (plasmidial) foram analisados por eletroforese em gel de agarose em tampão TBE (Tris 89 mM; ácido bórico 89 mM; EDTA 2mM pH 8), após coloração com brometo de etídeo e visualização sob luz UV. O isolamento de fragmentos de DNA foi realizado com o kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen). As ligações de DNA foram realizadas a temperatura ambiente, com T4 DNA ligase e tampão fornecido pelo fabricante (Invitrogen).

O sequenciamento de DNA foi feito com o kit “BigDye Terminator v.3.1 Cycle Sequencing Kit” e o sequenciador automático ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer/HITACHI.

3.4) Transformação e Conjugação

As transformações de *E.coli* com plasmídeos foram realizadas por eletroporação seguida de recuperação das células em meio SOC (triptona 20g/l; extrato de levedura 5 g/l; NaCl 0.5 g/l; KCl 2.5 mM; 0,35% glicose) por 1 h e plaqueamento em LB contendo o antibiótico para seleção dos transformantes. As eletroporações foram realizadas em cubetas de 0,1 ml a 1.8 kV, 25 μ F e 200 Ω .

Para o preparo de células competentes para eletroporação, culturas de *E.coli* crescidas por 16 hs foram diluídas 100x em meio SOB (triptona 20 g/l; extrato de levedura 5 g/l; NaCl 0,5 g/l; KCl 2.5 mM; pH 7.5) e, após crescimento até fase exponencial, foram coletadas por centrifugação e lavadas duas vezes em glicose 10%. Após a última lavagem, o material

precipitado foi ressuspenso em 3 ml de glicose 10% e aliquoteado. As alíquotas foram estocadas a -80°C .

As construções de interesse foram mobilizadas para *C. crescentus* por conjugação, usando a cepa doadora *E.coli* S-17-1. As cepas receptora (linhagem de *C. crescentus*) e doadora (S17-1) portadora do plasmídeo a ser transferido, foram misturadas com o auxílio de uma alça de platina em placas de PYE e incubadas por 8-16 horas a 30°C . Após esse tempo, a seleção foi feita em placas de PYE contendo ácido nalidíxico (seleciona apenas *Caulobacter*, uma vez que a linhagem de *E.coli* S17-1 apresenta sensibilidade a ácido nalidíxico) e o antibiótico cuja marca de resistência é codificada pelo plasmídeo. Colônias isoladas são obtidas após duas seleções consecutivas dos conjugantes.

3.5) Obtenção da Cepa Mutante por Deleção em Fase no Gene *sigF* (SG16)

A deleção em fase da ORF *sigF* (CC3253) foi obtida pela amplificação por PCR de suas regiões 5' e 3', excluindo-se a região interna do gene (345 pb) e ligação dos produtos através de um sítio de *XhoI*, de forma a manter o quadro de leitura do gene. Os oligonucleotídeos "sigF-5'" e "forward M13 (-20)" foram utilizados para amplificação da região a 5' da deleção e a amplificação do segmento a 3' foi obtida pelo uso dos oligonucleotídeos "sigF-3'" e "reverse M13 (-24)". A construção pRB82 foi utilizada como molde nas reações de PCR. Os fragmentos 5' e 3' obtidos foram digeridos com *EcoRI/XhoI* e *HindIII/XhoI*, respectivamente, e ligados no vetor pUCBM21 digerido com *EcoRI/HindIII*, produzindo a construção pCM20 (tabela 7), cujo inserto foi confirmado por sequenciamento automático. O fragmento contendo a deleção foi isolado após digestão com *EcoRI/HindIII* e ligado ao vetor pNPTS138 digerido com as mesmas enzimas. A construção, denominada pCM21, foi transferida para *C. crescentus* por conjugação com *E.coli* S-17. Como o vetor pNPTS138 é incapaz de se replicar autonomamente em *C. crescentus*, os clones selecionados

(resistentes à canamicina) são fruto de um evento de recombinação homóloga no locus de *sigF*.

Após confirmação do evento de recombinação por “Southern blot” (Sambrook et al., 1989), os clones foram inoculados em PYE sem antibiótico por 3 dias consecutivos, durante os quais alíquotas foram retiradas para plaqueamento em meio contendo 3% de sacarose. Colônias isoladas obtidas destes plaqueamentos foram selecionadas em placas contendo sacarose ou contendo sacarose e canamicina. O vetor pNPTS138 possui o gene *sacB*, que codifica a enzima levansucrase, capaz de transformar a sacarose adicionada ao meio em um produto tóxico para a célula. Assim, as colônias resistentes à sacarose e sensíveis a canamicina são aquelas que sofreram um segundo evento de recombinação homóloga, perdendo as regiões plasmidiais e a cópia funcional do gene presente no cromossomo, sendo, então selecionadas. O segundo evento de recombinação também foi confirmado por “Southern-blot” (ver figura 8).

3.6) Obtenção do Mutante Condicional no Gene *sigF* (SG16C)

Inicialmente, foi obtida uma construção contendo uma fusão de tradução do gene *sigF* aos 6 primeiros códons do gene *xyiX*, no vetor pNPT228XNE, incapaz de se replicar autonomamente em *C. crescentus*. Para isso, a região que codifica *sigF* foi amplificada por PCR utilizando os oligonucleotídeos pXNE5' e lac447rev e a construção pRB82 como molde. O fragmento obtido foi digerido com *EcoRI* (sítio inserido nos oligonucleotídeos utilizados) e clonado no vetor pNPT228XNE digerido com a mesma enzima. Clones contendo esta construção foram selecionados em *E.coli* e a sequência do inserto foi confirmada por sequenciamento automático. A construção, denominada pCM22, foi então transferida para a cepa mutante SG16 por conjugação e foram selecionados os clones resistentes a canamicina e que, portanto, continham a construção inserida no locus *xyiX* do cromossomo por

recombinação homóloga. Para os testes na ausência de xilose, as culturas destas cepas foram mantidas em meio PYE contendo 0,2% de glicose. Os ensaios na presença de xilose foram realizados em meio PYE contendo 0,1% de glicose e 0,1% de xilose.

3.7) Obtenção da Cepa Mutante no Gene *sigU* (SG546)

O cassete de resistência a espectinomicina do vetor pHP45Ω foi obtido por digestão do vetor com a enzima de restrição *SmaI* e inserido em um sítio de *StuI* no gene *sigU*, na construção pRB60. O gene assim interrompido foi transferido para o vetor pNPTS138, após digestão com *ApaI*, originando a construção pCM61. Esta construção foi transferida para *C. crescentus* por conjugação e foram selecionados clones resistentes a canamicina e espectinomicina. Após a confirmação do primeiro evento de recombinação por “Southern blot”, os clones foram inoculados em PYE sem antibiótico por 3 dias consecutivos, para a ocorrência do segundo evento de recombinação, conforme descrito acima (item 3.5). Os clones que sofreram o segundo evento de recombinação foram selecionados pela resistência a sacarose e espectinomicina e sensibilidade a canamicina. O segundo evento de recombinação também foi confirmado por “Southern-blot”.

3.8) Marcação de sondas e hibridização

Para a obtenção de sondas radioativas, utilizadas em ensaios de hibridização de colônias, “Southern-blot”, RT-PCR semi-quantitativo, cerca de 25 ng dos fragmentos de DNA foram marcados por incorporação de [α - 32 P] dCTP (25 μ Ci) utilizando o kit HighPrime (Roche). As sondas foram purificadas pelo kit QIAquick Nucleotide Removal (Qiagen) ou precipitadas com 10% de acetato de sódio e 2 volumes de etanol, seguindo-se de incubação de 30 min em gelo seco. Para a contagem de incorporação do isótopo radioativo, 1 μ l da solução

foi aplicada em papel 3MM e seca ao ar. Posteriormente, a radiação presente foi medida em cintilador, pelo método Cerenkov. As sondas foram fervidas por 5 min antes de sua utilização.

Ensaio de “Southern-blot” foram realizados para a confirmação dos eventos de recombinação homóloga durante a obtenção de cepas mutantes em *C. crescentus*. Para isso, o DNA genômico dos clones selecionados foi isolado segundo descrito em Chen & Kuo (1993), digerido com enzimas de restrição específicas e o material foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,8%. Após a corrida, o gel foi tratado segundo descrito por Sambrook et al., 1989 e o DNA transferido para membrana de náilon por sistema de pressão (Stratagene). O DNA foi fixado à membrana pelo tratamento com luz UV (50 mJoules) usando-se o aparelho GS Gene Linker (Bio-Rad). A pré-hibridização e hibridização das membranas foram realizadas a 60°C em solução Rapid-Hyb (Amersham Pharmacia), conforme as especificações do fabricante.

A seleção de clones de *E. coli* contendo as construções de interesse foi realizada pela metodologia de hibridização de colônia. Para isso, as colônias obtidas após transformação foram transferidas para membranas de náilon e crescidas sobre placa contendo meio LB sólido por 5 h a 37°C. Réplicas das colônias foram também aplicadas em placas de LB sólido. Após o crescimento das colônias nas membranas, estas foram retiradas e submetidas a tratamento em solução contendo 10% SDS por 3 min, para lise das colônias. Em seguida, as membranas foram transferidas para solução de desnaturação (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) e incubadas por 5 min, sendo então transferidas para solução de neutralização por 5 min (Tris Base 0,5 M, NaCl 1,5 M, pH 7,5). Por fim, as membranas foram tratadas por 2 min em solução de SSC 2x. O DNA foi fixado à membrana por tratamento com U.V. e as membranas foram pré-hibridizadas e hibridizadas conforme descrito acima (ensaio de “Southern-blot”).

3.9) Ensaios de Atividade de β -Galactosidase

Fusões de transcrição das regiões regulatórias dos fatores ECF com o gene repórter *lacZ* (obtidas por R.L. Baldini, tabela 7) no plasmídeo placZ290 foram introduzidas por conjugação nas linhagens de interesse de *C. crescentus*. Para realizar o ensaio de atividade da enzima β -galactosidase, culturas de *C. crescentus* portadoras destas construções foram crescidas por 16 h, sendo então diluídas até $DO_{600} = 0,1$ e incubadas sob agitação a 30°C, sendo este considerado o t=0 h. Aliquotas foram retiradas nos tempos de incubação desejados e diluídas para $DO \approx 0,1$ em água MilliQ. O ensaio foi realizado de acordo com protocolo descrito em Miller (1972) com 50 μ l dessas culturas diluídas. Duplicatas de cada amostra foram realizadas a cada ponto. Os resultados foram expressos em unidades de atividade de β -galactosidase (unidades Miller), sendo normalizados pela DO_{600} das culturas pela fórmula:

$$\text{Atividade} = \frac{DO_{420}}{V \times t \times DO_{600}} \times 1000$$

Onde DO_{420} = leitura da absorbância da reação a 420 nm

DO_{600} = leitura da absorbância da cultura a 600 nm

V = volume de cultura utilizado (ml)

t = tempo de incubação com o substrato (minutos)

Para ensaios de indução dos promotores pela adição de agentes causadores de estresse, culturas estacionárias foram diluídas para $DO=0,05$ e, após 2hs, adicionava-se o agente de interesse.

3.10) Ensaios de Viabilidade e Curvas de Crescimento

As cepas NA1000 e os mutantes para fatores ECF utilizadas nos testes de viabilidade e curvas de crescimento foram inoculados a partir de placas frescas e cultivados durante 16 hs

em PYE líquido, sem antibiótico, sob agitação. Curvas de crescimentos foram realizadas para análise do fenótipo das cepas mutantes em condições fisiológicas (crescimento a 30°C em PYE), durante o estresse salino e osmótico (85 mM de NaCl e 180 mM de sacarose) e pelo tratamento com compostos aromáticos (5 mM de tolueno). Para as curvas de crescimento, as culturas foram diluídas para DO_{600nm} de 0,05 ou 0,1 e incubadas por 2 hs a 30°C, sob agitação. Após este período de incubação, estas foram divididas em frascos contendo ou não (no caso do controle, em condições normais de crescimento) o agente de estresse a ser testado. Aliquotas foram retiradas a cada duas horas ou nos tempos desejados para leitura de turbidez em espectrofotômetro, sob comprimento de onda de 600 nm. A morfologia das células foi monitorada em microscópio ótico. Em alguns pontos do crescimento, aliquotas foram diluídas sucessivamente para plaqueamento em PYE ágar.

Para os testes de viabilidade, as culturas saturadas foram diluídas para DO_{600nm} de 0,1 e incubadas a 30°C sob agitação até atingirem a fase exponencial (aproximadamente 4 h de crescimento) ou até 12 h ou 24 h de crescimento. Uma alíquota foi então retirada ($t=0h$) e o restante da cultura foi submetido ao estresse de interesse. Nos tempos indicados, aliquotas foram retiradas e, após diluições seriadas, plaqueadas em PYE ágar. Os ensaios de viabilidade a pH ácido e alcalino foram realizados segundo o protocolo descrito em Wortinger et al. (1998). No caso dos testes em pH ácido, 3 ml das culturas foram centrifugadas e ressuspensas em 3 ml de meio PYE ajustado para pH 4.0 (pela adição de HCl). As culturas foram então incubadas a 30°C, sob agitação e aliquotas foram retiradas nos tempos desejados. O tempo zero foi retirado antes da centrifugação das culturas. Os testes em pH alcalino foram realizados pela centrifugação de 30 μ l de cada cultura e posterior ressuspensão das células em 3 ml de PYE ajustado para pH 9.5 (pela adição de 6.5 ml de Na_2CO_3 0.2M e 18,5 ml de $NaHCO_3$ 0,2 M em 75 ml de PYE). As amostras foram incubadas a 30°C sob agitação e aliquotas foram retiradas nos tempos desejados. Para retirada do tempo zero, 30 μ l de cada

cultura foi centrifugado e as células ressuspensas em 3 ml de PYE. Ensaio de viabilidade também foram realizados para a análise da resposta a choque térmico extremo (48°C) e estresse oxidativo (2,5; 5 ou 15 mM de H₂O₂).

Ensaio de viabilidade durante longos períodos em cultura foram realizados pela diluição de culturas saturadas para DO_{600nm} de 0,1 em PYE. Aliquotas foram retiradas após cada dia de crescimento a 30°C e diluições sucessivas foram plaqueadas em PYE ágar.

3.11) Extração de RNA de *Caulobacter crescentus*

Duas metodologias foram utilizadas para a obtenção de RNA total de *C. crescentus*, conforme descrito abaixo:

3.11.1) Extração pelo Método de Fenol Quente

Culturas em fase exponencial, submetidas ou não a choque térmico ou estresse salino, e culturas em fase estacionária foram utilizadas para a extração de RNA total para ensaios de RT-PCR e extensão de oligonucleotídeo. Para as amostras de fase exponencial foram utilizadas culturas com DO_{600nm} de 0,6, enquanto amostras de fase estacionária foram coletadas após crescimento por 12 h e 24 h a 30°C. O choque térmico foi realizado a 48°C por 15 minutos e o estresse salino foi realizado por incubação com 85 mM de NaCl durante 1 h, a 30°C.

As amostras assim obtidas foram centrifugadas a 7800x g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células lisadas imediatamente em 1 ml de solução contendo acetato de sódio 20 mM, EDTA 1 mM e SDS 0,4 %. Em seguida, adicionou-se 1 ml de fenol equilibrado em 20 mM de tampão acetato de sódio (pH 5.4) e 1 mM de EDTA e pré-aquecido a 65°C. O material foi homogeneizado com forte agitação, e incubado à 65°C por 15 minutos. A fase aquosa foi separada por centrifugação a 7800x g. Após três extrações consecutivas com fenol, a fase aquosa foi coletada e tratada com o mesmo volume de clorofórmio, sendo

então submetida à precipitação pela adição de 0,1 volume de acetato de sódio 3 M (pH 5,4) e 2 volumes de etanol 100%. Após incubação por 15 minutos em gelo seco ou a -20°C durante 16 h, os tubos foram centrifugados a $12.000\times g$ por 15 minutos (4°C), o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em etanol 70%, seco e armazenado a -80°C . O rendimento foi de cerca de 100 μg de RNA para cada 12 ml de cultura. A água MilliQ utilizada e as soluções para lise e precipitação do RNA foram tratadas com 0,01% de dietilpirocarbonato (DEPC) por 16 hs, sendo posteriormente autoclavadas.

3.11.2) Extração com Trizol

Os RNAs utilizados em ensaios de “microarray” e alguns ensaios de RT-PCR e extensão de oligonucleotídeos foram extraídos pelo tratamento com Trizol, conforme as instruções do fabricante (Invitrogen). As amostras de fase exponencial e estacionária foram obtidas a partir de culturas crescidas nas mesmas condições descritas no item 3.11.1.

As amostras assim obtidas foram centrifugadas por 45 segundos a $16.000 g$ a temperatura ambiente, em microcentrífuga. O sobrenadante foi descartado e as células lisadas imediatamente ou congeladas em gelo seco e estocadas a -80°C . Os precipitados foram ressuspensos em 1 ml de Trizol para cada 10 ml de cultura inicial, e incubados por 10 min a 65°C . Em seguida, adicionou-se 0,2 ml de clorofórmio para cada 1 ml de Trizol e a mistura foi incubada por 5 min a temperatura ambiente. O material foi centrifugado a $4.000\times g$, por 15 min a 4°C e a fase aquosa contendo o RNA foi coletada. O RNA foi então precipitado pela adição de 0,5 ml de isopropanol / ml de Trizol usado inicialmente e incubação a -80°C durante 16 h. As amostras foram então centrifugadas a $12000\times g$ por 30 minutos (4°C), o sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado em etanol 70%, seco e armazenado a -70°C . O rendimento foi de cerca de 100 μg de RNA para cada 5 ml de cultura.

Para utilização dos RNAs extraídos pelos métodos descritos acima, estes foram ressuspensos em água tratada com DEPC 0,01 % e incubados a 55°C por 10 min, para facilitar a solubilização. A concentração dos RNAs foi estimada por medida da absorbância a 260 nm e sua integridade foi analisada por eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão contendo MOPS 20 mM (pH 7.0), acetato de sódio 5 mM, EDTA 0,1 mM e 3,5 % de formaldeído. Antes de serem aplicadas no gel, as amostras de RNA foram diluídas em 3 volumes de tampão contendo MOPS 20 mM (pH 7.0), acetato de sódio 5 mM, EDTA 0,1 mM, formamida 50%, formaldeído 3.5%, brometo de etídeo 1 mg/ml e azul de bromofenol e a mistura foi incubada a 65°C por 5 min.

3.12) Ensaios de Extensão de Oligonucleotídeo com Transcriptase Reversa

Para a determinação do início de transcrição dos genes *sigF* e *sigU* foram realizados ensaios de extensão de oligonucleotídeos. PESigE2 e PESigU (tabela 8), oligonucleotídeos complementares às regiões 5' dos genes *sigF* e *sigU*, respectivamente, foram utilizados nestes experimentos. Aproximadamente, 50 pmoles de cada oligonucleotídeo foi marcado na extremidade 5' com [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (30 μCi), utilizando-se 5 U de T4 polinucleotídeo quinase (New England Biolabs). Os oligonucleotídeos marcados foram co-precipitados com RNA total de *C. crescentus* isolado de células nas condições de interesse, conforme descrito no item 3.11. As co-precipitações foram realizadas pela adição de 45 μl de acetato de sódio 3 M (pH 5.2) e 200 μl de etanol absoluto e incubação por 30 min em gelo seco, utilizando-se cerca de 4×10^6 cpm de oligonucleotídeo marcado e 50 μg de RNA, em volume final de 345 μl . Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos (4°C) e submetidas à secagem a vácuo. Os precipitados foram solubilizados em 25 μl de tampão de hibridização, contendo piperazine-N,N'-bis (2-ethanesulphonic acid) (PIPES) 100 mM (pH 7.0), NaCl 1 M e EDTA 5 mM, fervidos por 10 minutos e incubados a 55°C (*sigF*) ou 47°C (*sigU*) por 16

horas. Em seguida, o material foi precipitado pela adição de 3 volumes de etanol e incubação por 30 min em gelo seco. Após centrifugação a 12.000x g por 20 min (4°C) e lavagem com etanol 70%, a transcrição reversa foi realizada por incubação de 90 min a 42°C, na presença de 200 U de Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), DTT 1 mM, 10 U RNasin (Invitrogen), 1 mM de cada dNTP e tampão da enzima. A seguir, o RNA foi eliminado pela adição de 30 µg de RNase A e incubação a 37°C por 30 minutos. O material foi purificado por extração com fenol:clorofórmio (1:1) e, em seguida, precipitado com 3 volumes de etanol absoluto em gelo seco por 30 minutos. Após centrifugação a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C, lavagem com etanol 70% e secagem a vácuo, os precipitados foram solubilizados em 2 µl de água e 4 µl de tampão de amostra (formamida 95%; EDTA 20 mM; azul de bromofenol 0,05%; xileno cianol 0.05%). As amostras foram então aquecidas a 94°C por 3 minutos e aplicadas em gel de 7.5% de poliacrilamida-7 M uréia.

Para a determinação do tamanho do produto obtido na extensão e, conseqüentemente, do início de transcrição de cada um dos genes, os produtos do sequenciamento do fago M13 foram aplicados ao lado de cada uma das reações. A reação de sequenciamento do fago foi obtida por PCR usando o oligonucleotídeo -40 e DNA simples fita do fago, conforme protocolo do kit utilizado ("finol DNA cycle sequencing system"-Promega). No caso do gene *sig U*, foi também realizada reação de sequenciamento usando o oligonucleotídeo PEsigU e a construção pRB60 como molde (tabela 7).

3.13) RT-PCR Semi-Quantitativos

Para os ensaios de RT-PCR, 5 µg de RNA foram tratados com 5 U de DNase I Amplification Grade (Invitrogen) e 5 U de inibidor de RNase (Invitrogen) por 15 min a temperatura ambiente. A DNase foi então inativada por incubação a 65°C por 15 min. Este tratamento eliminou possíveis contaminações das amostras com DNA. A ausência de

contaminação com DNA foi confirmada por PCR das amostras de RNA tratadas (ausência de produto de amplificação). Os RNAs foram então igualados novamente em gel de agarose 1,5% contendo MOPS e formaldeído (descrito no item 3.11.2). Os ensaios de RT-PCR foram realizados utilizando o kit “AccessQuick RT-PCR System” e 100 a 500 ng de RNA, conforme indicado em cada um dos ensaios descritos. Um dos ensaios descritos foi realizado em duas etapas (conforme indicado na legenda da figura), a 1ª consistindo na síntese do cDNA com uso da transcriptase reversa Superscript II, conforme instruções do fabricante (Invitrogen). Em seguida, 10% das reações de transcrição reversa foram utilizados para a amplificação do gene de interesse.

Com o objetivo de analisar a expressão dos genes de forma semi-quantitativa, o número de ciclos a ser utilizado foi padronizado para cada um dos genes analisados, evitando a saturação da reação de PCR. Para isso, ensaios de padronização foram realizados com 300 ng de RNA e variando-se apenas o número de ciclos de amplificação. Os ensaios comparativos foram então realizados com quantidades crescentes de RNA e um número fixo de ciclos, que variou de 18-25, de acordo com o gene em questão.

Os produtos de amplificação foram analisados em gel de agarose 1,5% e, após coloração com brometo de etídio e visualização sob luz U.V., foram tratados e transferidos para membranas de náilon, conforme descrito no item 3.8. As membranas foram pré-hibridizadas e hibridizadas por 4-16 h a 60°C com sondas específicas para cada um dos genes, obtidas conforme descrito no item 3.8. Em alguns experimentos, os produtos obtidos foram analisados diretamente após a coloração com brometo de etídio, sem a realização das etapas de transferência e hibridização (conforme indicado).

3.14) Obtenção de Anticorpos Policlonais: anti-SigF e anti-SigU

3.14.1) Expressão e Purificação das Proteínas Recombinantes SigF e SigU em *E.coli*

Inicialmente, foram obtidas 2 construções contendo fusões de tradução dos genes *sigU* e *sigF* no vetor pPROEX-Hta (Invitrogen) (tabela 7). Este vetor contém um promotor indutível por IPTG e produz uma fusão da proteína de interesse a 6 resíduos de histidina. Os tamanhos esperados para as proteínas recombinantes SigF e SigU são de aproximadamente 20 kDa e 22 kDa, respectivamente.

Após a obtenção das construções de Sig F e Sig U, a expressão das proteínas de fusão em resposta à adição de IPTG foi analisada através de experimentos-piloto. Para isso, culturas saturadas dos clones de *E.coli* contendo as construções de interesse foram diluídas 100 vezes em 10 ml de LB contendo ampicilina e mantidas a 37°C sob agitação até atingirem DO_{600nm} de 0,6. Foi então retirada uma alíquota de 1 ml e adicionou-se 1mM de IPTG ao restante das culturas. Após a adição de IPTG, as culturas foram mantidas por 3 hs a 37°C sob agitação e foram retiradas alíquotas em intervalos de 1 h. As alíquotas foram centrifugadas a 12000x g por 5 min e as células foram ressuspensas em solução O (Tris-HCl 62,5 mM- pH6,8; SDS 2,3%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0.01%). As amostras assim obtidas foram analisadas por SDS-PAGE (Laemmli, 1970).

Para a produção em larga escala da proteína recombinante foi utilizada a metodologia descrita em Chataway & Barrit (1995). Culturas saturadas foram diluídas 100x em 50ml de LB contendo ampicilina e incubadas a 37°C até a fase exponencial e então induzidas por 3 hs com 0,6 mM de IPTG. O material foi centrifugado e ressuspensão em 2 ml de tampão de lise (Tris-HCl 10 mM pH 7,5; NaCl 100 mM, imidazol 10 mM; PMSF 0,5 mM), e as bactérias lisadas por sonicação, no aparelho Branson Sonifier 450, potência 3, com pulsos de 10-15 segundos. O lisado foi centrifugado, separando-se a fração solúvel (sobrenadante) da

insolúvel. Amostras de cada fração foram analisadas por SDS-PAGE e verificou-se que ambas as proteínas recombinantes encontravam-se na fração insolúvel, em corpos de inclusão.

A purificação a partir dos corpos de inclusão foi realizada segundo descrito em Marshak et al. (1996). O precipitado obtido após a lise das bactérias foi dissolvido em 2 ml de tampão A (Tris-HCl 50 mM pH8; EDTA 0,5 mM; NaCl 50 mM; glicerol 5%) contendo 2% de DOC (deoxicolato) e incubado a temperatura ambiente por 10 min. A suspensão foi centrifugada a 12.000x g por 15 min a 4°C e o precipitado foi lavado mais 3 vezes com tampão A contendo 2% de DOC. Aliquotas de 50 µl da suspensão foram separadas em 7 tubos, sendo centrifugadas por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi dissolvido em 50 µl de tampão A contendo diferentes concentrações de sódio N-lauril sarcosil (0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 %). As suspensões foram incubadas por 10 min a temperatura ambiente e centrifugadas por 1 minuto. O sobrenadante foi coletado e em seguida misturado a igual volume de solução O. As amostras foram analisadas por SDS-PAGE. Com isso, foi possível determinar a melhor concentração de sarcosil para solubilização das proteínas. A solubilização de His-SigF foi obtida após adição de 0,3% de sarcosil e a proteína His-SigU foi solubilizada pelo tratamento com 0,6% de sarcosil.

Após a solubilização das amostras com tampão A contendo sarcosil, o material foi centrifugado e os sobrenadantes foram coletados e diluídos 10 vezes em tampão A, sendo então dialisados contra 10 volumes de tampão A a 4°C. Ao final da purificação, as amostras foram concentradas até cerca de 5 ml em Centriprep 10 (Amicon). A diluição e diálise das amostras foram realizadas para a retirada gradual do sarcosil, permitindo a renaturação das proteínas.

3.14.2) Imunização dos Coelhos, Extração e Teste dos Anti-Soros

Aproximadamente 500 µg de cada proteína recombinante foram injetados subcutaneamente no dorso de coelhas fêmeas de aproximadamente 3 meses de idade. Antes da primeira injeção, foram retirados 3 ml de sangue da veia marginal da orelha dos coelhos, para obtenção dos soros pré-ímmes.

Foram realizadas 3 injeções, com intervalos de 1 mês entre cada uma delas. A primeira injeção foi realizada pela mistura de 0,5 ml da proteína recombinante (500 µg) a igual volume de adjuvante de Freund completo (Sigma Aldrich). As demais injeções foram realizadas utilizando adjuvante incompleto (Sigma Aldrich). Aproximadamente 15 dias após a 2ª e 3ª injeções, foram retirados 3 ml de sangue da orelha dos animais para obtenção dos soros ímmes. Os soros ímmes e pré-ímmes foram obtidos pela incubação do sangue coletado a 37°C por 30 minutos e, em seguida, no gelo por 30 minutos. O material foi então centrifugado a 3.000x g por 15 min a 4°C, para a separação do coágulo. Os soros foram recolhidos, aliqnotados e estocados a -20°C.

Os soros foram testados em experimentos de "Western-blot" nas diluições 1:100; 1:500 e 1:1000 com extratos das cepas de *E.coli* contendo os vetores de expressão após 3 h de indução com IPTG e com extratos de *C.crescentus*. Foram utilizados extratos da cepa parental NA1000 e das cepas que super-expressam *sigF* e *sigU* para os testes dos respectivos soros. Em todos os testes o soro pré-ímmes foi utilizado na menor diluição, como controle. Após os testes com o soro obtido depois da 3ª injeção, foi realizada punção cardíaca nos animais e retirada de 30 ml de sangue, para a obtenção de maior quantidade de soro.

3.14.3) Purificação do Soro anti-SigU

O soro anti-SigU mostrou-se bastante inespecífico nos testes iniciais realizados, dando origem a muitas bandas espúrias. Devido a este fato, o soro foi purificado pela incubação com extratos protéicos da cepa mutante em *sigU*, imobilizados em membranas de nitrocelulose. Inicialmente, 20 ml de uma cultura da cepa SG546 (*sigU*⁻) em D.O._{600nm} de 1,0 foram centrifugados a 7.800 x g por 10 min (4°C). As células foram ressuspensas em 2 ml de TBS (Tris-HCl 10 mM pH 8; NaCl 150 mM) e lisadas por sonicação com 10 pulsos de 10 segundos (Branson Sonifier 450, potência 3). O volume foi completado para 15 ml com TBS-T (Tris-HCl 10mM pH 8; NaCl 150 mM; Tween 20 0,05%) e a suspensão novamente centrifugada e o sobrenadante reservado. Quatro filtros de nitrocelulose de 10 x 5 cm foram incubados dois a dois, sob agitação suave, com 7.5 ml do sobrenadante do lisado por 30 minutos a temperatura ambiente. Após a incubação, os filtros foram secos por incubação de 30 min a temperatura ambiente e, em seguida, lavados por 3 vezes por 10 minutos com TBS-T. Os filtros foram então incubados com TBS-leite 5% por 20 min e lavados 3 vezes por 10 min em TBS-T, sendo então secos sobre papel de filtro. Um dos filtros foi incubado durante a noite a 4°C com 5 ml de soro anti-SigU diluído 1:5 em TBS-T. O soro foi então incubado sequencialmente por 30 min com os outros filtros a temperatura ambiente, sob agitação suave. O soro assim purificado foi aliquoteado e estocado a -20°C.

3.15) Obtenção de Extratos Totais de Proteína de *C. crescentus* e “Western-Blots”

Alíquotas de 1 ml foram retiradas de culturas de *C. crescentus* nos tempos determinados após exposição ao estresse em questão ou em tempos ao longo do crescimento e foram centrifugadas por 5 min a 12.000x g. Os sobrenadantes foram descartados e as células foram ressuspensas em solução O (Tris-HCl 62,5 mM- pH6,8; SDS 2,3%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,01%). As alíquotas foram fervidas por 5 min e centrifugadas

novamente por 3 min a 12.000x g. As amostras assim obtidas foram estocadas a -20°C para sua posterior utilização. Antes da sua utilização em ensaios de "Western blot", a quantidade de proteína dos extratos nas condições a serem comparadas foram igualadas após separação das proteínas por SDS-PAGE e coloração dos géis com azul de Coomassie (Laemmli, 1970).

Para os ensaios de "Western-blot", as proteínas de extratos totais obtidos conforme descrito acima foram separadas eletroforéticamente por SDS-PAGE 12% e transferidas para filtro de nitrocelulose. A transferência foi realizada utilizando o sistema Novablot (GE Healthcare). Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S 0,1% diluído em ácido acético 10%, para visualização das proteínas. Após descoloração com água destilada, o filtro foi bloqueado por aproximadamente 30 minutos em TBS (Tris-HCl 10 mM pH 8; NaCl 150 mM) contendo 5% de leite desnatado. Em seguida, a membrana foi incubada com solução TBS contendo 0.03% Triton X-100 e 0.02% de Tween-20 e os anticorpos adicionados nas concentrações adequadas. Os soros anti-SigF e anti-SigU foram utilizados nas diluições de 1:1000 e 1:100, respectivamente. A membrana foi incubada por 16 h a 4°C, sob agitação suave. Após incubação com anticorpo primário, a membrana foi lavada 4 vezes por 5 minutos em TBS-T (TBS acrescido de 0.05% de Tween 20) e uma vez em TBS por 10 minutos, procedendo-se então à incubação com o anticorpo secundário, conjugado com fosfatase alcalina ou peroxidase. Após 1 hora de incubação, as membranas foram lavadas por 4 vezes com TBS-T e 1 vez com TBS, conforme descrito acima.

Para a revelação com a fosfatase alcalina, foram utilizados BCIP (5-bromo-4-cloro-6-indolil fosfato; 0.3 mg/ml) e NBT (nitroblue tetrazolium; 0,15 mg/ml) em tampão Tris-HCl 10 mM (pH 9,0) contendo NaCl 100 mM e MgCl₂ 5 mM. A revelação para o anticorpo conjugado com peroxidase foi realizada por quimioluminescência, utilizando-se o kit ECL (GE Healthcare), de acordo com as instruções do fabricante.

3.16) “Microarrays”

RNAs de culturas crescidas por 12 h e 24 h em PYE foram obtidos pelo método de Trizol (descrito no item 3.11.2), quantificados em espectrofotômetro e sua integridade foi analisada em géis de agarose 1,5% em tampão MOPS. Os RNAs de 4 réplicas biológicas distintas foram então enviados em gelo seco para o Laboratório da Dr^a Lucy Shapiro, na Universidade de Stanford, CA, EUA.

Os procedimentos para construção das lâminas, desenho dos oligonucleotídeos (50-mer), marcação dos RNAs, hibridização, captura e processamento das imagens foram realizados por Ann Reinsenauer e Maliwan Meewan (Lab. Dr^a Lucy Shapiro), conforme descrito no endereço eletrônico: www.stanford.edu/group/caulobacter/oligoArrays/.

Os dados foram normalizados pelo método LOWESS a partir do gráfico M x A, no qual $M = \log_2 (SG16/NA1000)$ e $A = \log_2 (cy3 \cdot cy5)/2$, conforme descrito em Koide e colaboradores, (2004) (material suplementar, no endereço eletrônico <http://verjo19.iq.usp.br/xylella/microarray>). Os valores indicados por “cy3” e “cy5” se referem à intensidade de cada fluoróforo para cada um dos “spots” e foram calculados pela fórmula: [média(sinal)-mediana(“background”)]. Foram descartados “spots” que apresentaram média do sinal menor que o quantil 90% do “background”. “Spots” considerados de baixa qualidade de acordo com os parâmetros do programa GenePix Pro 4.0 (contendo “flags”), utilizado para aquisição das imagens, foram descartados. Para identificar os genes significativamente diferencialmente expressos assumiu-se uma variável Normal para os resultados de todos os “spots” referentes a um gene, e foi calculada a probabilidade deste apresentar valor maior (ou mais negativo) que o valor do corte estabelecido. O valor de corte determinado foi de diferenças de expressão maiores que $1.5 \times (\log_2 SG16/NA1000 > 0,58$ ou $\log_2 SG16/NA1000 < -0,58$). A estimativa da Normal foi feita de modo robusto (mediana e

“MAD – median absolute deviation”, ao invés de média e desvio padrão). Foram considerados significativos valores de probabilidade maiores que 85%.

4) RESULTADOS

4.1) Estudo do Papel dos Genes *sigL*, *M* e *N* na Resposta a Estresses em *C. crescentus*

Com o objetivo de identificar a função dos genes *sigL*, *sigM* e *sigN* em *C. crescentus*, o fenótipo das cepas mutantes nestes genes foi analisado, durante o crescimento normal e após alguns tipos de estresses ambientais. Estas cepas foram construídas pela inserção de um cassete de resistência a espectinomicina no interior das regiões codificadoras dos genes (R.L. Baldini, dados não publicados). As cepas mutantes, denominadas SG678 (*sigL*-), SG1409-2 (*sigM*-) e SG1409-1 (*sigN*-), apresentaram crescimento similar à cepa parental NA1000 em condições fisiológicas normais, determinado através das variações na turbidez das culturas ao longo do tempo de cultivo a 30°C (medida da absorbância a 600nm). Da mesma forma, estas linhagens não apresentaram diferenças de morfologia, motilidade ou capacidade de formação de colônias. Além disto, estes mutantes foram testados quanto a sua viabilidade na fase exponencial de crescimento e durante longos períodos em cultura (10 dias), com o objetivo de verificar se estes genes estão envolvidos na resposta à fase estacionária e nas adaptações morfológicas que ocorrem em *C. crescentus* após vários dias de crescimento (Wortinger et al., 1998). Nenhuma diferença foi observada.

Um possível papel destes fatores sigma na resposta a estresses durante a fase estacionária também foi investigado, utilizando-se ensaios de viabilidade celular na presença de altas concentrações de H₂O₂ (15 mM), uma vez que *C. crescentus* é altamente resistente a este tratamento nesta fase do crescimento (Wortinger et al., 1998). Nenhum destes ensaios demonstrou diferenças fenotípicas das cepas mutantes quando comparadas à cepa parental. Ensaio de viabilidade após incubação com H₂O₂ (5 mM) e a pH ácido (pH 4.0) e alcalino (pH 9.5) durante a fase exponencial de crescimento também foram realizados e não foram observadas diferenças em comparação à cepa parental NA1000. Os fenótipos das cepas em

resposta a estresse salino e osmótico (85 mM de NaCl e 180 mM de sacarose, respectivamente) e a compostos aromáticos (5 mM de tolueno) foram analisados em curvas de crescimento e, novamente, os mutantes apresentaram o mesmo perfil que a linhagem NA1000.

Ensaio de viabilidade após choque térmico extremo (48°C) durante a fase exponencial demonstraram porém, maior sensibilidade das cepas mutantes nos genes *sigL* (SG678) e *sigM* (SG1409-2) a este tratamento, indicando um possível papel destes genes na resposta a este estresse (figura 5). A cepa mutante em *sigN* não apresentou diferenças significativas de viabilidade, quando comparada à cepa NA1000.

Figura 5: As cepas mutantes em *sigL* e *sigM* são mais sensíveis a choque térmico extremo durante a fase exponencial de crescimento. Gráfico representando ensaios de viabilidade a choque térmico extremo (48°C). Os resultados representam média de 6 experimentos independentes. As barras verticais representam o desvio padrão.

A expressão dos genes *sigL*, *sigN* e *sigM* também foi analisada, utilizando-se fusões de transcrição de suas potenciais regiões promotoras (regiões de aproximadamente 400 pb a 5' do códon de início da tradução) ao gene repórter *lacZ*, no vetor *placZ290* (obtidas por R.L.

Baldini, tabela 7). A fusão ao gene *lacZ* permite que a atividade do promotor de interesse seja inferida indiretamente pela medida da atividade da enzima β -galactosidase, facilmente determinada por ensaios colorimétricos (Miller, 1972). Assim, a atividade destes potenciais promotores foi analisada na cepa parental, em condições fisiológicas de crescimento (30°C) e durante o crescimento em condições de estresse salino (NaCl 85 mM). A atividade destes promotores mostrou-se bastante reduzida na fase exponencial de crescimento, atingindo níveis similares ao controle negativo (gene *lacZ* sem promotor). Da mesma forma, estes promotores não sofreram indução após a entrada na fase estacionária ou por estresse salino (dados não mostrados). Não foi possível realizar ensaios de atividade de β -galactosidase após choque térmico extremo, devido à instabilidade da enzima a esta temperatura. Estes dados sugerem que estes três fatores ECF apresentam um baixo nível de expressão em condições normais de crescimento, sendo, provavelmente, induzidos apenas em condições muito específicas, ainda não determinadas. É preciso notar porém, que no caso do gene *sigN*, a região clonada no vetor *placZ290* pode não representar o seu promotor, uma vez que este gene pode estar em operon com as ORFs CC1644 e CC1645 (figura 4), que codificam proteínas hipotéticas, sem homólogos no banco de dados.

Uma vez que os ensaios de viabilidade indicaram um papel de *sigL* durante o choque térmico extremo em *C. crescentus*, a expressão deste gene em resposta a este tratamento foi analisada em ensaios de RT-PCR semi-quantitativo. Conforme pode ser visto na figura 6, a transcrição do gene *sigL* é induzida pelo tratamento a 48°C durante a fase exponencial de crescimento. A quantificação dos produtos obtidos após a amplificação por densitometria utilizando o programa ImageQuant mostrou um aumento de 2,8 vezes na expressão do gene após o choque térmico. Estes dados confirmam seu papel na resposta a choque térmico extremo. A expressão do gene *sigM* não foi analisada.

(número de unidades formadoras de colônia, quando as culturas foram plaqueadas em meio sólido).

A cepa SG447 foi testada também quanto à sensibilidade a vários estresses durante a fase exponencial de crescimento. Não foram verificadas diferenças na resposta a estresse ácido e alcalino (pH 4.0 e 9.5, respectivamente), choque térmico (48°C), estresse salino ou osmótico (85 mM de NaCl ou 180 mM de sacarose), estresse oxidativo (2,5 mM) ou a presença de compostos aromáticos (5 mM de tolueno) em comparação à cepa parental.

Os resultados obtidos pela análise da curva de crescimento da cepa SG447 (figura 7A) sugerem que SigF seja importante durante o crescimento normal e na fase estacionária em *C. crescentus*. Assim, o comportamento desta cepa durante o crescimento em cultura por 10 dias foi analisado, observando-se as variações em sua viabilidade, morfologia, motilidade e no aspecto das colônias formadas. Com isso, pretendia-se verificar se SigF está envolvido na regulação das alterações morfológicas e fisiológicas que ocorrem em culturas de *C. crescentus* durante a fase estacionária tardia (Wortinger et al., 1998). Os resultados obtidos demonstram que a cepa SG447 é muito mais sensível à fase estacionária, sofrendo uma queda drástica de viabilidade nos dias 3 e 4 de crescimento, enquanto a queda de viabilidade da cepa NA1000 é bem menos acentuada e ocorre de forma gradual até o 6º dia de crescimento (figura 7B). Após este período, a cepa SG447 recupera sua viabilidade atingindo níveis similares aos da linhagem NA1000 a partir do 6º dia. O crescimento observado neste período deve ser decorrente da capacidade das células vivas em utilizar os nutrientes liberados pelas células mortas. Durante todo o período de crescimento a cepa SG447 apresenta morfologia similar a NA1000, tornando-se mais alongada e helicoidal a partir do 9º dia de crescimento (não mostrado).

Figura 7: A cepa mutante em *sigF* apresenta crescimento reduzido em condições fisiológicas e é mais sensível durante a fase estacionária em *C. crescentus*. **A)** Gráfico representando as curvas de crescimento da cepa parental (NA1000) e mutante em *sigF* (SG447) em meio complexo a 30°C. Nos tempos indicados, alíquotas foram retiradas para a análise das variações na turbidez do meio (DO_{600nm}). O gráfico representa média de no mínimo 3 experimentos independentes. **B)** Gráfico representando ensaios de viabilidade da cepa parental e do mutante SG447 durante 10 dias de crescimento. Os experimentos foram realizados em meio complexo (PYE) a 30°C. Os resultados representam média de 5 experimentos independentes.

Com o objetivo de confirmar se o fenótipo observado na cepa SG447 é decorrente apenas da ausência de *sigF*, foram realizados ensaios de complementação. Para isso, utilizou-se a construção pRB84 (R.L. Baldini, dados não publicados), que contém as regiões promotora e codificadora do gene *sigF* inseridas no vetor pMR20, capaz de replicar em *C. crescentus* com baixo número de cópias. Esta construção foi transferida para a cepa mutante SG447 e foram realizados ensaios de viabilidade durante 10 dias de crescimento, comparando-se com a cepa mutante contendo o vetor sem inserto. Porém, a expressão de *sigF* a partir da construção pRB84 não foi suficiente para complementar o fenótipo da cepa SG447 (não mostrado).

A dificuldade na complementação da cepa SG447 sugeria que o fenótipo observado fosse decorrente de efeitos polares da inserção do cassete de resistência a espectinomicina sobre o gene localizado a 3' de *sigF*, denominado CC3252 (figura 4). Estes dois genes estão organizados em um provável operon, uma vez que o início de tradução do gene CC3252 está sobreposto ao códon de término de *sigF*. Além disto, esta organização estrutural é conservada nos genes homólogos a *sigF* e CC3252 em outras bactérias, como *B. melitensis* e *S. meliloti*.

Com isso, tornou-se necessária a obtenção de uma cepa mutante por deleção em *sigF*, evitando, assim, efeitos de polaridade sobre o gene CC3252. Esta cepa foi obtida pela deleção interna de *sigF*, mantendo-se apenas as extremidades 5' e 3' de sua região codificadora, que foram unidas de forma a não alterar a sua fase de leitura (deleção em fase). A deleção em fase de *sigF* foi construída a partir de amplificação por PCR das regiões a 5' e 3' do segmento a ser deletado, seguindo-se a ligação dos fragmentos obtidos no vetor pUCBM21 (figura 8). Para a amplificação das regiões 5' (736 pb, incluindo 39 pb de região codificadora) e 3' (278 pb, contendo 123 pb de região codificadora) de *sigF*, a construção pRB82 foi utilizada como molde. A ligação entre os fragmentos foi obtida por um sítio de *XhoI*, presente nos oligonucleotídeos utilizados para amplificação dos fragmentos de modo a não alterar a fase de

leitura da proteína. A construção assim obtida, denominada pCM20, representa a deleção de 345 pb da região interna do gene (115 aminoácidos), mantendo apenas 39 pb da região 5' e 123 pb da região 3' codificadora de *sigF* (figura 8).

Figura 8: Esquema representando a construção obtida contendo a deleção em fase do gene *sigF*. Os retângulos em branco e cinza representam a região codificadora de *sigF* e os segmentos que a flanqueiam, respectivamente. As setas horizontais na região superior do esquema indicam a posição dos oligonucleotídeos utilizados para a amplificação. Os oligonucleotídeos “forward” e “reverse” reconhecem a sequência do vetor na construção pRB82.

O fragmento apresentando a deleção assim obtido foi então transferido para o vetor pNPTS138, incapaz de se replicar em *Caulobacter*. Assim, a manutenção do vetor torna-se possível somente através da recombinação homóloga no locus de *sigF* no cromossomo. Os clones que sofreram a recombinação, contendo a cópia interrompida do gene e o plasmídeo pNPTS138 integrados no cromossomo, foram selecionados pela resistência a canamicina, conferida pelo vetor e a recombinação foi confirmada por "Southern blot" (Figuras 9 e 10A). Dos 15 clones analisados, 2 sofreram recombinação a 3' da deleção e os demais sofreram recombinação a 5' da mesma. Estes clones contêm duas cópias de *sigF*, separadas pelas

regiões plasmidiais: a cópia funcional, presente originalmente no cromossomo e a cópia contendo a deleção interna no gene (figura 9). Assim, torna-se necessário a ocorrência de um segundo evento de recombinação, no qual a cópia funcional será eliminada, juntamente com o vetor pNPTS138. Escolheu-se um dos clones que sofreu a recombinação na região a 3' da deleção para a seleção da segunda recombinação (figura 10A).

Após o crescimento em meio líquido, recombinantes que perderam as regiões plasmidiais, foram selecionados através da sensibilidade à canamicina e resistência à presença de sacarose no meio, uma vez que o vetor pNPTS138 possui o gene *sacB*, que confere sensibilidade ao crescimento na presença de sacarose. Desta forma, 11 mutantes foram obtidos dentre as 13 colônias selecionadas e 1 deles foi escolhido para análises posteriores, sendo denominado SG16 (figura 10B).

A cepa mutante por deleção SG16 foi então caracterizada quanto à sua viabilidade e crescimento durante períodos prolongados em cultura, comparando-se com a cepa NA1000 e o mutante de inserção, SG447. Conforme pode ser visto na figura 11, a queda de viabilidade observada no mutante SG447 não ocorre no mutante de deleção SG16, que apresentou o mesmo perfil observado para a cepa parental NA1000. Além disto, esta cepa não demonstrou menor taxa de crescimento em relação à cepa parental, atingindo a fase estacionária em DO_{600nm} similar à NA1000. Este resultado sugere, mais uma vez, que o fenótipo observado na cepa SG447 seja decorrente de efeitos polares sobre o gene CC3252.

A)

Figura 9: Esquema dos eventos de recombinação que ocorreram na cepa parental NA1000 pela inserção da construção contendo a deleção do gene *sigF* no vetor pNPTS138. **(A)** As duas possibilidades de ocorrência da primeira recombinação: a 5' (1) ou 3' (2) da deleção e o tamanho esperado dos produtos da digestão dupla *Bam*HI / *Sma*I em cada caso. Estas enzimas foram utilizadas para confirmação dos eventos de recombinação por "Southern-blot" (figura 10). As linhas pontilhadas de cor laranja indicam a região complementar ao fragmento utilizado como sonda nos experimentos de "Southern-blot" demonstrados na figura 10. **(B)** Resultado esperado após o segundo evento de recombinação. Os retângulos em vermelho e azul indicam as cópias selvagem e mutante do gene *sigF*, respectivamente.

Figura 10: Análise por “Southern blot” do DNA de colônias selecionadas para confirmação do 1º (A) e 2º (B) eventos de recombinação durante a construção da cepa mutante em *sigF*. O DNA foi digerido com *Bam*HI e *Sma*II em ambos os experimentos. As figuras mostram as autorradiografias dos experimentos de “Southern blot”. As setas em (A) e (B) indicam os clones selecionados. Em (B), este clone representa a cepa mutante utilizada nos experimentos descritos a seguir, denominada SG16.

Figura 11: A cepa mutante por deleção SG16 não apresenta o mesmo fenótipo da cepa SG447 durante o crescimento por períodos prolongados. O gráfico representa ensaios de viabilidade durante 10 dias de crescimento (média de no mínimo 3 experimentos independentes). As curvas referentes às cepas NA1000 e SG447 são semelhantes às apresentadas na figura 7. As barras verticais representam o desvio padrão.

As duas cepas mutantes em *sigF* foram também caracterizadas quanto à sensibilidade a estresses durante a fase estacionária de crescimento. A resposta à fase estacionária induz a resistência a uma série de estresses ambientais em bactérias, inclusive em *C. crescentus* (Wortinger et al., 1998). Em *E. coli*, esta resposta é mediada principalmente pelo fator σ^S , que não possui homólogo em *C. crescentus* (Nierman et al., 2001). Assim, torna-se importante investigar um possível papel dos fatores sigma da subfamília ECF na regulação desta resposta. Ensaio de viabilidade a estresse oxidativo, choque térmico e estresse ácido foram então realizados com culturas das cepas NA1000, SG447 e SG16 após 24 h de crescimento a 30°C.

Wortinger e colaboradores (1998) demonstraram que culturas da cepa NA1000 cultivadas por 24 h tornam-se mais resistentes ao choque térmico, estresse ácido e alcalino e estresse oxidativo, quando comparadas a culturas de fase exponencial. Portanto, ensaios de viabilidade a choque térmico foram inicialmente realizados a 48°C, temperatura utilizada nos testes de fase exponencial. Porém, a cepa parental mostrou-se mais sensível a este tratamento na fase estacionária, apresentando uma queda drástica em sua viabilidade nos primeiros minutos de tratamento, o que tornou difícil a comparação dos fenótipos a esta temperatura. Assim, os ensaios foram realizados a 45°C durante esta fase do crescimento. Da mesma forma, a cepa NA1000 mostrou-se mais sensível a este tratamento na fase estacionária de crescimento, em comparação a experimentos realizados durante a fase exponencial (não mostrado). Esta diferença no perfil de sensibilidade a choque térmico durante a fase estacionária em relação ao descrito por Wortinger e cols. (1998) pode ser decorrente de diferenças experimentais.

Os ensaios de viabilidade a choque térmico demonstraram que a cepa mutante por inserção SG447 é bem mais sensível a este tratamento, enquanto o mutante por deleção SG16 não apresentou sensibilidade aumentada em comparação a NA1000 (Figura 12A). A

sensibilidade a choque térmico na cepa SG447 ocorre apenas na fase estacionária, uma vez que testes de viabilidade foram realizados durante a fase exponencial a 45°C e a 48°C e esta cepa apresentou o mesmo perfil que a NA1000 (não mostrado). Desta forma, este fenótipo deve estar relacionado a alterações na expressão do gene CC3252, uma vez que só é observado na cepa SG447, assim como a queda na viabilidade desta cepa durante períodos prolongados em cultura.

Os mutantes em *sigF* foram também analisados quanto à sensibilidade a pH ácido, pelo tratamento em meio PYE líquido a pH 4,0, segundo descrito em Wortinger e cols (1998). Este tratamento foi similar ao realizado nos experimentos utilizando culturas de fase exponencial. Assim como observado nos ensaios de choque térmico, não se verificou um aumento na resistência a este estresse em culturas da cepa parental cultivadas por 24 h, quando comparadas com culturas de fase exponencial, ao contrário do que havia sido descrito anteriormente (Wortinger et al., 1998). Esta diferença no perfil de viabilidade da cepa NA1000 durante a fase estacionária tardia em relação ao descrito por Wortinger e cols (1998) também foi observada por Italiani e cols (2002). As cepas mutantes SG16 e SG447 não se mostraram mais sensíveis ao tratamento em comparação a NA1000, indicando que o gene *sigF* não esteja envolvido na resposta a pH ácido nesta fase do crescimento.

Os ensaios de viabilidade a estresse oxidativo foram realizados pela adição de 15 mM de H₂O₂, concentração bem maior que a utilizada nos experimentos utilizando culturas de fase exponencial (2,5 mM). A cepa parental mostrou-se resistente a este tratamento durante a fase estacionária, conforme havia sido descrito por Wortinger e cols (1998) (figura 12). Conforme pode ser visto na figura 12B, os dois mutantes em *sigF* mostraram-se mais sensíveis ao tratamento durante a fase estacionária tardia (24 h) quando comparados à NA1000, sendo que o mutante por deleção SG16 é muito mais sensível que a cepa SG447. Ensaios de viabilidade a 2,5 e 15 mM de H₂O₂ durante a fase exponencial não demonstraram sensibilidade

aumentada das cepas mutantes em comparação à NA1000 (dados não mostrados). Estes resultados indicam que *sigF* é essencial para a resposta a estresse oxidativo durante a fase estacionária em *C. crescentus*.

Figura 12: As cepas mutantes em *sigF* são mais suscetíveis a estresses durante a fase estacionária de crescimento. As cepas foram cultivadas em meio PYE por 24 h antes da adição do estresse. **A)** Gráfico representando ensaios de viabilidade a choque térmico a 45°C. Os resultados representam média de 3 experimentos independentes. **B)** Ensaio de viabilidade a 15 mM de H₂O₂. Os resultados representam a média de 3 experimentos independentes. As barras verticais representam o desvio padrão.

As diferenças observadas entre as linhagens SG447 e SG16 poderiam ser resultantes de efeitos polares da inserção do cassete sobre gene CC3252, que codifica uma proteína com 6 domínios transmembrana. Uma vez que o cassete de resistência a espectinomicina utilizado para a construção da cepa SG447 possui sinais de término de transcrição em suas extremidades, a sua inserção no interior da região codificadora de *sigF* poderia impedir a transcrição de CC3252 (Prentki & Krisch, 1984). Entretanto, ensaios de RT-PCR demonstraram que o gene é transcrito na cepa SG447, sugerindo que o efeito polar pode ser devido a alterações quantitativas na expressão de CC3252. Os níveis de expressão do gene foram então quantificados por meio de ensaios de RT-PCR semi-quantitativo. De acordo com os resultados obtidos e apresentados na figura 13, a expressão deste gene está bastante aumentada na cepa SG447 (mais de 3x), quando comparada à cepa NA1000. Este resultado pode indicar que o sinal de término de transcrição do cassete não é funcional e, neste caso, a expressão de CC3252 estaria sendo regulada também pelo promotor do cassete. Outra possibilidade é que este gene possua um promotor próprio, que teria sua função afetada pela inserção do cassete.

Figura 13: Análise dos níveis de mRNA do gene CC3252 nos mutantes em *sigF*, SG447 (A) e SG16 (B) por ensaios de RT-PCR semi-quantitativo. As reações de RT-PCR foram realizadas com 100 ng de RNA de culturas crescidas por 24 h a 30°C. Foram utilizados 22 ciclos de amplificação e temperatura de hibridização de 55°C. Os produtos foram resolvidos em gel de agarose 1,5% e transferidos para membrana de náilon, que foi hibridizada com sonda do gene CC3252. O fragmento usado como sonda foi obtido por PCR com os mesmos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR. As figuras A e B mostram as autorradiografias obtidas. Reações na ausência de transcriptase reversa também foram realizadas (não mostrado). Os valores abaixo das figuras indicam a intensidade relativa das bandas, determinada por densitometria usando o programa ImageQuant.

A análise descrita acima confirma a ocorrência de efeitos de polaridade sobre o gene a 3' de *sigF* na cepa SG447 e, portanto, demos preferência à utilização da cepa SG16 nos experimentos subsequentes.

Assim, foram realizados ensaios de viabilidade a 15 mM de H₂O₂ com culturas da cepa SG16 em fase estacionária precoce, ou seja, após 12 h de crescimento a 30°C (a estabilização no crescimento das culturas, medida através da DO_{600nm}, ocorre após 10 h de cultivo, aproximadamente). O objetivo foi verificar se a cepa parental já apresenta resistência aumentada a H₂O₂ nesta fase de crescimento e se já se observam diferenças na resposta ao tratamento entre a cepa NA1000 e a SG16. A cepa parental ainda não apresenta resistência aumentada ao estresse oxidativo no início da fase estacionária, demonstrando um perfil de sensibilidade similar ao observado durante a fase exponencial (figura 14, comparar com figura 12B). A cepa SG16, porém, é bem mais sensível a este tratamento na fase estacionária precoce, o que não ocorre na fase exponencial (figura 14). Desta forma, *sigF* parece exercer

um papel importante na resposta a estresse oxidativo pela entrada na fase estacionária de crescimento, mesmo no período anterior à aquisição de alta resistência a este estresse pela cepa parental.

Figura 14: A cepa mutante em *sigF* é mais sensível a estresse oxidativo na fase estacionária precoce de crescimento. O gráfico representa ensaios de viabilidade a 15 mM de H₂O₂ utilizando culturas de 12 h de crescimento (linhas contínuas) e de fase exponencial (linhas pontilhadas). Os resultados de 12 h representam a média de 3 experimentos independentes. As barras verticais representam o desvio padrão.

Uma cepa mutante condicional no gene *sigF* foi também construída, pela inserção de uma cópia funcional de *sigF* no locus do gene *xylX* do cromossomo da cepa SG16. O produto do gene *xylX* atua na degradação de xilose presente no meio de cultura e possui um promotor induzido por xilose (Meisenzahl et al., 1997). Com isso, a expressão do gene *sigF* nesta cepa é dependente da adição de xilose ao meio de cultura, podendo ser induzida ou inibida em condições específicas de nosso interesse.

Inicialmente, foi obtida uma fusão de tradução do gene *sigF* aos 6 primeiros códons de *xyIX*, no vetor pNPT228XNE, que possui também um fragmento de aproximadamente 2,3 kb da região a 5' de *xyIX*. Esta construção, denominada pCM22, foi transferida para a cepa SG16 e foram selecionadas colônias resistentes a canamicina, característica conferida pelo vetor. Este vetor é incapaz de replicar em *C. crescentus*, portanto, as colônias selecionadas possuem a construção pCM22 inserida no locus *xyIX* do cromossomo, por um evento de recombinação homóloga. O clone selecionado para os experimentos subsequentes foi denominado SG16C. A regulação da expressão de *sigF* pela presença de xilose nesta cepa foi confirmada por meio de ensaios de RT-PCR e “Western-blot”, utilizando soro policlonal anti-sigF (obtido durante este trabalho) (figura 15A). Os resultados destes ensaios demonstraram que não há expressão residual de *sigF* na ausência de xilose, confirmando que a cepa é mutante neste gene na ausência do indutor. Os ensaios de “Western blot” demonstraram a presença de altos níveis da proteína SigF a partir de 15 min após a adição de xilose durante a fase exponencial (da mesma forma, os níveis do RNAm de *sigF* já estão muito elevados nesta condição). Verificou-se também um aumento gradual nos níveis da proteína nos tempos subsequentes de crescimento na presença do indutor (figura 15A).

Ensaio de complementação foram realizados utilizando a cepa SG16C, com o objetivo de demonstrar que o fenótipo observado na linhagem SG16 é decorrente apenas da ausência de *sigF*. A viabilidade após adição de H₂O₂ foi determinada comparando-se culturas tratadas com glicose àquelas nas quais adicionou-se xilose ao meio de cultura, ambas cultivadas por 24 h antes da adição do açúcar. Conforme pode ser visto na figura 15B, a adição de xilose ao meio de cultura antes do tratamento com H₂O₂ é capaz de restaurar a viabilidade da cepa SG16C a este agente, enquanto o tratamento com glicose não causa efeitos. Este resultado confirma os dados anteriores, demonstrando que *sigF* é essencial na resposta a este estresse em *C. crescentus*. A complementação não foi completa, uma vez que a

cepa SG16C pré-tratada com xilose ainda é um pouco mais sensível que a NA1000. Este fato pode ser devido a diferenças na regulação do gene, uma vez que *sigF* está sendo expresso a partir de um outro promotor e em outro locus no cromossomo.

Figura 15: Complementação do fenótipo da cepa mutante por deleção em *sigF*. **A)** Análise por “Western-blot” dos níveis da proteína SigF na cepa mutante condicional SG16C, usando anticorpo policlonal anti-*sigF*. Culturas da cepa SG16C foram cultivadas até a fase exponencial antes da adição de 0,1% de xilose. Aliquotas de células foram retiradas antes e em intervalos após a adição do indutor para o preparo de extratos protéicos. O ensaio foi revelado pelo uso de anticorpo secundário conjugado a peroxidase, utilizando o kit ECL. **B)** Curvas de viabilidade após a adição de 15 mM de H₂O₂ na fase estacionária. As cepas foram cultivadas por 24 h na ausência de xilose antes da adição de 0,2% de glicose (controle) ou xilose + glicose (0,1% de cada). Após incubação por 150 min a 30°C, adicionou-se H₂O₂ na concentração desejada. Os resultados representam média de 3 experimentos independentes. As barras verticais representam o desvio padrão.

4.2.2) Análise da Expressão de *sigF*

4.2.2.1) Regulação da Expressão de *sigF* na Resposta a Choque Térmico

A expressão de *sigF* durante o crescimento a 30°C e em resposta a alguns estresses foi analisada utilizando a construção pRB70, que contém uma fusão de transcrição da região promotora do gene *sigF* (670pb de região a 5' do gene, a partir do códon de início de tradução) ao gene repórter *lacZ* (tabela 7). A atividade promotora de *sigF* apresentou um nível muito baixo durante a fase exponencial, determinada por ensaios de β -galactosidase, atingindo níveis similares aos do controle negativo (vetor contendo o gene *lacZ* sem promotor). Além disto, não houve indução na atividade do promotor durante estresse salino (85 mM de NaCl por até 6 h) ou após choque térmico a 40°C por 2 h (não mostrado).

Entretanto, ensaios de RT-PCR semi-quantitativo mostraram a indução de mais de 2,5 vezes na expressão do gene *sigF* após choque térmico extremo (48°C) durante a fase exponencial de crescimento, determinado por densitometria das bandas usando o programa ImageQuant (figura 16A). Este ensaio também mostrou que o gene *sigF* é expresso em níveis muito baixos na fase exponencial em condições fisiológicas e não é induzido por estresse salino, o que confirmou os resultados obtidos por ensaios de β -galactosidase.

O início de transcrição de *sigF* foi então determinado em ensaios de extensão de oligonucleotídeo pela transcriptase reversa, fazendo uso dos altos níveis de expressão do gene após o tratamento a 48°C durante a fase exponencial de crescimento. Não havia sido possível detectar o transcrito de *sigF* em ensaios anteriores nos quais utilizou-se RNA da cepa NA1000 extraído de células em condições fisiológicas normais. Conforme apresentado na figura 16B, a banda correspondente ao início de transcrição de *sigF* só foi detectada após o choque térmico, o que confirma a indução do gene por este tratamento. Este resultado também é consistente com os dados de ensaios de RT-PCR e de β -galactosidase, que indicam um nível muito baixo na expressão do gene durante o crescimento a 30°C. A banda corresponde a um

produto de 52 nt, e o início de transcrição foi mapeado em uma guanina localizada 35 pb a 5' de um dos potenciais códons de início de tradução de *sigF*. O códon iniciador determinado por esta análise é distinto do inferido pela anotação da TIGR (valina) e está localizado 33 pb a 3' deste, o que reduz o tamanho da proteína SigF em 11 aminoácidos (indicado na figura 16B). O códon iniciador sugerido pelo início de transcrição contém uma sequência Shine-Dalgarno (SD) a uma distância de 5 pb, enquanto uma boa sequência SD não está presente na região que contém o códon predito pela TIGR.

A análise da região a 5' do sítio de início de transcrição de *sigF* mostrou a presença de uma sequência -35 com similaridade a sequências -35 de promotores reconhecidos por fatores ECF em outras bactérias e contendo o elemento conservado "AAC", típico destes promotores. A região -10 é pouco conservada entre promotores do tipo ECF, tornando difícil a comparação. Uma vez que a maioria dos fatores ECF descritos até o momento regulam positivamente sua própria expressão (autorregulação positiva) e um promotor similar ao reconhecido por fatores ECF foi encontrado na região regulatória de *sigF*, ensaios de extensão de oligonucleotídeo foram também realizados utilizando-se RNAs isolados das cepas mutantes em *sigF*, SG16 e SG477. Esta análise tornou-se possível porque o oligonucleotídeo usado nos experimentos reconhece uma região não afetada pelas mutações no gene. Conforme pode ser visto na figura 16B, não houve indução na expressão de *sigF* após choque térmico nas cepas mutantes neste gene. Este resultado sugere que *sigF* autorregula positivamente sua própria expressão durante o choque térmico na fase exponencial de crescimento.

Figura 16: Expressão de *sigF* em resposta a choque térmico extremo na fase exponencial de crescimento e determinação do início de transcrição. **A)** Análise da Expressão de *sigF* durante a fase exponencial por RT-PCR semi-quantitativo. As reações foram realizadas com 500 ng de RNA, 25 ciclos de amplificação e temperatura de hibridização de 60°C. O produto de tamanho molecular esperado (290 pb) foi visualizado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio e está indicado pela seta. Os RNAs foram obtidos de culturas de fase exponencial tratadas ou não a 48°C por 15 min ou com 85 mM de NaCl por 1 h. A canaleta indicada por (-RT) se refere à reação controle, sem adição de transcriptase reversa. M.= marcador de tamanho molecular (100 pb DNA ladder – GE Healthcare). **B)** Determinação do início de transcrição de *sigF* por ensaios de extensão de oligonucleotídeo. Os RNAs foram extraídos de culturas das cepas NA1000, SG447 e SG16 em fase exponencial, tratadas ou não a 48°C por 15 min. A reação de sequenciamento de DNA do fago M13 (utilizando o oligonucleotídeo -40) foi utilizada como padrão de tamanho de fragmento e está mostrada à esquerda da figura. O produto de extensão de 52 nt obtido está indicado pela seta. A sequência da região a 5' de *sigF* está apresentada abaixo da figura. O códon iniciador da tradução está indicado em cinza na região sublinhada, que representa a sequência complementar ao oligonucleotídeo utilizado. O nucleotídeo iniciador da transcrição está indicado como “+1”. As regiões -10 e -35 estão indicadas por retângulos. O códon de início de tradução sugerido pela TIGR está em itálico. A sequência Shine-Dalgarno está em cinza a 5' do códon iniciador (SD).

A indução da expressão de *sigF* por choque térmico foi também analisada em nível pós-transcricional, através de ensaios de “Western-blot” usando anticorpo policlonal anti-SigF. Entretanto, não foi possível detectar aumento nos níveis da proteína pelo tratamento a 48°C. O tratamento a 48°C é bastante drástico, levando a uma queda acentuada na viabilidade da cepa parental, em um período curto de tempo. Desta forma, a célula pode não ter tempo suficiente para apresentar um acúmulo da proteína em níveis detectáveis por “Western-blot”.

4.2.2.2) Regulação da Expressão de *sigF* na Resposta a Fase Estacionária e Estresse Oxidativo

Uma vez que *sigF* mostrou-se essencial na resposta a estresse oxidativo durante a fase estacionária em *C. crescentus*, sua expressão foi analisada nestas condições, em nível transcricional e pós-transcricional.

A transcrição de *sigF* foi analisada por ensaios de RT-PCR e atividade de β -galactosidase (usando a construção pRB70). Não foi detectado aumento na transcrição do gene durante a fase estacionária de crescimento por nenhuma das duas metodologias (figura 17A). A expressão de *sigF* após o tratamento com concentrações distintas de H₂O₂ foi analisada durante a fase exponencial e estacionária de crescimento. Para os ensaios de β -galactosidase durante a fase exponencial, foram testadas as concentrações de 60 e 150 μ M de H₂O₂ e não foi possível verificar indução significativa na atividade do promotor de *sigF*. Em *C. crescentus*, a adição de 60 μ M de H₂O₂ durante a fase exponencial é suficiente para promover um aumento de 17x na expressão do gene *katG*, que codifica a enzima catalase, responsável pela eliminação de H₂O₂ (Steinman et al., 1997). As concentrações testadas nos ensaios durante a fase estacionária variaram de 0,5 a 15 mM de H₂O₂ (0,5; 1; 5; 10 e 15 mM) e também não houve indução na atividade do promotor de *sigF* (não mostrado). Da mesma forma, não ocorreu indução da expressão do gene evidenciada por meio de ensaios de RT-

PCR utilizando RNAs tratados com 60 μ M de H_2O_2 na fase exponencial e 120 μ M de H_2O_2 na fase estacionária tardia (não mostrado).

Para investigar os níveis da proteína SigF em diversas condições de crescimento foi obtido durante este trabalho um anticorpo policlonal anti-sigF. A banda correspondente a SigF possui massa molecular aparente de 25 kDa e foi identificada como a única banda ausente em extratos protéicos das cepas mutantes em *sigF*, SG16 e SG447. Como descrito anteriormente para outros fatores sigma, a massa molecular aparente de SigF em géis SDS-PAGE é maior que a prevista pela sua sequência de aminoácidos, de aproximadamente 19 kDa (Haldenwang, 1995).

O acúmulo de Sig F em resposta a H_2O_2 , durante a fase exponencial e após 24 h de crescimento foi então analisado em ensaios de “Western blot”. Utilizou-se inicialmente a concentração de 150 μ M de H_2O_2 por até 60 min e não foi observado aumento nos níveis da proteína em nenhuma das duas fases do crescimento com o tratamento. Em células de 24 h de crescimento, foi também testada a exposição a concentrações mais altas de H_2O_2 , uma vez que a cepa parental é bastante resistente a este tratamento. Porém, também não foi verificado aumento nos níveis da proteína pelo tratamento com 15 mM de H_2O_2 por até 120 min (dados não mostrados).

Entretanto, a análise dos níveis de Sig F em função das fases de crescimento demonstrou um aumento de mais de 2x nos níveis da proteína no início da fase estacionária (12 h de crescimento), permanecendo em níveis elevados após 24 h de crescimento (Figura 17). Este resultado demonstra que *sigF* é regulado pós-transcricionalmente em resposta à entrada na fase estacionária de crescimento, mesmo período em que a cepa mutante neste gene apresenta um fenótipo de sensibilidade a estresse oxidativo (Figura 14).

Figura 17: A proteína SigF, mas não o mRNA correspondente, tem seus níveis aumentados em células da fase estacionária de crescimento. **A)** Análise dos níveis do mRNA de *sigF* por RT-PCR semi-quantitativo. As reações de transcrição reversa e amplificação foram realizadas separadamente. RNA total de culturas da cepa NA1000 foram extraídos após 4 (fase exponencial) e 24h de crescimento. Foram utilizados 500 ng de cada RNA e a enzima “Superscript II” (Invitrogen) para a transcrição reversa. A amplificação dos cDNAs foi realizada com 10% de cada reação de transcrição reversa, utilizando-se 30 ciclos de amplificação e temperatura de anelamento de 60°C. O produto do tamanho esperado, visualizado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídio, está indicado pela seta. **B)** Análise dos níveis de SigF em fases distintas de crescimento por “Western-blot”. Extratos proteicos da cepa NA1000 foram obtidos de uma mesma cultura inicial após o crescimento por 4, 12 e 24 h a 30°C. Extratos proteicos da cepa SG16 cultivada por 4 h foram obtidos e utilizados como controle negativo. O anticorpo primário foi utilizado no título 1:1000. O ensaio foi revelado pelo uso de anticorpo secundário conjugado com peroxidase. **C)** Densitometria das bandas em (B).

Vale ressaltar ainda que durante a fase estacionária o aumento nos níveis da proteína SigF não se reflete em um aumento na transcrição do gene, indicando que, nestas condições o gene não está sendo autorregulado positivamente. Este resultado sugere um controle transcricional distinto durante a fase estacionária em comparação à fase exponencial.

A regulação pós-transcricional de *sigF* pode ocorrer pelo aumento na taxa de tradução da proteína ou por inibição da sua degradação durante a fase estacionária, o que aumentaria a sua estabilidade. Em *E.coli*, foi demonstrado que o fator sigma de fase estacionária, σ^S , está presente em baixos níveis durante a fase exponencial de crescimento devido à sua degradação pela protease ClpXP (Lange & Hengge-Aronis, 1994; Schweder et al., 1996). Além disso, verificou-se que ocorre um acúmulo desta proteína durante a fase estacionária e após determinados estresses devido a uma maior resistência de σ^S a degradação por ClpXP nestas condições (Schweder et al., 1996). Com o objetivo de verificar se SigF é degradado por ClpXP durante a fase exponencial, os níveis da proteína foram analisados através de ensaios de “Western blot” em cepas mutantes condicionais em *clpX* e *clpP*, gentilmente cedidas pelo Dr. Urs Jenal (Universidade de Basel, Suíça) (Jenal & Fuchs, 1998). Estas linhagens só expressam os genes *clpX* ou *clpP* após a adição de xilose ao meio de cultura. Entretanto, não foram verificadas diferenças nos níveis da proteína SigF quando foram comparadas culturas crescidas na presença e ausência de xilose, o que indica que a regulação pós-transcricional de *sigF* não é mediada por ClpXP (dados não mostrados).

4.2.2.3) Análise da Super-expressão de *sigF*

Os efeitos da super-expressão de *sigF* foram analisados pelo uso da construção pCM70, que contém a região codificadora de *sigF* sob controle de um promotor constitutivo no vetor pJS14, capaz de se replicar com alto número de cópias em *C. crescentus*. Esta construção foi transferida para a cepa NA1000 por conjugação e a expressão aumentada de

sigF foi confirmada por RT-PCR e “Western-blot”, usando soro policlonal anti-*sigF*. Verificou-se que a super-expressão de *sigF* não afetou o crescimento e a viabilidade das culturas em condições fisiológicas normais.

Esta cepa foi utilizada para a análise da autorregulação positiva na expressão de *sigF*, que havia sido sugerida a partir dos resultados de ensaios de extensão de oligonucleotídeo. Assim, pretendia-se verificar se a super-expressão de *sigF* promove um aumento na atividade de seu promotor. Para isso, a construção pRB70 (fusão de transcrição do promotor de *sigF* ao gene *lacZ*) foi transferida para a cepa superexpressando *sigF*, denominada NA1000/pCM30, e foram realizados ensaios de atividade de β -galactosidase. Conforme mostra a figura 18, a superexpressão de *sigF* promove um aumento de mais de 2x na atividade do seu promotor, indicando mais uma vez que SigF é capaz de autorregular positivamente a sua expressão.

Figura 18: Efeito da super-expressão de *sigF* na atividade de seu promotor. O gráfico representa a atividade de β -galactosidase determinada utilizando a construção pRB70 na linhagem NA1000. A cepa indicada por NA1000/pRB70/pjs14 (barras cinzas) corresponde a cepa parental contendo o vetor utilizado para super-expressão de *sigF* sem o inserto e foi utilizada como controle (não super-expressa *sigF*). As barras brancas correspondem aos valores de atividade da enzima obtidos na cepa super-expressando *sigF*. Os resultados representam média de 3 experimentos independentes. As barras verticais representam o desvio padrão.

4.2.3) Identificação de Genes Regulados por SigF: Análise do Perfil Global de Expressão

Gênica da Cepa SG16 por Microarranjos de DNA ("Microarrays")

Um dos objetivos propostos durante o trabalho foi a identificação de genes regulados por *sigF*. Inicialmente, foram realizados alguns géis bidimensionais comparando o perfil de proteínas sintetizadas na cepa parental NA1000 e na cepa mutante SG447 durante o início da fase estacionária de crescimento. Comparações entre a cepa superexpressando *sigF* e a NA1000 também foram realizadas por meio de géis bidimensionais. Entretanto, diferenças muito sutis foram observadas e a maioria das proteínas diferencialmente expressas nas cepas

estavam presentes em baixos níveis, não sendo detectadas pela coloração com prata, o que dificultaria a identificação destas proteínas.

Surgiu então a possibilidade da realização de experimentos de microarranjos de DNA ("Microarray"), a partir de uma colaboração com a Dra. Lucy Shapiro (Universidade de Stanford, Califórnia, EUA), que possui "chips" de DNA onde estão aplicados 3761 oligonucleotídeos, representando 99,9 % das ORFs de *C. crescentus* (3763 ORFs).

Uma vez que os resultados de caracterização da expressão de *sigF* e dos fenótipos da cepa mutante demonstraram um papel deste gene na resposta a fase estacionária, os experimentos de "microarray" foram realizados comparando-se as cepas NA1000 e SG16 nesta fase do crescimento. Utilizou-se RNAs extraídos de culturas crescidas por 12 e 24 h a 30°C, representando a fase estacionária precoce e tardia, respectivamente. Estes RNAs foram enviados ao laboratório da Dra. Lucy Shapiro, onde foram realizados os experimentos. Foram realizados 4 experimentos para cada uma das condições, utilizando-se culturas independentes em cada um deles (réplicas biológicas). A análise dos dados mostrou oito genes cuja expressão apresentou uma redução maior que 1,5x na cepa mutante SG16 em pelo menos um dos tempos de crescimento analisados (tabela 9). Este resultado indica que *sigF* regula um grupo reduzido de genes em condições específicas de crescimento e, de certo modo, confirma os dados obtidos pela caracterização do fenótipo da cepa SG16, que demonstraram que *sigF* não é essencial nas fases exponencial e estacionária de crescimento. Além disto, nenhum gene sofreu aumento significativo em sua expressão na cepa mutante SG16, indicando que não há indução na transcrição de genes capazes de compensar a falta de *sigF*.

Tabela 9: Genes que apresentam redução significativa de expressão na cepa mutante em *sigF* SG16 em experimentos de “microarray”.

Gene	Anotação/ Função ^a	Tempos de Crescimento ^b	log ₂ SG16/NA1000 12 h	log ₂ SG16/NA1000 24h
CC1039	<i>msrA</i>	24 h	(-0,46 ; 19,7%)	-0,93
CC1775	PH	12 h	-1,28	(-0,33 ; 29,6%)
CC1777	<i>sodA</i>	12 h	-1,3	(-0,35 ; 21%)
CC1839	PHC	12 h	-0,75	(0,32 ; 0,7%)
CC2906	PHC	12 h e 24 h	-1,64	-2,31
CC3255	PHC	12 h e 24 h	-3,71	-2,41
CC3257	PHC	12 h e 24 h	-2,42	-1,14
CC3572	anidrase carbônica	12 h e 24 h	-1,10	-1,16

Nestes ensaios o padrão global de expressão gênica da cepa SG16 foi comparado ao da NA1000 usando culturas de 12 h e 24 h de crescimento. As diferenças de expressão entre as duas cepas estão representadas pelo log₂ da razão normalizada SG16/NA1000 (mediana de 4 experimentos independentes) (duas últimas colunas). Foram selecionados os genes que apresentaram probabilidade maior de 85% de possuírem queda de expressão maior que 1,5x na cepa SG16 (log₂ {SG16/1000} menor que -0,58). Para os genes que apresentaram diferenças significativas de expressão entre as cepas em apenas um dos tempos de crescimento analisados, a diferença de expressão que não foi considerada significativa está indicada entre parênteses, juntamente com a probabilidade desta razão ser menor que -0,58.

a- PH = proteína hipotética; PHC = proteína hipotética conservada

b- esta coluna indica os tempos de crescimento nos quais houve variação significativa na expressão de cada um dos genes.

A partir da análise dos dados obtidos nos experimentos de “microarray”, alguns genes foram selecionados para a confirmação de suas variações de expressão, em ensaios de RT-PCR semi-quantitativo. Estes ensaios foram realizados usando RNAs de uma mesma cultura cultivada por 4 (fase exponencial), 12 e 24 h. Pretendia-se, portanto, verificar também se o gene em questão apresenta indução pela entrada na fase estacionária e se sua regulação também é dependente de *sigF* durante a fase exponencial. O gene *sigL* foi utilizado como controle, uma vez que os dados de “microarray” indicaram que este gene não apresenta variações de expressão na cepa mutante SG16. Conforme pode ser visto na figura 19A, este gene não apresentou variações significativas em sua expressão na comparação entre as duas cepas nos tempos de interesse, indicando também que as quantidades de RNA utilizadas estavam bem igualadas.

O gene CC3255 foi um dos selecionados por apresentar a maior queda na expressão na cepa SG16 nos dois tempos de crescimento. Este gene codifica uma proteína hipotética conservada localizada em um provável operon contendo também os genes CC3256 e CC3257. Este operon está localizado a 5' de *sigF* (CC3253), na orientação oposta, logo após o gene CC3254 (figura 4) e esta organização encontra-se conservada na região que contém um homólogo a *sigF* em *S. meliloti*. Esta conservação estrutural pode sugerir que este gene tenha função relacionada a *sigF*. Conforme pode ser visto na figura 19B, a expressão de CC3255 é muito reduzida na cepa SG16 durante o crescimento exponencial (4 h) e após 24 h de crescimento, confirmando a regulação mediada por *sigF*. A densitometria das bandas indica uma queda de aproximadamente 10x na expressão do gene nestas condições, quase o dobro do determinado a partir dos ensaios de “microarray” (queda de 5,3 x em culturas de 24 h). Porém, não foi possível confirmar a queda na expressão do gene utilizando RNA de culturas de 12 h de crescimento (este experimento foi realizado em duplicata e com quantidades crescentes de RNA). Este resultado pode indicar diferenças nas duas metodologias de análise de expressão, que serão melhor avaliadas na Discussão.

Figura 19: Análise da expressão de *sigL* e do gene CC3255 em ensaios de RT-PCR semi-quantitativo. Os níveis de expressão dos genes *sigL* (**A**) e CC3255 (**B**) foram comparados entre as cepas NA1000 e SG16 nos tempos de 4, 12 e 24 h de crescimento a 30°C. **A)** As reações foram realizadas com 200 ng de RNA, 21 ciclos de amplificação e temperatura de hibridização de 55°C. **B)** Utilizou-se 100 ng de RNA, 19 ciclos de amplificação e temperatura de hibridização de 50°C. Nos dois experimentos, os produtos foram aplicados em gel de agarose 1,5% e, após eletroforese, o DNA foi transferido para membrana de náilon, que foi hibridizada com sonda específica para cada um dos genes. Os fragmentos usados como sonda foram obtidos por PCR com os mesmos oligonucleotídeos utilizados nas reações de RT-PCR. Reações na ausência de transcriptase reversa foram realizadas concomitantemente e aplicadas no mesmo gel (não mostrado). Utilizou-se RNA obtido de amostras biológicas distintas das usadas para os ensaios de “microarray”. Os gráficos abaixo dos autorradiogramas mostram a densitometria das bandas observadas em cada um dos experimentos, realizada pelo programa ImageQuant. Os valores estão expressos em intensidade relativa à banda de maior intensidade.

Durante a análise dos dados de “microarray”, procurou-se, dentre os genes com queda de expressão na cepa SG16, aqueles envolvidos na resposta a estresse oxidativo e a fase estacionária de crescimento, com o objetivo de explicar o fenótipo da cepa SG16.

Assim, observou-se a redução de 1,9 x na expressão do gene *msrA* (CC1039) na cepa SG16 após 24 h de crescimento. Este gene codifica a proteína metionina-sulfóxido-redutase (MsrA), uma enzima antioxidante, que atua no reparo de resíduos de metionina sulfóxido [Met(O)] em proteínas, resultantes da oxidação de metioninas por EAO (Weissbach et al., 2002). Várias evidências indicam um papel de MsrA na defesa contra o estresse oxidativo. Verificou-se que cepas de *E.coli* mutantes em *msrA* são altamente sensíveis a H₂O₂ e a espécies ativas de nitrogênio (Moskovitz et al., 1995; St. John et al., 2001). Da mesma forma, a sensibilidade de cepas mutantes em *msrA* a H₂O₂ também foi observada em leveduras e em *Staphylococcus aureus* (Moskovitz et al., 1997; Singh et al., 2001). Além disto, a expressão de *msrA* é induzida pela entrada na fase estacionária em *E. coli* (Moskovitz et al., 1995).

Desta forma, este gene foi selecionado para a confirmação dos resultados de “microarray” por meio de RT-PCR semi-quantitativo. Esta análise indicou que o gene *msrA* não é induzido pela entrada na fase estacionária de crescimento (figura 20A). Além disso, os resultados obtidos mostraram que a expressão de *msrA* é regulada por *sigF* em todas as fases do crescimento testadas, uma vez que há uma queda de aproximadamente 2 x na sua expressão na cepa SG16 em todos os tempos analisados (figura 20A). Por outro lado, os dados de “microarray” usando amostras de 12 h foram distintos dos obtidos a partir do RT-semi-quantitativo, uma vez que a queda na expressão do gene na cepa SG16 não foi considerada significativa após a análise estatística dos dados (tabela 9). Este resultado pode ser decorrente da maior variabilidade entre as réplicas biológicas no caso dos ensaios de “microarray”.

O gene CC1777 (*sodA*), que apresentou queda de expressão na cepa mutante SG16 após 12 h de crescimento (mediana log₂ SG16/NA1000 = -1,3, resultando em expressão 2,5x

menor na cepa SG16) também foi selecionado para a realização de ensaios de RT-PCR semi-quantitativo, devido ao seu papel na resposta a estresse oxidativo em várias bactérias. O gene *sodA* codifica a enzima (Mn²⁺)-superóxido dismutase, importante para a detoxificação de O₂⁻. Além disto, verificou-se que cepas mutantes em *sodA* apresentam sensibilidade aumentada a H₂O₂ em várias bactérias, como *E.coli*, *Streptococcus gordonii* e *Streptococcus agalactiae* (Imlay & Linn, 1987; Jakubovics et al., 2002; Poyart et al., 2001).

A análise da expressão do gene em função do tempo de incubação das culturas mostrou uma queda drástica nos níveis de mRNA de *sodA* durante a fase estacionária, após 12 e 24 h de crescimento (figura 20B), o que indica que a proteína SodA deve ter um papel mais importante durante a fase exponencial de crescimento. Além disto, foi possível confirmar os dados de “microarray” através dos ensaios de RT-PCR semi-quantitativo, uma vez que a expressão do gene está bastante reduzida na cepa SG16 após 12 h de crescimento, voltando a apresentar níveis similares à NA1000 após 24 h a 30°C. Este resultado sugere que *sigF* atua na regulação da expressão de *sodA* no início da fase estacionária, não sendo essencial para esta função durante a fase exponencial e após 24 h de crescimento.

O gene CC3572, que codifica a anidrase carbônica, também apresentou queda de expressão na cepa SG16 após 12 h de crescimento em experimentos de “microarray” (tabela 9). Esta enzima catalisa a interconversão do CO₂ (dióxido de carbono) em HCO₃⁻ (ânion bicarbonato). O gene *can*, que codifica uma das anidrases carbônicas de *E.coli*, é essencial para o crescimento e é induzido pela entrada na fase estacionária e após choque térmico (Merlin et al., 2003). Este gene também foi selecionado para a confirmação através de ensaios de RT-PCR, porém, não foi possível confirmar a diferença de expressão entre as cepas por esta análise (não mostrado).

Figura 20: Os genes de resposta a estresse oxidativo *msrA* e *sodA* apresentam queda de expressão na cepa mutante SG16. A comparação dos níveis de expressão dos genes CC1039 (*msrA*) e CC1777 (*sodA*) entre as cepas NA1000 e SG16 foi realizada em ensaios de RT-PCR semi-quantitativo. Utilizou-se as mesmas amostras de RNA dos ensaios descritos na figura 19. **A)** O gene *msrA* apresenta queda de expressão na cepa SG16 em todos os tempos de crescimento analisados. As reações foram realizadas com 100 ng de RNA, 19 ciclos de amplificação e temperatura de hibridização de 55°C. **B)** O gene *sodA* apresenta expressão dependente de SigF após 12 h de crescimento. Utilizou-se 200 ng de RNA, 19 ciclos de amplificação e temperatura de hibridização de 50°C. Após as amplificações, os experimentos foram realizados conforme descrito na figura 19. Os gráficos abaixo dos autorradiogramas mostram a densitometria das bandas observadas em cada um dos experimentos (programa ImageQuant). Os valores estão expressos em intensidade relativa à banda de maior intensidade.

A) *msrA* B) *sodA*

4.2.4) Análise dos Níveis de KatG na cepa SG16

Em *E.coli*, a maior resistência ao tratamento com H_2O_2 ocorre em parte devido ao aumento nos níveis de *katG* e *katE*, que codificam duas catalases, responsáveis pela decomposição do H_2O_2 em H_2O e O_2 (revisado em Schellhorn, 1994). O gene homólogo a *katG* foi caracterizado em *C. crescentus* (codifica a única catalase nesta bactéria) e observou-se que sua expressão é altamente induzida durante a fase estacionária, sendo essencial para a viabilidade das culturas nesta fase do crescimento (Steinman et al., 1997). Desta forma, consideramos importante analisar os níveis desta proteína na cepa mutante em *sigF*, SG16, com o objetivo de verificar se uma possível queda na expressão de KatG seria responsável pela maior sensibilidade a H_2O_2 observada nesta cepa na fase estacionária. Esta análise foi realizada através de “Western-blot” usando o anti-soro policlonal anti-*katG* de *C. crescentus* (gentilmente cedido por V. Italiani e M.V. Marques, ICB – USP). Conforme pode ser observado na figura 21, os níveis da proteína KatG aumentam bastante a partir de 12 h de crescimento e este acúmulo é ainda maior em culturas de 24 h. Entretanto, não se verificou queda nos níveis de KatG na cepa SG16, observando-se inclusive, um aumento nos níveis da proteína nesta cepa. Estes resultados descartam, portanto, um papel de KatG no fenótipo observado na cepa SG16.

Figura 21: Análise dos níveis da proteína KatG nas cepas NA1000 e SG16 durante o crescimento a 30°C. Ensaio de “Western-blot” utilizando anti-soro policlonal anti-*katG* (diluição 1:500). Extratos protéicos das cepas NA1000 e SG16 foram obtidos a partir de alíquotas retiradas após 4, 12 e 24 h de crescimento em PYE a 30°C, de acordo com o indicado em cada canaleta. O ensaio foi revelado por quimioluminescência usando o kit ECL após incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase. A banda correspondente à proteína KatG está indicada pela seta.

4.3) Caracterização do gene *sigU*

4.3.1) Análise da Regulação Transcricional de *sigU* na Resposta a Estresses

Inicialmente, a expressão de *sigU* durante o crescimento e em resposta a alguns estresses foi analisada pelo uso da construção pRB72, que consiste em uma fusão de transcrição da região promotora de *sigU* (600 pb a 5' do gene) ao gene repórter *lacZ* (obtida por R.L. Baldini).

Ensaio de β -galactosidase realizados com a linhagem NA1000 contendo a construção pRB72 durante o crescimento a 30°C em meio complexo (PYE) mostraram um aumento de 3x na atividade do promotor de *sigU* a partir do início da fase estacionária (figura 22). Este resultado indica que, além de *sigF*, o gene *sigU* também deve possuir um papel na resposta a esta fase do crescimento.

A expressão de *sigU* em resposta a estresse salino ou osmótico foi também analisada durante o crescimento a 30°C, pelo tratamento com 85 mM de NaCl ou 150 mM de sacarose. Conforme apresentado na figura 22, o promotor de *sigU* é altamente induzido pelos dois tratamentos e a atividade do promotor aumenta progressivamente durante a incubação na presença dos agentes testados. Da mesma forma, ensaios de RT-PCR semi-quantitativo também demonstraram indução de 2x na expressão de *sigU* após o tratamento com 85mM de NaCl por 1h durante a fase exponencial (figura 23A).

Figura 22: O gene *sigU* é induzido em resposta à fase estacionária e a estresse salino e osmótico. A linhagem NA1000 carregando a fusão de transcrição *sigU-lacZ* (pRB72) foi submetida a diferentes condições de crescimento e a atividade de β -galactosidase foi determinada. **A)** Atividade do promotor de *sigU* em função do crescimento em condições fisiológicas. As barras cinzas representam os valores de atividade de β -galactosidase e a curva demonstra o crescimento das culturas. Os resultados representam a média de no mínimo 2 experimentos independentes (as barras verticais representam o desvio padrão). **B)** Atividade do promotor de *sigU* em resposta a estresse salino e osmótico. Culturas cultivadas por 16 h foram diluídas para DO_{600nm} de 0,05 e após 2 h, adicionou-se o agente a ser testado. Os resultados indicam a razão (atividade do promotor na cultura tratada dividida pela não tratada) e representam a média de 3 experimentos independentes. O desvio padrão está indicado pelas barras verticais.

A expressão de *sigU* após choque térmico foi analisada em ensaios de β -galactosidase, comparando-se culturas de NA1000/pRB72 não tratadas a culturas submetidas à temperatura de 40°C por 1 h, durante a fase exponencial de crescimento. Não se verificou indução na atividade do promotor por este tratamento (não mostrado). A resposta a choque térmico extremo (48°C) durante a fase exponencial também foi analisada, através de ensaios de RT-PCR semi-quantitativo. Os resultados obtidos demonstraram uma alta indução na expressão do gene nesta condição (indução de 4,4x, conforme determinado por densitometria usando o programa ImageQuant), apresentando níveis maiores que os observados após choque osmótico (figura 23A).

Foram também realizados ensaios de extensão de oligonucleotídeo, com o objetivo de determinar o início de transcrição de *sigU* e investigar a presença de seqüências similares a consensos já estabelecidos de reconhecimento por σ^{70} , σ^{32} ou σ^{ECF} nas regiões -10 e -35. Uma vez que o gene *sigU* é regulado por uma série de condições distintas, os ensaios foram realizados utilizando RNAs obtidos após diferentes tratamentos, tornando possível investigar a presença de diferentes promotores responsáveis pela regulação do gene em resposta a estresses específicos. Verificou-se a presença de apenas um produto de extensão de 174 pb na fase exponencial e após choque osmótico e choque térmico, identificando o início de transcrição em uma citosina localizada a 158 nucleotídeos do códon de início da tradução (figura 23B). Este resultado indica que o gene *sigU* é transcrito a partir de um mesmo promotor em todas estas condições (P1) (figura 23B). Ensaios realizados porém com RNA de células na fase estacionária mostraram a presença de dois produtos de extensão, um deles similar ao encontrado nas demais condições de crescimento e outro de 181 nucleotídeos, que determina um início de transcrição secundário localizado em uma timina a 165 nucleotídeos do ATG que codifica a metionina iniciadora. Este resultado sugere a presença de um segundo promotor para a transcrição de *sigU* durante a fase estacionária de crescimento (P2).

Uma vez que os dados obtidos durante este trabalho demonstraram o papel de *sigF* na resposta à fase estacionária de crescimento, os ensaios para a determinação do início de transcrição foram também realizados utilizando-se amostras de RNA obtidas de culturas da cepa mutante em *sigF*, SG16, cultivada até a fase exponencial e estacionária (24 h). Com isso, pretendia-se verificar se a regulação de *sigU* durante a fase estacionária do crescimento é dependente de *sigF*, que poderia ser responsável pela transcrição a partir de um dos promotores encontrados. Os resultados obtidos mostraram a ausência do produto de extensão específico da fase estacionária na cepa SG16, sugerindo que a transcrição de *sigU* a partir do promotor P2 é dependente de *sigF*. As regiões localizadas a -10 e -35 do início de transcrição dependente de *sigF* foram analisadas, buscando-se seqüências com similaridade a promotores reconhecidos por fatores ECF. O trinucleotídeo “AAC”, altamente conservado em promotores reconhecidos por fatores ECF, foi encontrado na região -35. Além disto, a potencial região -10 de *sigU* é altamente similar à seqüência -10 do promotor do gene *sigF*, apresentando variação em apenas 1 nucleotídeo (figura 23C). Uma vez que o promotor de *sigF* é autorregulado positivamente, a alta conservação entre estas regiões sugere a presença de promotor capaz de ser reconhecido por σ^F , confirmando os dados experimentais.

A análise da potencial região promotora P1, responsável pela transcrição em todas as condições testadas, mostrou a presença de uma seqüência com similaridade ao consenso reconhecido por σ^{70} em *C. crescentus* (Malakooti et al., 1995). A região -35 é bastante conservada, porém, conforme pode ser observado no alinhamento da figura 23C, há uma baixa conservação da região -10. Além disto, não foi encontrada nesta região similaridade ao consenso reconhecido por σ^{32} ou a promotores de fatores ECF. A presença de um promotor dependente de σ^{70} (σ^{73} em *C. crescentus*) indica que outros reguladores (ativadores de transcrição) devem estar envolvidos na ativação da transcrição em resposta aos diversos estresses, uma vez que este fator sigma atua principalmente na expressão constitutiva dos

genes por ele regulados. Desta forma, observou-se a presença de uma sequência com similaridade ao consenso reconhecido pelo regulador de resposta CpxR (figura 23B). Esta proteína faz parte de um sistema de dois componentes (juntamente com CpxA) que atua como regulador de transcrição na resposta a estresses no envelope bacteriano (Raivio & Silhavy, 2001). A análise de promotores reconhecidos por CpxR em *E.coli* levou à identificação de um consenso altamente conservado (descrito na figura 23C) e que normalmente localiza-se próximo à região promotora -35 (Pogliano et al., 1997). Além disto, a regulação da expressão de fatores sigma ECF por CpxR já foi demonstrada (Miticka et al., 2003; de Wulf et al., 2002). Estes resultados sugerem que CpxR possa estar envolvido na ativação da transcrição de *sigU* por estresse osmótico, choque térmico e pela entrada na fase estacionária.

A atividade do promotor de *sigU* foi também analisada na cepa mutante em *sigF*, SG16, com o objetivo de confirmar os resultados obtidos nos ensaios de extensão de oligonucleotídeo. Entretanto, não foram verificadas diferenças na atividade deste promotor em nenhuma das fases do crescimento na cepa SG16 (dados não mostrados). Verifica-se pelos resultados dos ensaios de extensão de oligonucleotídeo que o sinal correspondente à transcrição possivelmente mediada por *sigF* (P2) é menos intenso em relação ao sinal dependente de P1. Além disto, observa-se um aumento na transcrição a partir de P1 na cepa mutante SG16 durante a fase estacionária. Assim, a regulação mediada por *sigF* pode ser bastante sutil e estar sendo de certa forma compensada pelo aumento na atividade do promotor P1, o que justificaria a dificuldade em se observar as variações na atividade de β -galactosidase na cepa SG16, uma vez que este ensaio é indireto e menos sensível que o ensaio de extensão de oligonucleotídeo.

Figura 23: Indução de *sigU* em resposta a estresse salino e choque térmico extremo e determinação do sítio de início de transcrição do gene. **A)** Análise dos níveis de mRNA de *sigU* na fase exponencial e em resposta a NaCl e choque térmico extremo em ensaios de RT-PCR semi-quantitativo. Amostras de RNA foram obtidas de culturas de fase exponencial antes e após os tratamentos a 48°C por 15 min ou adição de 85 mM de NaCl por 1h. As reações foram realizadas com 500 ng de RNA, 25 ciclos de amplificação e com temperatura de hibridização de 68°C. As reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% sendo posteriormente corado com brometo de etídio para visualização das bandas sob luz UV. A banda correspondente ao produto de 400 pb está indicada pela seta. A canaleta indicada por “-RT” se refere à reação realizada na ausência de transcriptase reversa. **B)** Ensaios de extensão de oligonucleotídeo para a determinação do início de transcrição de *sigU*. Amostras de RNA foram obtidas de culturas das cepas NA1000 e SG16 durante a fase exponencial (4 h de crescimento) e estacionária (24 h). As amostras de RNA da cepa NA1000 submetida a choque térmico extremo e estresse salino foram obtidas conforme descrito em (A). As bandas correspondentes aos 2 inícios de transcrição estão indicadas por “P1” e “P2”. EXP = amostras de fase exponencial; CT = tratamento a 48° por 15 min; OSM = tratamento com 85 mM de NaCl por 1h.; EST = amostras de fase estacionária. O oligonucleotídeo usado na reação de extensão é complementar à sequência sublinhada. Reações de sequenciamento usando o DNA do fago M13 como molde e o oligonucleotídeo universal -40 foram utilizadas como padrão de tamanho do fragmento de extensão e estão apresentadas à esquerda da figura. Abaixo da figura está representada a sequência da região a 5' de *sigU*. O códon de início de tradução e a sequência “Shine-Dalgarno” (SD) estão indicados em cinza e itálico. Os potenciais sítios de ligação de CpxR estão circulados e o potencial promotor P2, do tipo σ^F , está indicado por retângulos. O promotor do tipo σ^{70} (P1) está sublinhado e em negrito. **C)** Alinhamento das potenciais regiões regulatórias encontradas a 5' do início de transcrição de *sigU* com os consensos conhecidos. CpxRcon: consenso de ligação de CpxR em *E.coli*; S = C ou G; N = qualquer nucleotídeo; W = A ou T. Os nucleotídeos idênticos aos consensos estão em negrito.

+1/1—GGTTCAAACA^{-35/2}TGGGTGAG^{-35/1}TTTGAGATAACT^{-10/2}TGGTTTCCGAACGGT^{-10/1}GTCCG^{+1/2}

AACCCGCCGCCTATCCACAACCTTGAGGGCGGTTTTCCCCGGTTTGGGGAGG

ACGGGGCGCCGGAAGGACGACGCTCTCCCCGGCCGCCATTTGACCCTCCCC

CCCCCATGGAACCTTCGCCGCTGCGGGCCGTTGTTAAGGTCGCCGAGGAGGC

GCCCAGATGGACCAGCAGACTC

SD

C)

P1: TTGAGAT (10) CCGAACGG

σ^{70} (*C. crescentus*): TTG a CgS (10-14) GC tANAWC

P2: CAAACA (16) TAACT

sigF: GTAACC (17) GAACT

CpxR: GTGA (8) ATAA

CpxRcon: GTAA (6-7) GTAA

A atividade do promotor de *sigU* durante o crescimento e em resposta a choque hiperosmótico também foi analisada nas cepas mutantes nos genes *sigL*, *sigM* e *sigN*, comparando-se aos resultados obtidos na cepa NA1000. Não foram observadas diferenças na atividade do promotor e em sua indução por choque osmótico e pela entrada na fase estacionária em nenhuma das cepas testadas.

4.3.2) Obtenção e Caracterização da Cepa Mutante em *sigU*

Com o estudo da regulação transcricional de *sigU* durante o crescimento e em resposta a estresses observou-se várias características interessantes, sugerindo que este gene exerça funções importantes para a fisiologia de *C. crescentus*. Assim, tornou-se fundamental a obtenção de um mutante neste gene, o que nos possibilitaria investigar melhor o seu papel.

Este mutante foi obtido pela inserção de um cassete de resistência a espectinomicina no interior da região codificadora de *sigU*. Neste caso, não haveria possibilidade da ocorrência de efeitos de polaridade, uma vez que o gene não está organizado em operon com outros genes (figura 4). Assim, foi obtida a construção pCM61, contendo o cassete de resistência a espectinomicina inserido em um sítio de *StuI* no interior do gene no vetor pNTPS138. O plasmídeo pCM61 foi transferido para *C. crescentus* e os clones que sofreram a primeira recombinação, contendo a cópia interrompida do gene e o plasmídeo pNPTS integrados no cromossomo, foram selecionados (resistentes a canamicina e espectinomicina). A primeira recombinação foi confirmada por "Southern-blot" e todos os clones obtidos sofreram a recombinação a 5' do cassete de espectinomicina (Figuras 24 e 25).

Em seguida, foi selecionado o segundo evento de recombinação, que leva à perda das regiões plasmidiais e da cópia funcional do gene *sigU* do cromossomo (figura 24). Os recombinantes foram selecionados pela resistência a espectinomicina e a sacarose (perda do

gene *sacB*) e sensibilidade a canamicina. Desta forma, 3 clones mutantes foram obtidos e 1 deles foi selecionado para análises posteriores, sendo denominado SG546 (figura 25).

Figura 24: Esquema dos eventos de recombinação que ocorreram na cepa NA1000 após a transferência da construção pCM61. A) O esquema descreve as duas possibilidades de ocorrência da primeira recombinação: a 3' (1) ou 5' (2) do sítio de inserção do cassete. O tamanho esperado dos produtos da digestão *ApaI*/*AatII*, enzimas utilizadas para a confirmação dos eventos de recombinação por "Southern-blot", estão indicados para cada caso. A linha pontilhada verde indica a região complementar à sonda utilizada para os experimentos de "Southern-blot" demonstrados na figura 25. B) Produto esperado após o segundo evento de recombinação, confirmado por "Southern-blot" utilizando as enzimas *XbaI* / *SphI*.

Figura 25: Análise por “Southern-blot” do DNA genômico de colônias selecionadas para a confirmação do 1º (A) e 2º (B) eventos de recombinação e obtenção da cepa mutante em *sigU*. As amostras de DNA foram digeridas com *ApaI/AatII* em (A) e *XbaI/SphI* em (B) e submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,8%. As setas à esquerda das figuras mostram o tamanho dos produtos de interesse. Os clones selecionados estão indicados por setas acima da canaleta. Em (B), os tamanhos dos fragmentos do marcador de tamanho molecular utilizado (“1 kb DNA ladder” – Invitrogen) estão indicados à direita da figura.

Esta linhagem mutante foi analisada quanto ao crescimento em condições fisiológicas e não foram observadas diferenças em sua morfologia, taxa de crescimento (DO_{600nm}) ou viabilidade a 30°C quando comparada à cepa NA1000. Esta cepa também foi caracterizada quanto à adaptação ao cultivo por períodos prolongados a 30°C (até 15 dias) e apresentou as mesmas características da cepa parental. Testes de viabilidade a alguns estresses ambientais também foram realizados e não foram verificadas diferenças quanto à resposta a choque térmico extremo (48°C), estresse oxidativo (2,5 mM de H_2O_2 na fase exponencial e 15 mM na fase estacionária), pH ácido (4,0) e alcalino (9,5), na comparação a cepa NA1000. Da mesma

forma, curvas de crescimento na presença de NaCl ou sacarose não demonstraram diferenças na resposta da cepa mutante a este estresse (figura 26). A resposta a estresse osmótico foi também analisada em curvas de viabilidade (determinação do número de unidades formadoras de colônia / ml) ao longo do crescimento, testando-se as concentrações de 85 e 128 mM de NaCl e a cepa SG546 não apresentou viabilidade reduzida nestas condições (não mostrado).

Assim, apesar dos resultados da análise da expressão de *sigU* indicarem um papel deste gene na resposta a choque térmico, estresse osmótico e à fase estacionária, *sigU* não é essencial para a resistência a estes estresses nas condições testadas.

Figura 26: O gene *sigU* não é essencial para a resistência a estresse salino e osmótico. O gráfico mostra os resultados de curvas de crescimento das cepas NA1000 e SG546. As culturas foram diluídas para $DO_{600nm} = 0,05$ e após crescimento por 2 h, estas foram subdivididas, adicionando-se uma concentração final de 85 mM de NaCl ou 180 mM de sacarose em cada frasco, mantendo-se também uma alíquota não tratada.

Com o objetivo de testar se o gene *sigU* é autorregulado positivamente, a construção pRB72 (fusão de transcrição do promotor de *sigU* ao gene *lacZ*) foi transferida para a cepa SG546 e ensaios de β -galactosidase foram realizados, comparando-se com a atividade do promotor na cepa NA1000. Não foram observadas diferenças na atividade do promotor durante a fase exponencial e em sua indução pela entrada na fase estacionária, indicando que não há autorregulação na expressão de *sigU* (não mostrado).

4.3.3) Análise dos Níveis da Proteína SigU

Com o objetivo de analisar se o aumento na atividade transcricional de *sigU* verificada em várias condições se reflete em um aumento nos níveis da proteína, um anticorpo policlonal anti-SigU foi obtido. Para isso, foi feita inicialmente a construção pCM62, contendo uma fusão de tradução da região codificadora de *sigU* a uma cauda de 6 histidinas no vetor de expressão pPROEX. A expressão da proteína foi induzida em *E.coli* e, após a análise dos extratos, verificou-se que a proteína de fusão encontra-se na fração insolúvel, em corpos de inclusão. O mesmo ocorreu durante a expressão da proteína SigF para a obtenção de anticorpos e parece ser uma característica comum a fatores sigma procarióticos, uma vez que tem sido descrito em vários casos, inclusive para outros fatores ECF (Marshak et al., 1996; Browning et al., 2003).

O anti-soro obtido foi então testado em extratos de proteína total das cepas NA1000 e SG546. Não foi possível detectar a presença da proteína durante a fase exponencial na ausência de estresses específicos, desta forma, os testes do anti-soro foram realizados em condições que poderiam levar a um aumento nos níveis da proteína, por promoverem a indução da transcrição do gene. Assim, utilizou-se extratos de culturas tratadas com NaCl e culturas de fase estacionária e a banda correspondente a SigU foi identificada por estar ausente na cepa SG546. A massa molecular aparente da banda identificada é de

aproximadamente 20 kDa (figura 27), bastante próxima à predita por sua sequência de aminoácidos (21 kDa). Os níveis da proteína SigU durante o crescimento exponencial e o seu acúmulo em resposta à fase estacionária, choque osmótico e choque térmico foram então analisados através de ensaios de “Western-blot”.

Os resultados obtidos demonstram um aumento nos níveis de SigU em resposta a estresse osmótico pela adição de NaCl ou sacarose, porém, a resposta aos dois agentes foi distinta, sendo também diferente da resposta em nível transcricional. Assim, o acúmulo de SigU já pode ser observado a partir de 2 h de tratamento na presença de NaCl, porém, os níveis da proteína permanecem estáveis nos tempos subsequentes de tratamento, não havendo um acúmulo progressivo em tempos prolongados (figura 27A), diferentemente do observado pela atividade do promotor do gene nos ensaios de β -galactosidase (figura 22B). Além disto, um aumento dos níveis de SigU pela presença de sacarose começa a ser observado de forma muito sutil apenas a partir de 4 h, porém, ocorre um aumento muito drástico no intervalo entre 4 e 6 h de crescimento (figura 27B). Estes resultados sugerem que a expressão de *sigU* possa apresentar também uma regulação pós-transcricional em resposta a estresse osmótico e este mecanismo parece ser distinto entre os dois tratamentos testados (NaCl e sacarose).

A análise dos níveis de SigU em função do crescimento da cultura demonstraram um perfil bastante similar ao observado pela análise da atividade do promotor do gene *sigU* (figura 22A). Assim, os resultados apresentados na figura 27C mostram um aumento nos níveis da proteína após 12 h de crescimento, níveis estes que seguem aumentando até 24 h. Esta alta correlação entre a atividade transcricional e os níveis da proteína indica que a regulação da expressão de *sigU* em resposta à fase estacionária deve ocorrer principalmente em nível transcricional na linhagem NA1000.

Uma vez que os resultados de ensaios de determinação do início de transcrição sugeriram um papel de SigF na regulação da expressão de *sigU*, os níveis da proteína também

foram analisados durante a fase estacionária nas cepas mutantes em *sigF*, SG16 e SG477. Os resultados obtidos mostram uma queda drástica nos níveis de SigU nas cepas mutantes em *sigF* após 24 h de crescimento, sem afetar os níveis de SigU nas células de 12 h (figura 27C). A ausência da proteína SigU nas células de 24 h não está de acordo com os dados de início de transcrição no mutante em *sigF*, onde não se observou queda nos níveis do transcrito a partir de P1.

Foi possível também verificar um aumento nos níveis de SigU em resposta a choque térmico extremo. Os níveis de SigU estão aumentados já aos 5 minutos de choque térmico a 48°C e permanecem altos mesmo após 45 minutos nesta temperatura (figura 27D).

Figura 27: Análise dos níveis da proteína SigU em condições que induzem a transcrição do gene por ensaios de “Western-blot”. **A)** Aumento dos níveis de SigU em resposta a estresse salino. Extratos proteicos da cepa NA1000 foram obtidos a partir de alíquotas retiradas nos tempos indicados de crescimento na presença (+) ou ausência (-) de 85 mM de NaCl. **B)** Análise dos níveis de SigU durante o crescimento na ausência (-) ou presença (+) de 150 mM de sacarose. **C)** Extratos protéicos da cepa NA1000 foram obtidos após 4, 12 e 24 h de crescimento, conforme indicado acima de cada canaleta. Simultaneamente, foram obtidos extratos das cepas mutantes em *sigF*, SG16 e SG447, após o crescimento por 12 e 24 h a 30°C, para a comparação dos níveis de SigU em relação à cepa parental NA1000. **D)** Determinação dos níveis de SigU em resposta a choque térmico extremo. Culturas da cepa parental em fase exponencial foram incubadas a 48°C e alíquotas foram retiradas para o preparo dos extratos protéicos nos tempos indicados. Nos experimentos das figuras (A), (B) e (C), extratos da cepa mutante em *sigU*, SG546, foram utilizados como controle negativo, conforme indicado em cada figura. A seta indica a banda correspondente a SigU em cada uma das figuras.

5) DISCUSSÃO

5.1) Caracterização de Cepas Mutantes em Fatores ECF: Sobreposição Funcional

Este trabalho descreve o estudo de cinco genes que codificam homólogos a fatores sigma ECF em *C. crescentus*. O objetivo inicial foi identificar a função destes genes a partir da análise dos fenótipos das cepas mutantes e da identificação de condições que promovem aumento na expressão destes genes. Desta forma, foi realizada uma caracterização exaustiva das cepas mutantes em cada um dos cinco fatores ECF em estudo, a partir do tratamento com uma série de estresses ambientais e os resultados obtidos demonstraram fenótipos sutis ou em condições muito específicas para os mutantes em *sigL*, *sigM* e *sigF*. Além disto, os mutantes em *sigN* e *sigU* não apresentaram fenótipos distintos em comparação à cepa parental nas condições testadas. Esta dificuldade na identificação de fenótipos resultantes da ausência dos fatores sigma pode indicar uma redundância funcional entre os fatores ECF em *C. crescentus*. Assim, a ausência de um fator sigma poderia estar sendo compensada por algum dos outros ECF. Alternativamente, estes fatores sigma podem atuar apenas em condições muito específicas, regulando um grupo limitado de genes, como verificado para o fator σ^F , que se mostrou essencial apenas durante o estresse oxidativo gerado por altas concentrações de H_2O_2 e durante fase estacionária.

A presença de alterações fenotípicas sutis resultantes de mutações em fatores sigma ECF também foi verificada em *B. subtilis*, que possui 7 proteínas desta família, e a caracterização destes fatores tem se baseado principalmente na busca em larga escala de potenciais genes-alvo, utilizando seqüências consenso por eles reconhecidas (revisado em Helmann, 2002). Através destas análises verificou-se a ocorrência de sobreposição entre regulons de fatores ECF distintos, uma vez que muitos promotores são reconhecidos por mais de um fator ECF. Este tipo de sobreposição foi verificado entre os regulons de σ^X , σ^W e σ^M

(Huang et al., 1998; Thackray & Moir, 2003). No caso de σ^X e σ^W , verificou-se que há uma diferença temporal na regulação por estes fatores, assim, σ^X atua na fase exponencial tardia, enquanto a expressão gênica dependente de σ^W ocorre durante o início da fase estacionária (Huang et al., 1998; Huang & Helmann, 1998). Além disso, os dois regulons respondem a sinais distintos havendo, porém, alguma sobreposição. Assim, ambos são ativados por antibióticos que atingem a parede celular, porém, antibióticos distintos induzem preferencialmente um dos dois regulons, enquanto outros induzem os dois igualmente. Estes resultados ilustram de forma bastante clara o papel de fatores ECF em condições muito específicas de crescimento e sugerem que, apesar da sobreposição de funções, não há uma redundância funcional completa. Entretanto, a caracterização dos regulons de σ^X e σ^W também indica a ocorrência de sinalização cruzada entre os dois. Assim, verificou-se que a expressão de *sigW* é induzida na cepa mutante em *sigX* durante a fase exponencial tardia e, além disto, a expressão de genes dependentes de σ^X está aumentada na cepa mutante em *sigW* (Huang et al., 1998; Huang & Helmann, 1998). Este tipo de regulação poderia também compensar a falta de um dos genes pelo aumento na expressão do outro.

A sobreposição entre regulons de fatores ECF distintos também foi observada durante a caracterização de cepas mutantes em *sigH* e *sigE* em *M.tuberculosis*. Assim, verificou-se que ambos estão envolvidos na regulação do fator de resposta global a estresses σ^B (Manganelli et al., 2001, 2002; Raman et al 2001). Assim como observado em *B. subtilis*, estes dois fatores sobrepõem-se na regulação de *sigB* em resposta a estresse oxidativo, possuindo, porém, algumas funções exclusivas. Assim, σ^E é responsável pela expressão de *sigB* em condições fisiológicas e após estresses na superfície celular, enquanto σ^H induz a transcrição de *sigB* após o choque térmico (Manganelli et al., 2002). Uma vez que o genoma de *M. tuberculosis* também possui um grande número de genes codificando fatores ECF (10 no

total), a sobreposição entre regulons de fatores ECF distintos parece ser comum em bactérias que possuem vários fatores desta subfamília.

Neste sentido, é interessante destacar que, a partir da análise filogenética dos 13 fatores ECF de *C. crescentus*, foi sugerido que alguns destes genes possam ter surgido por duplicação gênica nesta bactéria (Mittenhuber, 2002). Dentre eles os genes *sigU* e *sigT*, que apresentam 69,8% de similaridade (63,5% de identidade), determinada a partir do alinhamento global entre as duas proteínas (programa GAP, pacote de programas GCG). Verifica-se que esta similaridade é bastante alta nas regiões conservadas 2.4 e 4.2, responsáveis pelo reconhecimento das seqüências promotoras -10 e -35 (figura 28), o que sugere que estes fatores sigma apresentem afinidade por seqüências promotoras semelhantes. Além disso, estes genes também apresentam algumas características comuns: ambos são regulados durante o ciclo celular, sendo expressos durante a transição da célula móvel para célula talo e estão organizados próximos a genes que codificam proteínas histidina-quinases (Laub et al., 2000). Os resultados obtidos neste trabalho sugerem um papel de *sigU* na resposta a estresse osmótico, fase estacionária e choque térmico, porém, este gene não se mostrou essencial nestas condições, uma vez que a cepa mutante em *sigU* não apresenta sensibilidade aumentada a estes tratamentos. Estes dados sugerem que *sigU* deve regular um conjunto limitado de genes em resposta a estas condições, podendo haver também sobreposição de funções com o gene *sigT*.

estar envolvidos na regulação de funções extracitoplasmáticas em resposta a este estresse, enquanto o fator σ^{32} seria responsável pela resposta citoplasmática (Erickson & Gross, 1989; Wang & Kaguni, 1989).

5.2) Papel de SigF na Regulação da Expressão Gênica durante a Fase Estacionária

A caracterização de cepas mutantes em *sigF* mostrou um fenótipo exacerbado durante a fase estacionária na cepa mutante por inserção de um cassete de resistência a antibiótico, SG447, não verificado na cepa mutante por deleção, SG16. Foi possível demonstrar um efeito polar sobre o gene localizado a 3' de *sigF* (CC3252) pela inserção do cassete, uma vez que houve um aumento bastante significativo na expressão deste gene nesta cepa. Este aumento pode ser decorrente da expressão do gene CC3252 a partir de um promotor contido no cassete, e, neste caso, o sinal de terminação de transcrição do cassete não estaria sendo funcional. O gene CC3252 codifica uma proteína de membrana citoplasmática (6 domínios transmembrana) conservada em outras α -proteobactérias, nas quais o gene homólogo a CC3252 também se encontra em um possível operon com um fator ECF homólogo a *sigF*. Estas características sugerem fortemente que este gene codifique o fator anti-sigma envolvido na regulação da atividade de *sigF*. Este gene não apresenta similaridade significativa aos fatores anti-sigma MucA e RseA de *P. aeruginosa* e *E. coli*, respectivamente, porém, não foi verificada uma alta conservação entre fatores anti-sigma ECF de bactérias mais distantes filogeneticamente, não sendo encontrados domínios característicos destes fatores. Assim, verificou-se que o fator anti-sigma ECF CarR de *M. xanthus* não apresenta similaridade de sequência ao fator MucA de *P. aeruginosa* (Schurr et al., 1996). Desta forma, os resultados sugerem que a superexpressão do provável fator anti-sigma codificado por CC3252 pode promover uma associação indesejada ou desregulada deste anti-sigma a outro fator ECF de *C. crescentus*. Esta associação causaria a inativação do fator sigma em questão, o que estaria

dando origem aos fenótipos de sensibilidade a longos períodos em cultura e a choque térmico durante a fase estacionária observados apenas na cepa SG447. Um efeito similar foi descrito por Takano e cols (2003) durante a caracterização do fator σ^H de *Streptomyces griseus*. Verificou-se que a superexpressão do fator anti-sigma RshA dá origem a fenótipos mais exacerbados em comparação àqueles observados na cepa mutante no fator σ^H , por ele regulado. Foi demonstrado através de ensaios de duplo híbrido que este fator anti-sigma também é capaz de se associar a dois outros da mesma família de σ^H (σ^L e σ^F) em *S. griseus*, o que estaria causando fenótipos distintos após a superexpressão deste anti-sigma (Takano et al., 2003).

Por outro lado, os resultados obtidos demonstram que a ausência de *sigF* promove uma sensibilidade aumentada ao tratamento com altas concentrações de H_2O_2 durante a fase estacionária de crescimento. A análise da expressão do gene em resposta a estresse oxidativo, porém, não demonstrou indução em nível transcricional ou pós-transcricional, enquanto verificou-se um aumento nos níveis da proteína pela entrada na fase estacionária. Um resultado semelhante foi obtido por Testerman e cols (2002), durante a caracterização de σ^E de *S. typhimurium*. Nesta bactéria, a ausência de σ^E é responsável por uma grande sensibilidade a vários agentes causadores de estresse oxidativo durante a fase estacionária e verificou-se uma indução nos níveis do RNAm que codifica este fator σ em resposta a entrada nesta fase do crescimento, não havendo indução por estresse oxidativo (Testerman et al., 2002). Assim, os resultados obtidos indicam que a expressão aumentada de *sigF* é uma das respostas de *C. crescentus* à entrada na fase estacionária.

A resposta à fase estacionária de crescimento em bactérias caracteriza-se pela indução de uma série de genes envolvidos na resistência a estresses (Jenkins et al., 1988; Hengge-Aronis, 2000; Nystrom, 2004). Entretanto, tem sido sugerido que o principal estresse causado pela entrada na fase estacionária é o acúmulo de proteínas oxidadas e que um número

significativo de genes e regulons induzidos nesta fase do crescimento está envolvido na defesa contra estresse oxidativo (Nystrom, 2004). Neste sentido, foi demonstrado que a morte celular de culturas de *E.coli* durante os primeiros 10 dias em cultura pode ser completamente evitada pela omissão do oxigênio (Dukan & Nystrom, 1999). Estudos recentes sugerem que o aumento nos níveis de proteínas oxidadas durante a fase estacionária está relacionado a uma maior taxa de erros na tradução das proteínas durante esta fase, decorrente da falta de tRNAs carregados durante a carência nutricional (Nystrom, 2004). Estas proteínas aberrantes são mais suscetíveis à oxidação, possivelmente devido à exposição de sítios mais sensíveis pelo seu enovelamento incorreto (Nystrom, 2004).

Desta forma, a indução de σ^F em resposta à fase estacionária pode ser explicada pelo seu papel na regulação de genes de defesa a estresse oxidativo, demonstrado através do fenótipo da cepa mutante em *sigF* e dos resultados de ensaios de “microarray”. Dois genes envolvidos na resposta a estresse oxidativo durante a fase estacionária na cepa mutante em *sigF* foram identificados neste trabalho, sendo eles *msrA* e *sodA*.

O gene *sodA* codifica a enzima (Mn^{2+})-superóxido dismutase, importante para a resposta ao acúmulo de $O_2^{\bullet-}$. Esta enzima também está envolvida na resposta a H_2O_2 , uma vez que o acúmulo de radical $O_2^{\bullet-}$ promove um aumento nos níveis de íons Fe livres, que reagem com H_2O_2 na reação de Fenton, dando origem ao radical hidroxila, altamente reativo com macromoléculas (Imlay & Linn, 1987; Jakubovics et al., 2002; Poyart et al., 2001; Touati, 2000). Em *E.coli* os níveis de SodA são bastante aumentados após a entrada na fase estacionária e o mutante duplo em *sodA* e *sodB*, que codifica a outra superóxido dismutase citoplasmática (dependente de Fe), apresenta um nível bastante aumentado de proteínas oxidadas nesta fase do crescimento (Dukan & Nystrom, 1999). Da mesma forma, a cepa mutante no gene *sodA* de *S. aureus* apresenta sensibilidade aumentada a agentes geradores de ânion superóxido apenas durante a fase estacionária (Clements et al., 1999). Entretanto, a

análise realizada neste trabalho mostra que o gene *sodA* de *C. crescentus* tem sua expressão bastante reduzida durante a fase estacionária, ao contrário de seu homólogo em *E.coli*. Assim, a atividade desta enzima deve ser mais importante durante a fase exponencial de crescimento. Verificou-se também que a regulação de *sodA* é dependente de *sigF* apenas durante a entrada na fase estacionária (12 h), não havendo diferenças de expressão após 24 h de crescimento. A expressão aumentada deste gene na cepa mutante após 24 h deve ser decorrente de uma regulação mediada por outro fator σ , que pode ter sua atividade aumentada devido a efeitos diretos ou secundários da ausência de σ^F . Este tipo de regulação temporal diferencial foi verificada durante a identificação do regulon de σ^R de *S. coelicolor* (Paget et al., 2001). Assim, a expressão reduzida de *sodA* pode ser uma das causas da maior sensibilidade a H_2O_2 da cepa SG16 após 12 h de crescimento, mas não parece ser a principal, uma vez que esta cepa também é mais sensível a este tratamento após 24 h de crescimento, fase em que a expressão deste gene não está afetada.

A sensibilidade aumentada a H_2O_2 da cepa mutante em *sigF* deve ser decorrente principalmente da queda na expressão de *msrA* (CC1039), que codifica a enzima metionina-sulfóxido-redutase, responsável pelo reparo de resíduos de metionina oxidados em proteínas. Conforme citado anteriormente, este gene está envolvido na resistência a H_2O_2 em vários organismos, como *E.coli*, leveduras e *S. aureus* (Moskovitz et al., 1995; Moskovitz et al., 1997; Singh et al., 2001; St. John et al., 2001). Entretanto, este gene também tem sua expressão afetada na cepa SG16 durante a fase exponencial, período no qual esta cepa não apresenta sensibilidade aumentada ao estresse oxidativo. *C. crescentus* possui outro gene que codifica a proteína MsrA, denominado CC0994 (possui 41% de similaridade ao gene CC1039). Assim, a proteína codificada pelo gene CC0994 poderia ser importante para a resposta a este estresse durante a fase exponencial, enquanto o gene CC1039 seria essencial durante a fase estacionária. Apesar disto, os resultados obtidos não demonstraram indução na

expressão deste gene em nível transcricional durante a fase estacionária. Alternativamente, os outros genes identificados em nossa análise, que codificam proteínas com funções não determinadas até o momento podem também ser importantes para a viabilidade da célula frente ao estresse oxidativo durante a fase estacionária, juntamente com *msrA*.

O gene CC3255 mostrou uma alta queda de expressão na cepa SG16 nos tempos de 12 e 24 h de crescimento por ensaios de “microarray”. Porém, a variação em 12 h de crescimento não se confirmou em ensaios de RT-PCR semiquantitativo, apesar de ter sido observada nos tempos de 4 e 24 h de crescimento. Este gene apresenta alta identidade de sequência com o gene CC2906 (58,3% de identidade na sequência de nucleotídeos e 44% de identidade na sequência de aminoácidos), que também apresentou queda de expressão na cepa SG16 em 12 e 24 h de crescimento em experimentos de “microarray”. Uma das possibilidades para explicar esta discrepância seria a ocorrência de hibridização cruzada entre os cDNAs e os oligonucleotídeos específicos para cada um dos genes durante os ensaios de “microarray”. A análise da sequência do oligonucleotídeo utilizado no “chip” de DNA para o gene CC3255 mostra que há a hibridização perfeita de 29 dos 50 nucleotídeos do oligo com a sequência do gene CC2906. Da mesma forma, o oligo usado para o gene CC2906 possui identidade de 60% com a sequência do gene CC3255. Assim, uma hibridização cruzada poderia dificultar a análise dos resultados. Por outro lado, existe a possibilidade de variações na réplica biológica de 12 h utilizada para o RT-PCR semiquantitativo, que foi distinta da usada nos ensaios de “microarray”. De qualquer forma, os resultados utilizando culturas de 4 e 24 h de crescimento demonstram claramente que o gene é regulado por *sigF*.

Os resultados de “microarray” de DNA mostraram queda na expressão de oito genes na cepa SG16, três deles confirmados por RT-PCR. Este resultado reflete o papel dos fatores ECF na regulação de pequenos regulons e em condições muito específicas, conforme sugerido anteriormente. Por outro lado, σ^F pode estar envolvido na regulação de outros genes não

identificados neste trabalho devido à condição escolhida para a realização dos ensaios. Além disto, os resultados de “microarray” e de RT-PCR semi-quantitativo mostraram que a ausência de *sigF* não leva à perda total da expressão dos genes analisados, o que indica que estes genes também são regulados por outros fatores σ , capazes de reconhecer outros promotores ou o mesmo promotor reconhecido por σ^F . Este efeito limitado da ausência de um fator sigma ECF sobre a expressão gênica também foi verificado durante a identificação dos regulons de σ^R de *S. coelicolor* e σ^X de *B. subtilis* (Paget et al., 2001; Huang & Helmann, 1998). Assim, muitos genes regulados por σ^F podem apresentar variações sutis de expressão, que não seriam detectadas nos ensaios de “microarray”.

Uma vez que fatores sigma ECF estão envolvidos na regulação de genes cujos produtos atuam no compartimento extracitoplasmático da célula, foi realizada uma análise da presença de domínios transmembrana nas proteínas codificadas pelos genes regulados por *sigF* e de suas prováveis localizações celulares, utilizando o programa PSORT (<http://psort.nibb.ac.jp>). Dentre os oito genes identificados nos ensaios de “microarray” de DNA, três deles codificam proteínas que possivelmente estão localizadas no espaço periplasmático, devido à identificação de seqüências sinais em suas regiões amino-terminais, sendo eles os genes de resposta a estresse oxidativo *msrA* e *sodA* e o gene CC1775. Além disso, os genes CC3257 e CC3572 codificam proteínas com potenciais domínios transmembrana, o que indica que estas proteínas localizem-se na membrana interna. Apenas os produtos dos genes CC3255, CC2906 e CC1839 apresentaram maior possibilidade de localização citoplasmática. Estes dados sugerem que σ^F está envolvido principalmente na regulação de funções extracitoplasmáticas, conforme tem sido descrito para a maioria dos fatores ECF já caracterizados.

Com o objetivo de identificar um promotor consenso nos genes regulados por σ^F , foi realizada uma busca por seqüências similares à região -35 encontrada no promotor de *sigF*,

uma vez que foi demonstrado que σ^F é capaz de autorregular positivamente sua expressão. Utilizou-se o programa FINDPATTERNS (pacote de programas GCG) para a análise da sequência localizada a uma distância de até 400 pb a 5' do início de tradução dos genes, permitindo-se uma variação de até 2 bases na sequência -35 encontrada no promotor de *sigF*. Sequências similares à região -35 de *sigF* foram identificadas nas prováveis regiões promotoras de alguns dos genes e em alguns casos foi possível também encontrar regiões com similaridade à sequência -10 (figura 29), sendo possível sugerir um consenso para o reconhecimento por σ^F . Em alguns casos, porém, estas sequências estão bastante distantes do início de tradução. Assim, esta análise é bastante preliminar e, para que um consenso seja determinado com maior confiabilidade seria necessário identificar o início de transcrição de alguns destes genes.

Gene	Potenciais regiões -35 e -10
<i>sigF</i>	GTAACC-17-GAACT
<i>msrA</i>	GTAACC-17-TATCT (-57) GTCACC-18-GCCCT (-273)
<i>sodA</i>	GGAACG-18-GTCGT (-147) GCAACG-14-TACCT (-341)
CC2906	GTCACC-15-GCCCT (-372)
CC3255	CTAACG-17-TCGCT (-80)
CC3572	GTCACC-16-AGGCT (-273) GCTACC-16-GGACT (-188) ATGACC-15-CTGCT (-180)
<i>sigU</i>	CAAACA-16-TAACT (-207)
consenso	G/CTAAC C /G-(15-18) G/TNNCT

Figura 29: Alinhamento de regiões com similaridade ao promotor de *sigF* nas potenciais regiões regulatórias dos genes identificados como controlados por este fator sigma em ensaios e “microarray”. Os números em parênteses indicam a posição do primeiro nucleotídeo da sequência em relação ao códon iniciador da tradução inferido pela anotação TIGR. Abaixo do alinhamento está indicada a sequência consenso sugerida. As letras maiores representam os nucleotídeos conservados em todas as sequências encontradas. Os nucleotídeos idênticos em relação à sequência de *sigF* estão em negrito.

5.3) Regulação da Expressão de *sigF*

Durante o trabalho foi possível também analisar a regulação da expressão de *sigF* e algumas características interessantes foram verificadas. Foi observado que a indução do gene após choque térmico extremo ocorre por autorregulação positiva de sua expressão, e verificou-se também que a super-expressão de *sigF* promove a indução da atividade de seu promotor, o que confirma sua autorregulação. Uma vez que este promotor apresenta níveis basais de expressão na cepa parental em condições fisiológicas, não foi possível analisar a queda na sua atividade nas cepas mutantes em *sigF*. Entretanto, os resultados obtidos mostram que a autorregulação positiva de *sigF* não ocorre durante a fase estacionária, pois o aumento nos níveis da proteína não se reflete em uma indução da transcrição do gene nesta fase do crescimento.

Este resultado sugere uma seletividade distinta do promotor de *sigF* na fase estacionária, o que pode ocorrer devido a variações na topologia do DNA, na concentração de sais ou na presença de outros ativadores ou repressores, que podem favorecer ou inibir a associação de uma determinada forma da holoenzima ao promotor. O efeito positivo ou negativo destes vários agentes varia de acordo com o contexto de cada promotor e tem sido bastante estudado em promotores dependentes de σ^S , que muitas vezes também podem ser reconhecidos por σ^{70} . Assim, foi demonstrado que a presença de altas concentrações de sais de glutamato favorece a transcrição de alguns destes promotores por σ^S , em detrimento de σ^{70} (Kim et al., 2004). Além disto, proteínas “histone-like”, como H-NS e Lrp, podem ter um efeito repressor ou ativador da transcrição mediada por σ^S , dependendo do promotor em questão (Hengge-Aronis, 2002). Assim, variações em algumas destas condições pela transição entre as fases de crescimento podem reduzir a capacidade de σ^F de induzir sua transcrição na fase estacionária. Um mecanismo similar foi observado para o fator σ^R de *S. ambifaciens*, que

é capaz de autorregular positivamente sua expressão apenas durante a fase estacionária de crescimento (Roth et al., 2004). Este mecanismo seria benéfico durante a fase estacionária, por impedir o aumento dos níveis do anti-sigma, que possivelmente é codificado pelo gene CC3252, localizado provavelmente no mesmo operon de *sigF*, o que levaria ao silenciamento da resposta.

Os resultados obtidos mostram também que o fator σ^F é regulado em nível pós-transcricional durante a fase estacionária, pelo aumento em sua taxa de tradução ou na maior estabilidade da proteína. Da mesma forma, o aumento nos níveis de σ^S durante a fase estacionária em *E.coli* ocorre principalmente por mecanismos pós-transcricionais de regulação, havendo um aumento na taxa de tradução na fase exponencial tardia e a estabilização da proteína durante a fase estacionária (Hengge-Aronis, 2000). Um mecanismo similar ainda não foi descrito para fatores sigma ECF, que, em geral, são autorregulados em nível transcricional e têm sua atividade regulada pelo fator anti-sigma. Entretanto, em *B. subtilis*, observou-se um aumento em vários promotores dependentes de σ^W na cepa mutante na protease *ftsH* devido ao aumento nos níveis de σ^W (Zellmeier et al., 2003). No entanto, um efeito direto de FtsH sobre a estabilidade de σ^W não foi demonstrado. FtsH é uma protease de membrana interna, responsável pela degradação de σ^{32} em *C. crescentus* e cepas mutantes nesta protease apresentam sensibilidade a choque térmico, sal e viabilidade reduzida durante a fase estacionária (Fischer et al., 2002). Seria importante analisar, portanto, os níveis de σ^F durante a fase exponencial em cepas mutantes em FtsH e outras proteases, como ClpA/P. O aumento nos níveis de σ^F via inibição de sua degradação seria importante na fase estacionária por não necessitar da síntese de proteínas, que é bastante reduzida nesta fase do crescimento.

Alternativamente, a indução pós-transcricional de *sigF* pode ocorrer por um aumento na taxa de tradução da proteína durante a entrada na fase estacionária, devido a

desestabilização de estruturas secundárias que reduziriam a tradução durante a fase exponencial, conforme o modelo sugerido para a regulação de *rpoS* (Hengge-Aronis, 2000).

5.4) Regulação da Expressão de *sigU*

Este trabalho descreve também a caracterização da expressão do gene *sigU*, em nível transcricional e pós-transcricional. Os resultados obtidos demonstram a indução na transcrição do gene em resposta a várias das condições testadas, sendo elas: a entrada na fase estacionária, estresse salino e osmótico e choque térmico extremo.

A análise das regiões promotoras de *sigU* sugere a presença de um promotor dependente de σ^{70} , responsável pela indução da transcrição do gene em todas estas condições. Este resultado implica na presença de proteínas regulatórias, capazes de promover o aumento na expressão do gene nas condições específicas. Em *E.coli*, além da regulação por σ^E , a resposta a estresses no envelope é mediada por duas vias de transdução de sinal, que consistem em sistemas de dois componentes: CpxA/R e BaeR/S (Raivio & Silhavy, 2001; Raffa & Raivio, 2002). Uma sequência com similaridade ao consenso reconhecido pelo regulador de resposta CpxR foi encontrada na região promotora de *sigU*. Em *E. coli*, o sistema CpxA/R é ativado durante a fase estacionária e pode ter efeitos positivos ou negativos nos promotores por ele regulados (de Wulf et al., 1999). Foi descrita a regulação de *rpoE* de *E.coli* e *S. typhimurium* pelo sistema CpxA/R, porém, em ambos os casos há um efeito repressor sobre a atividade dos genes (Miticka et al., 2003; de Wulf et al., 1999). Entretanto, a presença de CpxA/R em *C. crescentus* não pode ser confirmada, uma vez que apenas reguladores de resposta com baixa similaridade a CpxR de *E.coli* são encontrados no genoma desta bactéria (o gene com maior similaridade, denominado CC0237, apresenta 49,35% de similaridade e 39,4% de identidade com o gene *cpxR*). Assim, o gene *sigU* pode ser regulado por um sistema similar a CpxA/R, através do sítio encontrado em seu promotor, ou por outro

dos vários sistemas de dois componentes identificados em *C. crescentus*, capazes de transmitir sinais provenientes do envelope celular e do meio externo. Neste sentido, é importante destacar a presença de um gene que codifica uma proteína histidina-quinase sensora (estas proteínas atuam como sensores de sistemas de dois componentes) a 3' de *sigU* no cromossomo (figura 4).

A análise da atividade do promotor de *sigU* na cepa mutante demonstrou que este gene não é autorregulado positivamente. Até o momento, o fator σ^E de *M. tuberculosis* parece ser o único fator ECF descrito que não demonstrou uma autorregulação positiva em sua expressão (Manganelli et al., 2001). Nesse caso, observou-se que a expressão de *sigE* é dependente de σ^H , outro fator ECF de *M. tuberculosis*, porém, foi sugerido que este efeito seja indireto, uma vez que não foi encontrado um promotor dependente de σ^H a 5' de *sigE* (Manganelli et al., 2002).

Um possível promotor dependente de σ^F e responsável por uma pequena parte da transcrição de *sigU* na fase estacionária foi encontrado na região regulatória do gene (P2). Entretanto, os resultados obtidos indicam que a ausência de *sigF* não promove redução significativa nos níveis de transcrição de *sigU*. Por outro lado, os níveis da proteína codificada por *sigU* estão muito reduzidos nas cepas mutantes em *sigF* após 24 h de crescimento. Este resultado indica um efeito da mutação em *sigF* na expressão de *sigU* em nível pós-transcricional e deverá ser melhor investigado.

Devido ao modo de vida de *C. crescentus*, esta espécie deve ter desenvolvido muitos mecanismos de adaptação à ausência de nutrientes e a estresse oxidativo. Em *E. coli*, parte desta resposta é dependente do fator σ^S , ausente em *C. crescentus* e nas demais α -proteobactérias estudadas até o momento. Assim, em *C. crescentus* os fatores ECF parecem exercer parte desta função, uma vez que foi demonstrado neste trabalho que ao menos dois deles estão envolvidos, σ^F e σ^U . Entretanto, estas funções devem ser dependentes de outros

membros desta família em *C. crescentus*, uma vez que cepas mutantes nos genes *sigU* e *sigF* não apresentam viabilidade reduzida na fase estacionária, ao contrário do observado no mutante de *rpoS* em *E.coli* (Lange & Hengge-Aronis, 1991).

6) CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu um maior entendimento do papel dos fatores ECF na fisiologia de *C. crescentus* e dos mecanismos de regulação destes fatores sigma, especialmente no casos do fatores σ^F e σ^U . Até este trabalho nenhum fator sigma ECF havia sido caracterizado nesta bactéria. As principais conclusões obtidas estão listadas a seguir:

- As proteínas codificadas por *sigL* e *sigM* atuam na resposta a choque térmico extremo (48°C).
- A proteína codificada por *sigF* é essencial para a resposta a estresse oxidativo durante a fase estacionária. A análise por “microarray” indicou que σ^F é responsável pela regulação de pelo menos oito genes na fase estacionária. Dentre estes, confirmou-se por RT-PCR a regulação de *msrA*, *sodA* e CC3255.
- O gene *sigF* é induzido em resposta a choque térmico extremo (48°C), sendo autorregulado positivamente em resposta a este estresse. Foi possível encontrar um promotor putativo com similaridade aos promotores reconhecidos por fatores ECF na região 5' não traduzida de *sigF*.
- *sigF* é regulado pós-transcricionalmente durante a fase estacionária, não apresentando autorregulação positiva nesta fase do crescimento.
- O gene *sigU* é induzido em resposta a choque térmico extremo (48°C), estresse salino e osmótico e pela entrada na fase estacionária, porém, o gene não parece ser essencial para a resistência a estes estresses.
- A regulação de *sigU* em resposta a choque térmico extremo e à entrada na fase estacionária parece ocorrer em nível transcricional, enquanto, mecanismos transcricionais e pós-transcricionais parecem estar envolvidos em sua regulação durante a resposta a choque salino e osmótico.

- O gene *sigU* não é autorregulado positivamente. A análise de sua região regulatória demonstrou a presença de um promotor putativo com similaridade ao consenso estabelecido para o reconhecimento por σ^{73} , fator sigma principal de *C. crescentus*. Este promotor é responsável pela indução na transcrição de *sigU* em resposta ao choque térmico, estresse salino e fase estacionária. Além disto, um promotor provavelmente reconhecido por σ^F também foi encontrado, atuando durante a fase estacionária. Entretanto, este promotor não se mostrou essencial para a expressão de *sigU*.

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBA, B.M., LEEDS, J.A., ONUFRYK, C., LU, C.Z., GROSS, C.A. DegS and YaeL participate sequentially in the cleavage of RseA to activate the σ^E -dependent extracytoplasmic stress response. *Genes Dev.* **16**: 2156-2168. 2002.
- ALBA, B.M., GROSS, C.A. Regulation of the *Escherichia coli* σ^E -dependent envelope stress response. *Mol. Microb.* **52**: 613-619. 2004.
- AVEDISSIAN, M., LESSING, D., GOBER, J.W., SHAPIRO, L., GOMES, S.L. Regulation of the *Caulobacter crescentus* *dnaKJ* operon. *J. Bacteriol.* **177**: 3479-3484. 1995.
- AVEDISSIAN, M., GOMES, S.L. Expression of the *groESL* operon is cell cycle controlled in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* **19**: 79-89. 1996.
- BALDINI, R.L., AVEDISSIAN, M., GOMES, S.L. The CIRCE element and its putative repressor control cell cycle expression of the *Caulobacter crescentus* *groESL* operon. *J. Bacteriol.* **180**: 1632-1641. 1998.
- BIANCHI, A.A., BANEYX, F. Hyperosmotic shock induces the σ^{32} and σ^E stress regulons of *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **34**: 1029-1038. 1999.
- BRAUN, V. Surface signaling: novel transcription initiation mechanism starting from the cell surface. *Arch. Microbiol.* **167**: 325-331. 1997.
- BREMER, E., KRAMER, R. Coping with osmotic challenges: osmoregulation through accumulation and release of compatible solutes in bacteria. In *Bacterial Stress Responses*, ASM Press. (Washington, EUA) pp 79-97. 2000.
- BROWNING, D.F.; WHITWORTH, D.E.; HODGSON, D.A. Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: functional characterization of the ECF sigma factor CarQ and antisigma factor CarR. *Mol. Microbiol.* **48**: 237-251. 2003.
- BUCK, M., GALLEGOS, M.T., STUDHOLME, D.J., GUO, Y., GRALLA, J.D. The bacterial enhancer-dependent sigma (54) (sigma(N)) transcription factor. *J. Bacteriol.* **182**: 4129-36. 2000.
- BURGESS, R.R., TRAVERS, A.A., DUNN, J.J., BAUTZ, E.K. Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nature* **221**: 43-46. 1969.
- CAMPBELL, E.A., MUZZIN, O., CHLENOV, M., SUN, J.L., OLSON, C.A., et al. Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol. Cell* **9**: 527-39. 2002.
- CAMPBELL, E.A.; TUPY, J.L.; GRUBER, T.M.; WANG, S.; SHARP, M.M.; GROSS, C.A.; DARST, S.A. Crystal structure of *Escherichia coli* σ^E with the cytoplasmic domain of its anti-sigma RseA. *Mol. Cell* **11**: 1067-1078. 2003.

- CHATAWAY, T.K. & BARRIT, G.J. Purification of histidine-tagged ras and its use in the detection of ras binding proteins. *Mol. Cell Biochem.* **144**: 167-173. 1995.
- CHEN, W. & KUO, T. A simple and rapid method for the preparation of gram-negative genomic DNA. *Nucleic Acid Research.*, **21**: 2260. 1993.
- CHIE, E. AND BARTLETT, D.H. An *rpoE*-like locus controls outer membrane protein synthesis and growth at cold temperatures and high pressures in the deep-sea bacterium *Photobacterium* sp. strain SS9. *Mol. Microbiol.* **17**: 713-726. 1995.
- CLEMENTS, M.O., WATSON, S.P., FOSTER, S.J. Characterization of the major superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus* and its role in starvation survival, stress resistance, and pathogenicity. *J. Bacteriol.* **181**: 3898-903. 1999.
- DA SILVA, A.C.A., SIMÃO, R.C.G., SUSIN, M.F., BALDINI, R.L., AVEDISSIAN, M., GOMES, S.L. Down-regulation of the heat shock response is independent of DnaK and σ^{32} levels in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* **49**: 541-553. 2003.
- DARTIGALONGUE, C., MISSIAKAS, D., RAINA, S. Characterization of the *Escherichia coli* σ^E regulon. *J. Biol. Chem.* **276**: 20866-20875. 2001.
- DE LAS PENAS, A.; CONNOLLY, L. GROSS, C.A. The σ^E -mediated response to extracytoplasmic stress in *Escherichia coli* is induced by the RseA and RseB, two negative regulators of σ^E . *Mol. Microbiol.* **24**: 373-385. 1997.
- DE WULF, P., MCGUIRE, A., LIU, X., LIN, E.C.C. Genome-wide profiling of promoter recognition by the two-component response regulator CpxR-P in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**: 26652-26661. 2002.
- DUKAN, S., NYSTROM, T. Oxidative stress defense and deterioration of growth-arrested *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* **274**: 26027-26032. 1999.
- EBRIGHT, R.H. RNA Polymerase: structural similarities between bacterial RNA polymerase and eukaryotic RNA polymerase II. *J. Mol. Biol.* **304**: 687-698. 2000.
- ERICKSON, J.W. & GROSS, C.A. Identification of the σ^E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate σ factor involved in high temperature gene expression. *Genes Dev.* **3**: 1462-1471. 1989.
- ERICKSON, J.W.; VAUGHN, V.; WALTER, W.A.; NEIDHARDT, F.C.; GROSS, C.A. Regulation of the promoters and transcripts of *rpo H*, the *Escherichia coli* heat shock regulatory gene. *Genes Dev.* **1**: 419-432. 1987.
- EVINGER, M., AGABIAN, N. Envelope-associated nucleoid from *Caulobacter crescentus* stalked and swarmer cells. *J. Bacteriol.*, **132**: 294-301. 1977.
- FISCHER, G., RUMMEL, G., ALDRIDGE, P., JENAL, U. The FtsH protease is involved in development, stress response and heat shock control in *C. crescentus*. *Mol. Microb.* **44**: 461-478. 2002.

- FLYNN JM, LEVCHENKO I, SAUER RT, BAKER TA. Modulating substrate choice: the SspB adaptor delivers a regulator of the extracytoplasmic-stress response to the AAA+ protease ClpXP for degradation. *Genes Dev.* **18**: 2292-301. 2004.
- GOBER, J.W., SHAPIRO, L. A developmentally regulated *Caulobacter* flagellar promoter is activated by 3'enhancer and IHF binding elements. *Mol. Biol. Cell* **3**: 913-916. 1992.
- GOMES, S.L., JULIANI, M.H., MAIA, J.C.C., SILVA, A.M. Heat shock protein synthesis during development in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **168**: 923-930. 1986.
- GOMES, S.L., GOBER, J.W., SHAPIRO, L. Expression of the *Caulobacter* heat shock gene *dnaK* is developmentally controlled during growth at normal temperatures. *J. Bacteriol.* **172**: 3051-3059. 1990.
- GORHAM, H.C.; MCGOWAN, S.J.; ROBSON, P.R.H.; HODGSON, D.A. Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: light-dependent membrane sequestration of ECF sigma factor CarQ by anti-sigma factor CarR. *Mol. Microbiol.* **19**: 171-186. 1996.
- GRUBER, T.M., MARKOV, D., SHARP, M.M., YOUNG, B.A., LU, C.Z., ZHONG, H.J et al. Binding of the initiation factor sigma(70) to core RNA polymerase is a multistep process. *Mol Cell* **8**: 21-31. 2001.
- GRUBER, T.M., GROSS, C.A. Multiple Sigma Subunits and the Partitioning of Bacterial Transcription Space. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 441-66. 2003.
- HALDENWANG, W.G. The sigma factors of *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* **59**: 1-30. 1995.
- HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557. 1983.
- HELMANN, J.D., CHAMBERLIN, M.J. Structure and function of bacterial sigma factors. *Annu. Rev. Biochem.* **57**: 839-872. 1988.
- HELMANN, J.D. The Extracytoplasmic Function (ECF) Sigma Factors. *Adv. Microb. Physiol.* **46**: 47-110. 2002.
- HENGGE-ARONIS, R. Back to log phase: σ^S as a global regulator in the osmotic control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**:887-893. 1996.
- HENGGE-ARONIS, R. The general stress response in *Escherichia coli*. *Bacterial Stress Responses*, pp161-178. ASM Press, Washington (EUA). 2000.
- HENGGE-ARONIS, R. Signal Transduction and Regulatory Mechanisms Involved in Control of the σ^S (RpoS) Subunit of RNA Polymerase. *Microb. Mol. Biol. Rev.* **66**: 373-395. 2002.
- HENGGE-ARONIS, R. Stationary-phase gene regulation: what makes an *Escherichia coli* promoter σ^S -selective? *Curr. Opin. Microb.* **5**: 591-595. 2002.

- HILD, E., TAKAYAMA, K., OLSSON, R.M., KIELLEBERG, S. Evidence for a role of *rpoE* in stressed and unstressed cells of marine *Vibrio angustum* strain S14. *J. Bacteriol.* **182**: 6964-74. 2000.
- HORSBURGH, M.J., MOIR, A. Sigma M, an ECF RNA polymerase sigma factor of *Bacillus subtilis* 168, is essential for growth and survival in high concentrations of salt. *Mol. Microbiol.* **32**: 41-50. 1999.
- HUANG, X., DECATUR, A., SOROKIN, A., HELMANN, J.D. The *Bacillus subtilis* σ^X is an extracytoplasmic function σ factor contributing to survival at high temperature. *J. Bacter.* **179**: 2915-2921. 1997.
- HUANG, X., FREDRICK, K.L., HELMANN, J.D. Promoter recognition by *Bacillus subtilis* σ^W : autoregulation and partial overlap with the σ^X regulon. *J. Bacteriol.* **180**: 3765-3770. 1998.
- HUANG, X., HELMANN, J.D. Identification of target promoters for the *Bacillus subtilis* σ^X factor using a consensus-directed search. *J. Mol. Biol.* **279**: 165-173. 1998.
- IMLAY, J.A., LINN, S. Mutagenesis and Stress Responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *J. Bacter.* **169**: 2967-2976. 1987.
- ITALIANI, V.C., ZULETA, L.F., MARQUES, M.V. The transcription termination factor Rho is required for oxidative stress survival in *Caulobacter crescentus*. *Mol. Microbiol.* **44**: 181-194. 2002.
- JACUBOVICS, N.S., SMITH, A.W., JENKINSON, H.F. Oxidative stress tolerance is manganese (Mn(2+)) regulated in *Streptococcus gordonii*. *Microbiology* **148**: 3255-63. 2002.
- JANAKIRAMAN RS, BRUN YV. Cell cycle control of a holdfast attachment gene in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **181**: 1118-25. 1999.
- JENAL, U., FUCHS, T. An essential protease involved in bacterial cell-cycle control. *EMBO J.* **17**:5658-69. 1998.
- JENKINS, D.E., CHAISSON, S.A., MATIN, A. Starvation-induced cross protection against osmotic challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 2779-2781. 1990.
- JENKINS, D.E., SCHULTZ, J.E., MATIN, A. Starvation-induced cross protection against heat or H₂O₂ challenge in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 3910-3914. 1988.
- KANEHARA, K., ITO, K., AKIYAMA, Y. YaeL (EcfE) activates the sigma (E) pathway of stress response through a site-2 cleavage of anti-sigma(E), RseA. *Genes Dev.* **16**: 2147-2155. 2002.
- KANG, J.-G., PAGET, M.S.B.; SEOK, Y.-J; HAHN, M.-Y; BAE, J.-B.; HAHN, J.-S. RsrA, an anti-sigma factor regulated by redox change. *EMBO J.* **18**:4292-4298. 1999.

- KIM, E.Y., SHIN, M.S., RHEE, J.H., CHOY, H.E. Factors influencing preferential utilization of RNA polymerase containing sigma-38 in stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*. *J. Microbiol.* **42**: 103-110. 2004.
- KOIDE, T., ZAINI, P.A., MOREIRA, L.M., VENCIO, R.Z., MATSUKUMA, A.Y. et al. DNA microarray-based genome comparison of a pathogenic and a nonpathogenic strain of *Xylella fastidiosa* delineates genes important for bacterial virulence. *J. Bacteriol.* **186**: 5442-9. 2004.
- KOVACH, ME; ELZER, P.; HILL, D.S.; ROBERTSON, G.; FARRIS, M.; ROOP, R.; PETERSON, K. Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene* **166**: 175-176. 1995.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **226**: 680-685. 1970.
- LANGE, R., HENGGE-ARONIS, R. Identification of a central regulator of stationary phase gene expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**: 49-59. 1991.
- 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.* **8**: 1600-1612. 1994.
- LAPTEVA, N.A. Ecological features of distribution of bacteria of the genus *Caulobacter* in freshwater bodies. *Mikrobiologiya* **56**: 537-543. 1987.
- LAUB, MT; McADAMS, H; FELDBLYUM, T; FRASER, C.; SHAPIRO, L. Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science* **290**: 2144-2148. 2000.
- LI, M., MOYLE, H., SUSSKIND, M.M. Target of the transcriptional activation function of phage lambda cI protein. *Science* **263**: 75-77. 1994.
- LI, W.; STEVENSON, C.E.M.; BURTON, N.; JAKIMOWICZ, P; PAGET, M.S.B.; BUTTNER, M.J.; LAWSON, D.M.; KLEANTHOUS, C. Identification and Structure of the Anti-sigma Factor-binding Domain of the Disulphide-stress Regulated Sigma Factor σ^R from *Streptomyces coelicolor*. *J. Mol. Biol.* **323**: 225-236. 2002.
- LONETTO, M., GRIBSKOV, M., GROSS, C.A. The σ^{70} family: sequence conservation and evolutionary relationships. *J. Bacteriol.* **174**: 3843-3849. 1992.
- LONETTO, M.A.; BROWN, K.L.; RUDD, K.E.; BUTTNER, M.J. Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase σ factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 7573-7577. 1994.
- MALAKOOTI, J., WANG, S.P., ELY, B. A consensus promoter sequence for *Caulobacter crescentus* genes involved in biosynthetic and housekeeping functions. *J. Bact.* **177**: 4372-4376. 1995.

- MANGANELLI, R., VOSKUIL, M.I., SCHOOLNIK, G.K., SMITH, I. The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor σ^E : role in global gene expression and survival in macrophages. *Mol. Microb.* **41**: 423-437. 2001.
- MANGANELLI R, VOSKUIL MI, SCHOOLNIK GK, DUBNAU E, GOMEZ M, SMITH I. Role of the extracytoplasmic-function sigma factor sigma(H) in *Mycobacterium tuberculosis* global gene expression. *Mol Microbiol.* **45**:365-74. 2002.
- MANI, N., DUPUY, B. Regulation of toxin synthesis in *Clostridium difficile* by an alternative RNA polymerase sigma factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 5844-5849. 2001.
- MARSHAK, D.R.; KADONAGA, J.T.; BURGESS, R.; KNUTH, M.W.; BRENNAN, JRLIN, S. Strategies for protein purification and characterization. A Laboratory Course manual. Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996, pp 205-218.
- MARTIN, D.W., HOLLOWAY B.W., DERETIC, V. Characterization of a locus determining the mucoid status of *Pseudomonas aeruginosa*: AlgU shows sequence similarities with a *Bacillus* sigma factor. *J. Bacteriol.* **175**: 1153-1164. 1993.
- MARTIN, D.W., SCHURR, M.J., YU, H., DERETIC, V. Analysis of Promoters controlled by the putative sigma factor AlgU regulating conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*: relationship to σ^E and stress responses. *J. Bacteriol.* **176**: 6688-6696. 1994.
- MARTIN, M.E., BRUN, Y.V. Coordinating development with the cell cycle in *Caulobacter*. *Curr. Opin. Microb.* **3**: 589-595. 2000.
- MARTINEZ-SALAZAR.J.M., MORENO.S., NAJERA,R., BOUCHER.J.C., ESPIN,G., SOBERON-CHAVEZ.G. AND DERETIC,V. Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC, and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. *J. Bacteriol.* **178**: 1800-1808. 1996.
- MATHEE, K.; McPHERSON, C.J.; OHMAN, D.E. Post-translational control of the *algT* (*algU*)-encoded sigma 22 for expression of the alginate regulon in *Pseudomonas aeruginosa* and localization of its antagonist proteins MucA and MucB (AlgN). *J. Bacteriol.* **179**: 3711-3720. 1997.
- McGOWAN, S.J.; GORHAM, H.C.; HODGSON, D.A. Light-induced carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*: DNA sequence analysis of the *carR* region. *Mol. Microbiol.* **10**:713-735. 1993.
- MECSAS, J.; ROUVIÈRE, P.E.; ERICKSON, J.W.; DONOHUE, T.J.; GROSS, C.A. The activity of σ^E , an *Escherichia coli* heat-inducible sigma factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev.* **7**: 2618-2628. 1993.
- MEISENZAHN AC, SHAPIRO L, JENAL U. Isolation and characterization of a xylose-dependent promoter from *Caulobacter crescentus*. *J Bacteriol.* **179**: 592-600. 1997.

- MERLIN, C., MASTERS, M., MCATEER, S., COULSON, A. Why is carbonic anhydrase essential to *Escherichia coli*? *J. Bacteriol* **185**: 6415-6424. 2003.
- MILLER, J.H. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, Nova Iorque, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1972, pp. 352-355.
- MISSIAKAS, D., RAINA, S. Protein Folding in the Bacterial Periplasm. *J. Bacteriol.* **179**: 2465-2471. 1997.
- MISSIAKAS, D.; MAYER, M.P.; LEMAIRE, M.; GEORGOPOULOS, C.; RAINA, S. Modulation of the *Escherichia coli* σ^E (RpoE) heat-shock transcription-factor activity by the RseA, RseB and RseC proteins. *Mol. Microbiol* **24**: 355-371. 1997.
- MITICKA, H., ROWLEY, G., REZUCHOVA, B., HOMEORVA, D., HUMPHREYS, S., FARN, J., ROBERTS, M., KORMANEC, J. Transcriptional analysis of the *rpoE* gene encoding extracytoplasmic stress response sigma factor σ^E in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Microbiology Letters* **226**: 307-314. 2003.
- MITTENHUBER, G. An Inventory of Genes Encoding RNA Polymerase Sigma Factors in 31 Completely Sequenced Eubacterial Genomes. *J. Mol. Biotechnol.* **4**: 77-91. 2002.
- MOSKOVITZ J, RAHMAN MA, STRASSMAN J, YANCEY SO, KUSHNER SR, BROTH N, WEISSBACH H. *Escherichia coli* peptide methionine sulfoxide reductase gene: regulation of expression and role in protecting against oxidative damage. *J Bacteriol.* **177**:502-7.1995.
- MOSKOVITZ J, BERLETT BS, POSTON JM, STADTMAN ER. The yeast peptide-methionine sulfoxide reductase functions as an antioxidant in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**: 9585-9. 1997.
- MURAKAMI, K.S., DARST, S.A. Bacterial RNA polymerases: the whole story. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**: 31-39. 2003.
- NEWMAN, J.D.; ANTHONY, J.R.; DONOHUE, T.J. The importance of zinc-binding to the function of *Rhodobacter sphaeroides* ChrR as an anti-sigma factor. *J. Mol. Biol.* **313**: 485-499. 2001.
- NIERMAN, W.C., FELDBLYUM, T.V., LAUB, M.T., PAULSEN, I.T., NELSON, K.E., EISEN, J. HEIDELBERG, J.F. et al. Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 4136-4141. 2001.
- NITTA, T., NAGAMITSU, H., MURATA, M., IZU, H., YAMADA, M. Function of the σ^E regulon in dead-cell lysis in stationary-phase *Escherichia coli*. *J. Bacter.* **182**: 5231-5237. 2000.
- NYSTROM, T. Stationary-Phase Physiology. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**: 161-181. 2004.
- PAGET, M.S.B.; KANG, J-G.; ROE, J-H.; BUTTNER, M.J. σ^R , an RNA polymerase sigma factor that modulates expression of the thioredoxin system in response to oxidative stress in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *EMBO J.* **17**: 5776-5782. 1998.

- PAGET, M.S., MOLLE, V., COHEN, G., AHARANOWITZ, Y., BUTTNER, M.J. Defining the disulphide stress response in *Streptomyces coelicolor* A3(2): identification of the σ^R regulon. *Mol. Microbiol.* **42**: 1007-1020. 2001.
- POGLIANO, J., LYNCH, A.S., BELIN, D., LIN, E.C.C., BECKWITH, J. Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. *Genes & Dev.* **11**: 1169-1182. 1997.
- POINDEXTER, J.S. The Caulobacters: Ubiquitous Unusual Bacteria. *Microb. Reviews* **45**: 123-179. 1981.
- POYART C, PELLEGRINI E, GAILLOT O, BOUMAILA C, BAPTISTA M, TRIEU-CUOT P. Contribution of Mn-cofactored superoxide dismutase (SodA) to the virulence of *Streptococcus agalactiae*. *Infect Immun.* **69**:5098-106. 2001.
- PRENTKI, P.; KRISCH, H.M. In vitro insertional mutagenesis with a selectable DNA fragment. *Gene* **29**: 303-313. 1984.
- QIU, J., HELMANN, J.D. The -10 region is a key promoter specificity determinant for the *Bacillus subtilis* extracytoplasmic-function σ factors σ^X and σ^W . *J. Bacteriol.* **183**: 1921-1927. 2001.
- RAFFA, R.G., RAIVIO, T.L. A third envelope stress signal transduction pathway in *Escherichia coli*. *Mol. Microb.* **45**: 1599-1611. 2002.
- RAINA, S., MISSIAKAS, D., GEORGOPOULOS, C. The *rpoE* gene encoding the σ^E (σ^{24}) heat shock sigma factor of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **14**: 1043-1055. 1995.
- RAIVIO, T.L.; SILHAVY, T.J. Periplasmic Stress and ECF Sigma Factors. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**: 591-624. 2001.
- RAMAN, S., SONG, T., PUYANG, X., BARDAROV, S., JACOBS, W.R., HUSSON, R.N. The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress responses in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **183**: 6119-6125. 2001.
- REINSENAUER, A., MOHR, C.D., SHAPIRO, L. Regulation of a heat shock σ^{32} gene homolog in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **178**: 1919-1927. 1996.
- ROBERTS, R., TOOCHINDA, C., AVEDISSIAN, M., BALDINI, R.L., GOMES, S.L., SHAPIRO, L. Identification of a *Caulobacter crescentus* operon encoding *hrcA*, involved in negatively regulating heat-inducible transcription, and the chaperone gene *grpE*. *J. Bacteriol.* **178**: 1829-1841. 1996.
- ROTH, V., AIGLE, B., BUNET, A., WENNER, T., FOURRIER, C., DECARIS, B., LEBLOND, P. Differential and cross-Transcriptional control of duplicated genes encoding alternative sigma factors in *Streptomyces ambofaciens*. *J. Bacter.* **186**: 5355-5365. 2004.

- ROUVIERE, P.E., DE LAS PENAS, A., MECSAS, J., LU, C.Z., RUDD, K.E., GROSS, C.A. *rpoE*, the gene encoding the second heat-shock sigma factor, σ^E , in *Escherichia coli*. *EMBO J.* **14**: 1032-1042. 1995.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2ª edição, Cold Spring Harbor, Nova Iorque, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SHELLHORN, H.E. Regulation of hydroperoxidase (catalase) expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* **131**: 113-119. 1994.
- SCHMID, A.K., LIDSTROM, M.E. Involvement of two putative alternative sigma factors in stress response of the radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans*. *J. Bacter.* **184**: 6182-6189. 2002.
- SCHMIDT, J.M. Stalk elongation in mutants of *Caulobacter crescentus*. *J. Gen. Microbiol.* **53**: 291-298. 1968.
- SCHMIDT, J.M., STANIER, R.Y. The development of cellular stalks in bacteria. *J. Cell Biol.* **28**: 423-436. 1966.
- SCHNIDER-KEEL, U., LEJBOLLE, K.B., BAEHLER, E., HAAS, D., KEEL, C. The sigma factor AlgU (AlgT) controls exopolysaccharide production and tolerance towards desiccation and osmotic stress in the biocontrol agent *Pseudomonas fluorescens* CHAO. *App. Envir. Microb.* **67**: 5683-5693. 2001.
- SCHOBEL, S.; ZELLMEIER, S.; SCHUMANN, W.; WIEGERT, T. The *Bacillus subtilis* σ^W anti-sigma factor RsiW is degraded by intramembrane proteolysis through YluC. *Mol. Microb.* **52**: 1091-1105. 2004.
- SCHURR, M.J., YU, H., MARTINEZ-SALAZAR, J.M., BOUCHER, J.C., DERETIC, V. Control of AlgU, a member of the σ^E -like family of stress sigma factors, by the negative regulators MucA and MucB and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. *J. Bact.* **178**: 4997-5004. 1996.
- SCHWEDER, T.; LEE, K.H.; LOMOVSKAYA, O.; MATIN, A. Regulation of *E.coli* starvation sigma factor (σ^S) by ClpXP protease. *J. Bacteriol.* **178**: 470-476. 1996.
- SIMON, R., PRIEFER, U., PUHLER, A. A broad host range mobilization system for in vivo genetic engineering: transposon mutagenesis in gram negative bacteria. *Biotechnology*, **1**: 784-790. 1983.
- SINGH VK, MOSKOVITZ J, WILKINSON BJ, JAYASWAL RK. Molecular characterization of a chromosomal locus in *Staphylococcus aureus* that contributes to oxidative defence and is highly induced by the cell-wall-active antibiotic oxacillin. *Microbiology*. **147**:3037-45. 2001.
- SONG, T., DOVE, S.L., LEE, K.H., HUSSON, R.N. RshA, an anti-sigma factor that regulates the activity of the mycobacterial stress response sigma factor SigH. *Mol. Microb.* **50**: 949-959. 2003.

- ST. JOHN, G., BROTH, N., RUAN, J., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., WEISSBACH, H., NATHAN, C. Peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli* and *Mycobacterium tuberculosis* protects bacteria against oxidative damage from reactive nitrogen intermediates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 9901–9906. 2002.
- STEINMAN HM, FAREED F, WEINSTEIN L. Catalase-peroxidase of *Caulobacter crescentus*: function and role in stationary-phase survival. *J Bacteriol.* **179**:6831-6. 1997.
- STORZ, G., IMLAY, J. Oxidative Stress. *Curr. Opin. Microb.* **2**: 188-194. 1999.
- STUDHOLME, D.J., BUCK, M. The biology of enhancer-dependent transcriptional regulation in bacteria: insights from genome sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* **186**: 1-9. 2000.
- SUSIN, M.F., PEREZ, H.R., BALDINI, R.L., GOMES, S.L. Functional and Structural Analysis of HrcA Repressor Protein from *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **186**: 6759-6767.
- TAKANO, H., HOSONO, K., BEPPU, T., UEDA, K. Involvement of sigma(H) and related sigma factors in glucose-dependent initiation of morphological and physiological development of *Streptomyces griseus*. *Gene.* **27**:127-35. 2003.
- TESTERMAN, T.L., VAZQUEZ-TORRES, A., XU, Y., JONES-CARSON, J., LIBBY, S.J., FANG, F.C. The alternative sigma factor σ^E controls antioxidant defenses required for *Salmonella* virulence and stationary-phase survival. *Mol. Microb.* **43**: 771-782. 2002.
- THACKRAY, P.D., MOIR, A. SigM, an extracytoplasmic function sigma factor of *Bacillus subtilis*, is activated in response to cell wall antibiotics, ethanol, heat, acid, and superoxide stress. *J. Bacteriol.* **185**: 3491-3498. 2003.
- TOUATL, D. Iron and oxidative stress. *Arch. Bioch. Bioph.* **373**: 1-6. 2000.
- VASSYLYEV, D.G., SEKINE, S., LAPTENKO, O., LEE, J., VASSYLYEVA, M.N. et al., Crystal structure of a bacterial RNA polymerase holoenzyme at 2.6 Å resolution. *Nature* **417**: 712-19. 2002.
- VIOLLIER, P.H., KELEMEN, G.H., DALE, G.E., NGUYEN, K.T., BUTTNER, M.J., THOMPSON, C.J. Specialized osmotic stress response systems involve multiple SigB-like sigma factors in *Streptomyces coelicolor*. *Mol. Microb.* **47**: 699-714. 2003.
- VUTHOORI, S., BOWERS, C.W., MCCracken, A., DOMBROSKI, A.J., HINTON, D.M. Domain 1.1 of the sigma (70) subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase modulates the formation of stable polymerase/promoter complexes. *J. Mol. Biol.* **309**: 561-72. 2001.
- WALSH, N.P., ALBA, B.M., BOSE, B., GROSS, C.A., SAUER, R.T. OMP peptide signals initiate the envelope-stress response by activating DegS protease via relief of inhibition mediated by its PDZ domain. *Cell* **113**: 61-71. 2003.

- WANG, Q. & KAGUNI, J.M. A novel sigma factor is involved in expression of the *rpo H* gene of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**: 4248-4253. 1989.
- WEISSBACH, H., ETIENNE, F., HOSHI, T., HEINEMANN, S.H., LOWTHER, W.T., MATTHEWS, B., ST. JOHN, G., NATHAN, C., BROT, N. Peptide methionine sulfoxide reductase: structure mechanism of action and biological function. *Arch. Biochem. Biophys.* **397**: 172-178. 2002.
- WILSON, C.; DOMBROSKI, A.J. Region 1 of sigma 70 is required for efficient isomerization and initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **267**: 60-74. 1997.
- WORTINGER, M.A.; QUARDOKUS, E.M.; BRUN, Y.V. Morphological adaptation and inhibition of cell division during stationary phase in *Caulobacter crescentus*. *Mol Microbiol.* **29**: 963-973. 1998.
- WOSTEN, M.M.S.M. Eubacterial sigma factors. *FEMS Microbiol. Rev.* **22**: 127-150. 1998.
- WU, J., NEWTON, A. Isolation, identification, and transcriptional specificity of the heat shock sigma factor σ^{32} from *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **178**: 2094-2101. 1996.
- WU, Q.L., KONG, D., LAM, K., HUSSON, R.N. A mycobacterial extracytoplasmic function sigma factor involved in survival following stress. *J. Bacteriol.* **179**: 2922-9. 1997.
- YOUNG, B.A., GRUBER, T.M., GROSS, C.A. Minimal Machinery of RNA Polymerase Holoenzyme Sufficient for Promoter Melting. *Science* **303**: 1382-1384. 2004.
- YURA, T., NAGAI, H., MORI, H. Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 321-350. 1993.
- ZELLMEIER, S., ZUBER, U., SCHUMANN, W., WIEGERT, T. The absence of FtsH metalloprotease activity causes overexpression of the σ^W -controlled *pbpE* gene, resulting in filamentous growth of *Bacillus subtilis*. *J. Bacter.* **185**: 973-982. 2003.
- ZULETA, L.F.G., ITALIANI, V.C.S., MARQUES, M.V. Isolation and Characterization of NaCl-sensitive mutants of *Caulobacter crescentus*. *App. Environ. Microb.* **69**: 3029-3035. 2003.