

Condiciones ambientales que afectan la expresión del gen *suoM*: un factor sigma de estrés en *M. smegmatis*

Environmental Conditions Affecting the Expression of the SuoM Gene: An Stress Sigma Factor in M. smegmatis

Arráiz, Nailet¹; Salazar, L.² y Takiff, H.²

¹ Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. ² Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas

Resumen

Los factores sigma se asocian a la ARN polimerasa y le confieren especificidad de reconocimiento de regiones promotoras. Esto provee un nivel de regulación transcripcional, que determina que un grupo de genes sea expresado de acuerdo a las necesidades fisiológicas de la célula bacteriana. El análisis de secuencia de la región del origen de replicación de *Mycobacterium smegmatis* reveló la presencia de un marco de lectura con capacidad codificante para un factor sigma de la subfamilia ECF (“extracytoplasmic function”), los cuales se caracterizan por dirigir la transcripción de genes en respuesta a cambios en las condiciones ambientales. Con el objetivo de identificar las condiciones ambientales que estimulan la expresión del gen aislado, designado *suoM* (“sigma unido al origen en micobacterias”), se construyeron fusiones transcripcionales *P_{suoM}-lacZ'* sobre el plásmido de fusión de operones pJEM15. Las construcciones se introdujeron por electroporación en *M. smegmatis* y las células transformadas se sometieron a varias condiciones de estrés ambiental a fin de estudiar la actividad promotora del gen *suoM* mediante ensayos β -galactosidasa. Se observó un incremento de 2,0-3,5 veces en la actividad promotora, al transferir las células a 45°C y cuando el cultivo alcanza fase estacionaria de crecimiento. Los resultados sugieren que *suoM* podría estar involucrado en la regulación de la expresión de genes en condiciones de elevada temperatura y en fase estacionaria de crecimiento, condiciones inductoras que podrían tener algún significado en el potencial patogénico de micobacterias y en la habilidad de *M. tuberculosis* para causar infección latente.

Palabras clave: *M. smegmatis*, *suoM*, estrés, fase estacionaria, β -galactosidasa, pJEM15.

Recibido: 17-05-02 / Aceptado: 27-06-02

Abstract

Sigma factors associate with the RNA polymerases and confer specificity in the recognition of promoter regions. This provides a transcriptional regulatory level, that determines that a sets of genes is expressed according to the physiological necessities of bacterial cell. The sequence analysis of the region of replication origin of *Mycobacterium smegmatis* revealed the presence of a reading frame with capacity to codify a sigma factor of the ECF subfamily (“extracytoplasmic function”), which are characterized by directing the transcription of genes in response to changes in the environmental conditions. Transcriptional fusions *P_{suoM}-lacZ'* in operon fusion plasmid pJEM15 were constructed with the objective of identifying the environmental conditions that stimulate the expression of the isolated gene, named *suoM* (“sigma linked to the origin in mycobacteria”), The constructions were introduced by electro-poration in *M. smegmatis* and the cells were grown under different environmental stress conditions. The promoter activity of the gene *suoM* was measured by β -galactosidasa expression. An increase of 2.0-3.5 times in the promoter activity was observed when the cells were transferred to 45°C and when the culture reached stationary growth phase. The results suggest that *suoM* could be involved in the regulation of gene expression in conditions of high temperature and in the stationary growth phase, inductive conditions that could have some significance in the pathogenic potential of mycobacteria and the ability of *M. tuberculosis* to cause latent infection.

Key words: *M. smegmatis*, *suoM*, stress, stationary phase, β -galactosidase, pJEM15.

Introducción

En células procariotas los genes son transcritos por la enzima ARN polimerasa (ARNP), constituida por las subunidades α_2 , β , β' y un factor sigma (σ). El factor sigma se asocia transitoriamente con las otras subunidades de la ARNP e incrementa la afinidad de la holoenzima por secuencias promotoras específicas de genes. Recientemente se reportó un grupo de factores sigma que tienen en común la característica de regular la expresión de genes en respuesta a estímulos extracitoplasmáticos, por lo cual se les designó subfamilia ECF, por “extracytoplasmic function” (15). Algunos ECFs, tales como AlgU (σ^E) en *P. aeruginosa* (31) y HrpL en *E. amylovora* (29) se han asociado a mecanismos de virulencia o persistencia bacteriana.

El análisis de secuencia de la región del origen de replicación de *M. smegmatis* (23), reveló la presencia de un marco de lectura

(*orf*) con capacidad codificante para un polipéptido de 191 aminoácidos homólogo a los factores sigma de la subfamilia ECF.

Dada la importancia de la subfamilia ECF en la supervivencia frente a condiciones ambientales adversas, reconocida en varios géneros bacterianos, en este trabajo se reportan algunos hallazgos sobre la regulación de la expresión de *suoM* (“sigma unido al origen en micobacterias”) por condiciones ambientales, fin de definir si *suoM* comparte características funcionales comunes con otros factores sigma ECF identificados en micobacterias y otras especies bacterianas. En el genoma de *M. tuberculosis* se identificó un homólogo de *suoM*, por lo cual los estudios de expresión de este gen podrían contribuir a dilucidar posibles mecanismos de supervivencia, de micobacterias de importancia clínica dentro del hospedador humano.

Materiales y Métodos

1. Cepas bacterianas y plásmidos

Se utilizó *E. coli* XL1-Blue (Stratagene, La Jolla Calif.) para propósitos generales de clonamiento y amplificación de moléculas recombinantes. La expresión de *suoM* se estudió en *M. smegmatis* mc²155, una cepa mutante de mc²6, caracterizada por alta eficiencia de transformación (27). Los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 1.

2. Enzimas y reactivos

Se utilizaron endonucleasas de restricción, T4 DNA ligasa, fosfatasa alcalina, proteínasa K, lisozima y fragmento Klenow disponibles en el laboratorio (New England Biolabs, Boehringer Mannheim Biochemicals o Promega Corporation).

3. Medios y condiciones de cultivos

Para cultivos de *E. coli*, se utilizó medio Luria Bertani (LB) y placas de LB 1,5% Agar. Para cultivos líquidos de *M. smegmatis*, se utilizó medio Middlebrook 7H9 (DIFCO) suplementado y LB-1,5 Agar o 7H10 (DIFCO)

para cultivo en placas. Como medio mínimo se utilizó una mezcla basal de sales: KH₂PO₄ 0,1%; NaHPO₄ 0,25%; NH₄Cl 0,5%; K₂SO₄ 0,2% suplementado con glucosa (0,5%) o glicerol (0,05%) y Tween 80 (0,05%). La incubación se llevó a cabo a 37°C con agitación a 200 rpm. Para estudiar el efecto de altas temperaturas sobre la expresión de *suoM*, los cultivos creciendo a 37°C se transfirieron durante 1h a 3h a 45°C. Para estudiar expresión dependiente de fase de crecimiento, previa elaboración de la curva de crecimiento, se tomaron alícuotas de cultivo a densidades ópticas crecientes (fase exponencial, DO_{600nm}=0,3-0,6; fase estacionaria, DO_{600nm}=4-6). Para otras condiciones de estrés, 10 mL de cultivo creciendo exponencialmente DO_{600nm}= 0,3-0,6 se centrifugaron a 5000xg por 5 min y el sedimento se resuspendió en 10 mL de cada uno de los reactivos de estrés para ser incubados a 37°C por períodos de 1h a 3h.

4. Construcción de fusiones transcripcionales *suoM* de *M. smegmatis* (*psuoM-lacZ'*)

Estas se diseñaron a través del análisis de secuencia y patrones de restricción del subclon pOS235 (Figura 3). Este subclon se

Tabla 1. Plásmidos utilizados en este estudio

Plásmidos	Descripción	Referencia
pUC118	Fagémidos de 3,16 Kpb. Contiene origen de replicación en <i>E. coli</i> (oriE)	24
pUC119	Incluye un segmento del general lacZ de <i>E. coli</i> que codifica un péptido de α -complementación. Amp ^R	
pJEM15	Vector "shuttle" (9,5 kpb). Origen de replicación de <i>E. coli</i> y de Micobacterias. Contiene general <i>cli-lacZ'</i> desprovisto de sus secuencias regulatorias, precedido por sitio de clonamiento múltiples (MCS). Kan ^R	28
POS235	Gen <i>suoM</i> de <i>M. smegmatis</i> clonado en pUC118 como un fragmento Smal de 1090 pb que incluye toda la región codificante <i>suoM</i> y 407 pb de la región que precede el codón de iniciación de la traducción	23
pFsBP	Fragmento BamHI-PvuII de 526 pb que incluye 407 pb de región que precede el codón de iniciación de la traducción de <i>suoM</i> de <i>M. smegmatis</i> clonado en pJEM 15. Kan ^R .	Este estudio

construyó por inserción en el sitio SmaI de pUC118 (Tabla 1), de un fragmento SmaI de 1,084 Kpb aislado de una región localizada a una distancia de 10,4 Kpb precediendo el origen de replicación de *M. smegmatis* (23). El fragmento incluye el gen *suoM* y 407 pb de la región que precede el sitio de iniciación de la traducción. Para la obtención de los fragmentos a fusionar, este subclon fué digerido con enzimas apropiadas para obtener fragmentos de longitud variable (Figura 3). Todos los fragmentos con extremo 5' BamHI se ligaron al vector de fusión de operones pJEM15 (28), digerido con BamHI-KpnI, seguido de tratamiento con el fragmento Klenow de DNA polimerasa para la obtención de extremos planos y ligación subsecuente.

Las construcciones se introdujeron en *E. coli* para amplificación y análisis de ADN con enzimas de restricción. Una vez confirmadas por secuenciación, las fusiones transcripcionales se electroporaron en *M. smegmatis* y las transformantes se seleccionaron como colonias azules en placas 7H10-OADC-Tween 80 con kanamicina y X-Gal (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Para confirmar la presencia del plásmido, se sigue el procedimiento de electroducción descrito por Baulard y cols. (2).

5. Ensayos de actividad β -Galactosidasa

La actividad promotora de los fragmentos clonados se investigó a través de ensayos β -Galactosidasa siguiendo protocolos descritos previamente (18, 24). Para cada ensayo se mezclaron 201 μl de Buffer Fosfato de Sodio 0,1M pH 7.0, 30 μl de extracto libre de células obtenidas por sonicación (de las cepas con fusiones reporteras *psuoM-lacZ'*) y 3 μl de solución de Mg 100X (0,1M MgCl_2 , 4,5M -mercaptoetanol). Se preincubó la mezcla a 37°C por 10 min y se disparó la reacción por adición de 66 μl de ONPG 1X (4mg/mL en Buffer

Fosfato de Sodio 0,1 M, pH: 7,0). La reacción se detuvo por la adición de 500 μl de Na_2CO_3 1M. La actividad específica de la enzima se calculó mediante la fórmula: $U = 200 \times \text{D.O.}_{420\text{nm}}/\text{mg}$ de proteínas totales \times tiempo de reacción (24, 28). Unidades β -Galactosidasa = (mg de proteínas \times min) $^{-1}$. La determinación de proteínas totales se realizó por el Método de Bradford (3).

Resultados

1. Organización del locus *suoM* en *M. smegmatis*

El gen *suoM* ("sigma unido al origen de replicación") se identificó cuando se estaba analizando la secuencia de toda la región del origen de replicación de *M. smegmatis* (23). *suoM* está localizado a una distancia de aproximadamente 10,4 Kpb del origen de replicación Figura 1 y la comparación de este gen con la base de datos reveló su capacidad codificante para un factor sigma de la subfamilia ECF. *suoM* consta de 573 pb (192 codones), codificando una proteína de 191 aminoácidos con un PM aproximado de 21,5 Kda.

Precediendo al gen *suoM* se identificó el gen *pknC* con capacidad codificante para una serin-treonin quinasa tipo eucariota Figura 1. Muy próximo a *suoM* se localiza un *orf2* que codifica una proteína de 260 aminoácidos (~28Kd) que no muestra homología con alguna proteína conocida de la base de datos. Adyacente a *orf2*, se encuentra el gen *trxB*, codificando la enzima tioredoxin reductasa.

2. Selección de fragmentos con actividad promotora

Para localizar los fragmentos de máxima actividad promotora de *suoM*, se construyeron varias fusiones transcripcionales *psuoM-lacZ'* sobre el vector pJEM15 (28), un plásmi-

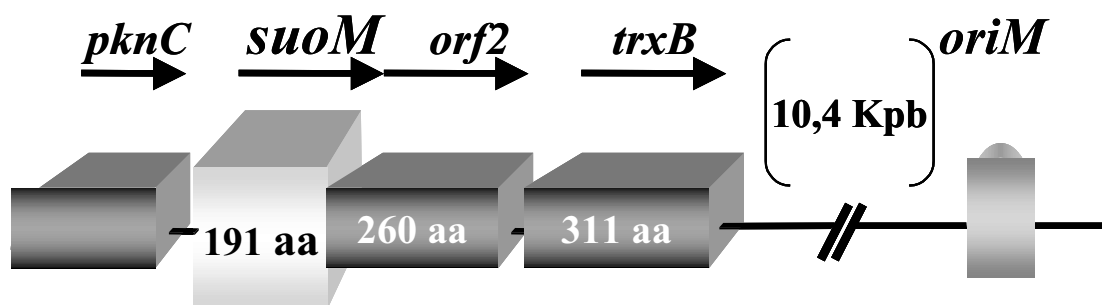


Figura 1. Organización genómica del locus *suoM* de *M. smegmatis*. Las flechas indican la orientación transcripcional de cada gen. En el interior de los recuadros, se señala tamaño del producto génico. La identidad de los productos se asigna por criterios de homología de secuencias con proteínas conocidas de la base de datos. Esta organización es conservada en *M. tuberculosis*, donde *suoM* corresponde al orf RV3911.

do de fusión de operones que contiene el gen *lacZ'* sin promotor, de manera que la expresión de β -Galactosidasa queda bajo el control de secuencias clonadas en el sitio de clonamiento múltiple Figura 2. Se clonaron fragmentos de longitud variable de la región precediendo el sitio de iniciación de la traducción de *suoM*. Cada una de las fusiones *psuoM-lacZ'* se introdujeron por electroporación en *M. smegmatis* y se ensayó la actividad -Galactosidasa en las cepas transformadas.

En la Figura 3 se observa que exceptuando la fusión pFsNH, que corresponde a 263 pb de región codificante de *suoM*, todos los fragmentos clonados en pJEM15, apoyan la expresión de *lacZ'*, demostrando la presencia de secuencias con actividad promotora en dichos fragmentos. Todas estas fusiones incluyen 407 pb de la región 5' regulatoria de *suoM*, variando únicamente la longitud de región codificante, sin embargo, éstas muestran diferencias marcadas en los niveles de actividad β -Galactosidasa, que van desde 4 hasta 9,5 veces por encima de valores control (pJEM15). En el caso particular de la fusión pFsBP (fragmento BamHI-PvuII), ésta resultó 1,5 veces mayor que pFsBM (fragmento BamHI-MLuI), aunque varían solo en 36 pb de región codificante.

3. Condiciones ambientales que inducen la actividad promotora de *suoM-lacZ'*

Para ensayar los cambios en la expresión de *suoM* se seleccionó la fusión pFsBP, debido a que exhibió la máxima actividad promotora. La expresión de *suoM-lacZ'* se estudió en cepas de *M. smegmatis* transformadas con fusiones (pFsBP) sometidas a diversas condiciones de estrés, a fin de reproducir de una manera aproximada algunos de los microambientes adversos, a los cuales se exponen las bacterias patógenas en tejidos del hospedador (7, 17) e identificar cual o cuales de estas condiciones estimulan la actividad promotora de *suoM-lacZ'*.

Se observó máxima inducción de la expresión de *psuoM* a alta temperatura y en fase estacionaria de crecimiento. La actividad promotora de *psuoM-lacZ'*, medida como actividad β -Galactosidasa, resultó en un incremento de aproximadamente 2 veces a alta temperatura y alcanzó valores máximos de expresión (3,3 veces) en fase estacionaria de crecimiento Figura 4.

Cuando los cultivos se sometieron a medios de estrés conteniendo H_2O_2 5mM, SDS 0,01% y NaCl 2,4% se observa una disminución de la actividad promotora de aproxima-

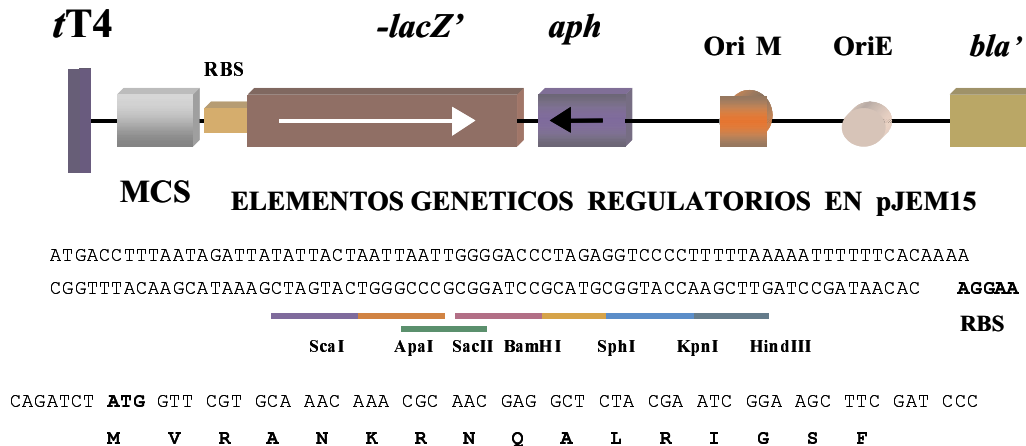


Figura 2. Plásmido multicopia (pJEM15) utilizado para la construcción de Fusiones Transcripcionales p-*lacZ'*. Se indican los elementos genéticos regulatorios de pJEM15 que permiten estudiar la actividad promotora de fragmentos insertados en el sitio de clonamiento múltiple (MCS). Este último es seguido del gen *lacZ* desprovisto de su región 5' regulatoria (*lacZ'*). Posee un sitio de unión del ribosoma sintético (sRBS) que permite la apropiada traducción del mRNA de *lacZ*. Se muestra la secuencia del sitio de clonamiento múltiple y los primeros codones de *lacZ* (Timm y cols., 1994).

damente 50%, 30% y 20% respectivamente. La baja disponibilidad de nutrientes no parece ser un estímulo para la regulación de la expresión de *suoM*, ya que los cultivos incubados en un medio basal de sales (MBS) exhiben valores de actividad β -Galactosidasa comparables a aquellos obtenidos de cultivos creciendo exponencialmente en medio rico (7H9-OADC) Figura 4.

Discusión

En el locus *suoM* localizado en la región del origen de replicación de *M. smegmatis*, se localizan genes que pudieran estar cumpliendo un papel muy importante en la regulación y la respuesta a estrés mediada por *suoM*. Será importante explorar la posible relación entre *suoM* y los genes adyacentes. El interés en el *orf2* obedece a que en algunos de los operones ECF se localizan sus propios reguladores negativos (13, 19, 20, 22). En el caso del gen *trxB*, hay un antecedente muy impor-

tante de regulación de genes *trx* por el factor σ^R (21) cuyo gen *sigR*, también se localiza en la región del origen de replicación en *Streptomyces coelicolor* (8), una especie estrechamente relacionada con micobacterias. Se conoce que los sistemas TR-Trx proveen equivalentes reductores a la enzima ribonucleótido reductasa, contribuyendo a la síntesis de ADN, sin embargo, más recientemente se ha resaltado el papel de este sistemas redox en mecanismos de supervivencia de la célula bacteriana expuesta a medios oxidativos y a múltiples condiciones de estrés (25).

Así mismo resulta de gran interés el gen *pknC*, precediendo a *suoM*, que codifica una serin-treonin quinasa tipo eucariota Figura 1. En *B. subtilis*, las señales ambientales que activan la proteína σ^B , un factor sigma de respuesta a estrés, son traducidas por pares de serin-treonin quinasa y fosfatasa (1). Se requieren otros enfoques genéticos y bioquímicos que permitan identificar el sustrato y el par fosfatasa del producto de *pknC*.

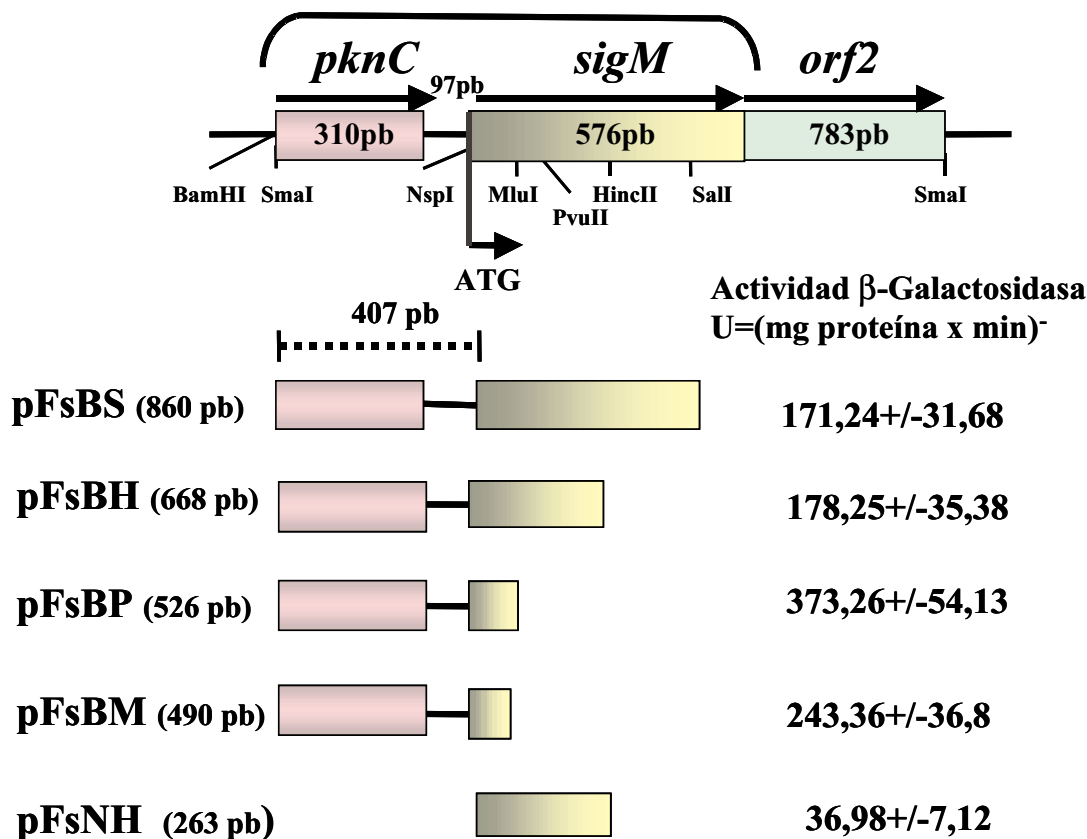


Figura 3. Mapa de restricción del subclon pOS235 y construcción de fusiones transcripcionales *psuoM-lacZ'* de *M. smegmatis*. Los fragmentos 5' de *suoM* clonados en pJEM15 fueron: BamHI-SalI (pFsBS); BamHI-HincII (pFsBH); BamHI-PvuII (pFsBP), todos incluyendo 407 pb de región 5' regulatoria, excepto NspI-HincII (pFsNH). La longitud de los fragmentos clonados se muestra entre paréntesis. En la columna de la derecha se muestra la actividad β -galactosidasa de cada una de las fusiones *psuoM-lacZ'*. Se muestran valores promedios \pm desviaciones estándar de 3 a 5 ensayos independientes.

Los resultados demostraron actividad promotora en la región precediendo el sitio de iniciación de la traducción de *suoM* Figura 3. Como era de esperar de la estructura del gen, la fusión pFsNH no apoyó la expresión de β -Galactosidasa debido a que el fragmento clonado contiene solo región codificante de *suoM* (263 pb). Las diferencias significativas observadas en los niveles de actividad β -Galactosidasa entre las fusiones *psuoM-lacZ'* que solo varían en porción codificante, podrían atribuirse a regiones de iniciación de la traducción de ARNm de *lacZ'* mas o menos

accesibles. De hecho, además de localizar regiones conteniendo el promotor, la exploración de diferentes fragmentos de longitud variable, nos permite seleccionar aquellas fusiones con una eficiente traducción de *lacZ*.

Estas variaciones han sido documentadas en la literatura. Linn y Pierre (14) reportaron que una fusión transcripcional p-*lacZ'* con una actividad β -Galactosidasa de 1200U Miller, incrementaba a 3250U Miller, después de removerle 6 pb al extremo 3' del fragmento clonado antes de *lacZ'*. Al analizar la estructura secundaria de los híbridos de

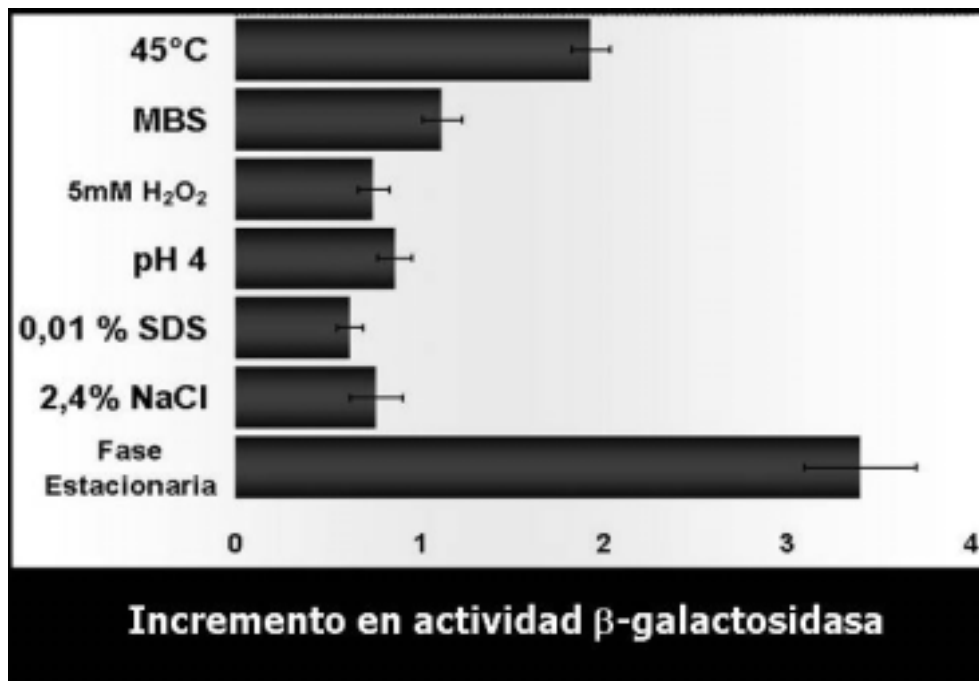


Figura 4. Incremento relativo de actividad promotora de fusiones transcripcionales *psuoM-lacZ'* en cepas de *M. smegmatis* sometidas a condiciones de estrés. El valor 1 fue asignado al valor de Actividad -Galactosidasa obtenido para la cepa control creciendo exponencialmente en medio rico a 37°C. Se muestran valores promedios +/- desviaciones estándar de 3 a 5 ensayos independientes.

ARNm de las dos fusiones transcripcionales, encontraron que el primero formaba una estructura secundaria muy estable que secuestraba el RBS y el codón de iniciación de la traducción de *lacZ'*, mientras que estos elementos, requeridos para una eficiente traducción de *lacZ'*, eran accesibles en el ARNm resultante después de remover los 6 pb. Concluyeron que las características de secuencias clonadas precediendo a *lacZ'*, afectan la eficiencia de su traducción.

En este trabajo se demostró inducción de la expresión de *suoM* por altas temperaturas. Al igual que *suoM*, en micobacterias también se ha reportado la inducción por altas temperaturas de los genes *sigB* (9, 11), *sigE* (30) y *sigH* (6), todos codificando factores sigma de estrés. Recientemente se ha señalado el posible papel de *sigE* en el potencial patológico de micobacterias, debido a que una

cepa de *M. tuberculosis* mutante *sigE*⁻ resultó más sensible a diversas condiciones de estrés y exhibió una disminución en su capacidad en crecer en el interior de macrófagos (16). Adicionalmente se encontró que la expresión de *sigB* es parcialmente dependiente de un gen *sigE* funcional, lo cual sugiere la posibilidad de cascadas de regulación entre factores sigma en micobacterias.

Es factible que en micobacterias existan múltiples mecanismos de respuesta a estrés térmico, lo cual puede involucrar solapamiento y/o cooperación funcional entre los regulones controlados por estos factores sigma. Para discriminar entre estas dos posibilidades es necesario identificar los genes de choque térmico controlados por cada uno de estos factores sigma.

La inducción del transcrito *suoM* cuando las células alcanzan fase estacionaria de

crecimiento, sugiere que este gen puede ser importante en los cambios adaptativos experimentados por micobacterias cuando cesa el crecimiento exponencial, sin embargo, son tan profundos los cambios en la fisiología bacteriana en fase estacionaria, que resulta difícil proponer alguna señal generada en fase estacionaria que estimule la transcripción de *suoM*. Recientemente, en cultivos de *M. smegmatis* en fase estacionaria, se han reportado ciclos de división reductiva, incremento en la estabilidad del ARN estable y en la resistencia a condiciones de estrés (26), lo que en otros organismos se ha denominado “respuesta general a estrés de fase estacionaria” (10, 12).

Probablemente la inducción de *suoM* en fase estacionaria, mas que cumplir funciones de defensa a estrés general, como se ha sugerido para SigF, el factor sigma de fase estacionaria en micobacterias (4, 5), pudiera estar controlando respuestas a señales de estrés específicas, por ejemplo, desnaturalización de proteínas, que son señales generadas durante el crecimiento estacionario, comunes a aquellas de choque térmico, condición que también induce la expresión de *suoM*.

Dada la importancia de la respuesta a estrés en la supervivencia y en el potencial virulento señalado en diversos géneros bacterianos, resulta de interés identificar y caracterizar genes de los regulones controlados por *suoM*, los cuales podrían estar participando en el establecimiento de infección y persistencia de especies de micobacterias patógenas en hospedadores humano y animal.

Conclusiones

El gen *suoM*, localizado en la región del origen de replicación de Micobacterias, com-

parte características estructurales y funcionales con los factores sigma de la subfamilia ECF y podría controlar regulones involucrados en mecanismos de defensa, adaptación o reparación de daños causados por condiciones de estrés térmico o cuando cesa el crecimiento exponencial en micobacterias, condiciones inductoras que podrían tener algún significado en el potencial patogénico de micobacterias y en la habilidad de *M. tuberculosis* para causar infección latente.

Referencias Bibliográficas

- (1) Akbar S., Gaidenko, T.A., Kang C.M. O'Reilly M., Devine K.M. Price C.W. New family of regulators in the environmental signaling pathway which activates the general stress transcription factor sigma (B) of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 2001; 183: 1329-1338.
- (2) Baulard A., Jourdan, C., Mercenier A., Loch, C. Rapid mycobacterial plasmid analysis by electrofusion between *Mycobacterium* spp. and *Escherichia coli*. *Nucleic. Acids. Res.* 1992; 20: 4105-4110.
- (3) Bradford M.M: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976; 72: 248-254.
- (4) Chen P., Ruíz R.E., Li Q., Silver R.F, Bishai, W.R. Construction and characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* mutant lacking the alternate sigma factor gene, sigF. *Infect. Immun.* 2000; 68: 5575-5580.
- (5) Demaio J., Zhang Y., Ko Ch., Young D.B., Bishai W.R: A stationary-phase stress-response sigma factor from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1996; 93: 2790-2794.
- (6) Fernandes N.D., Wu Q.L., Kong D., Puyang X., Garg S., Husson R.N. A mycobacterial extracytoplasmic sigma factor involved in survival following heat shock and oxidative stress. *J. Bacteriol.* 1999; 181: 4266-4274.

- (7) Finlay B.B., Falkow S: Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 1997; 61: 136-169.
- (8) Gal-Mor O., Borovok I. AV-Hay Y., Cohen, G., Aharonowitz Y: Gene organization in the *trxA/B-oriC* region of the *Streptomyces coelicolor* chromosome and comparison with other eubacteria. *Gene* 1998; 217: 83-90.
- (9) Gomez J.E., Chen J-M., Bishai W.R: Sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber. Lung. Dis.* 1997; 78: 175-183.
- (10) Hengge-aronis R. Interplay of global regulators in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* 1999; 2: 148-152.
- (11) Hu Y., Coates A.R.M: Transcription of two sigma 70 homologue genes, sigA and sigB, stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* 1999; 181: 469-476.
- (12) Kolter R: Guest commentary. Growth in studying the cessation of growth. *J. Bacteriol.* 1999; 181: 697-699.
- (13) Kormanec J., Sevcikova B., Halgasova N., Knirschova R. and Rezuchova, B: Identification and transcriptional characterization of the gene encoding the stress-response sigma factor sigma(H) in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *FEMS Microbiol. Lett.* 2000; 189: 31-38.
- (14) Linn T., ST. Pierre R: Improved vector system for constructing transcriptional fusions that ensures independent translations of *lacZ*. *J. Bacteriol.* 1990; 172: 1077-1084.
- (15) Lonetto M.A., Brown K. I., Rudd K.B., Buttner M.J: *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994; 91: 7573-7577.
- (16) Manganelli R., Voskuil M., Schoolnik G., Smith I: The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigmaE: role in global gene expression and survival in macrophages. *Mol. Microb.* 2001; 41: 423-437.
- (17) Mekalanos J.J: Environmental signals controlling virulence determinants in bacteria. *J. Bacteriol.* 1992; 174: 1-7.
- (18) Miller J.H: *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor. New York (USA), 1972.
- (19) Missiakas D., Raina S: The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol. Microbiol.* 1998; 28: 1059-1066.
- (20) Missiakas D., Mayer M., 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. Microb.* 1997; 24: 355-371.
- (21) Paget M.S.B., Kang Ju-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.* 1998; 17: 5776-5782.
- (22) Rowen D.W., Deretic, V: Membrane-to-cytosol redistribution of ECF sigma factor AlgU and conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* isoates from cystic fibrosis patients. *Mol. Microbiol.* 2000; 36: 314-327.
- (23) Salazar L., Fsihi H., De Rossi E., Riccardi G., Rios C., Cole S.T., Takiff H.E: Organization of the origins of replication of the chromosomes of *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium leprae* and *Mycobacterium tuberculosis* and isolation of a functional origin from *M. smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 1996; 20: 283-293.
- (24) Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T: *Molecular cloning: a Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (USA), 1989.
- (25) Scharf C. Riethdorf S. M., Ernst H., Engelmann S., Volker U., Hecker M: Thioredoxin is an essential protein induced by multiple stresses in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180: 1998; 1869-1877.
- (26) Smeulders M.J., Keer J., Speight, R.A., Williams H.D: Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to stationary phase. *J. Bacteriol.* 1999; 181: 270-283.
- (27) Snapper S.B., Melton R.E., Mustapha S., Kieser T., Jacobs W.R: Isolation and Characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 1990; 4: 1911-1919.

- (28) Timm J., Lim, E.M., Gicquel B: *Escherichia coli*-Mycobacteria shuttle vectors for operon and gene fusions to *lacZ*: the pJEM series. *J. Bacteriol.* 1994; 176: 6749-6753.
- (29) Wei Z., Beer S.V: *hrpL* activates *Erwinia amylovora hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of factors. *J. Bacteriol.* 1995; 177: 6201-6210.
- (30) Wu Q.L., Kong D., Lam K., Husson, R.N: A mycobacterial extracytoplasmic function sigma factor involved in survival following stress. *J. Bacteriol.* 1997; 179: 2922-2929.
- (31) Yu H. Boucher J.C., Hibler N.S., Deretic, V. Virulence properties of *Pseudomonas aeruginosa* lacking the extreme-stress sigma factor AlgU (σ^E). *Infect. Immun.* 1996; 64: 2774-2781.