

Factores sigma y respuesta a estrés en micobacterias (Revisión)

Sigma Factors and Stress Reactions in Micobacterias (Review)

Arráiz, Nailet

¹ Doctor en Ciencias Biológicas. Facultad de Medicina. Universidad del Zulia. E-mail: narraiz@cantv.net

Introducción

La transcripción de genes en células procariotas es llevada a cabo por la holoenzima ARN polimerasa (ARNP). La purificación y caracterización bioquímica de esta enzima ha permitido identificar dos componentes principales: el denominado “núcleo” de la ARNP y el factor sigma Figura 1.

El núcleo es un complejo multiproteico constituido por las subunidades α_2 , β , y β' con afinidad de unión a cualquier secuencia de ADN y posee actividad polimerizante. El factor sigma (σ) se asocia transitoriamente con el “núcleo” de la ARNP e incrementa la afinidad de la holoenzima por secuencias promotoras específicas de genes e inmediatamente después de la iniciación, el factor sigma se disocia dejando un “núcleo” procesivo que elonga el transcrito naciente.

Los factores sigma principales, tales como σ^{70} en *E. coli* y σ^{43} en *B. subtilis* (11, 15) promueven la transcripción de genes esen-

ciales para la célula en crecimiento exponencial. Adicionalmente en la mayoría de especies bacterianas se han identificado factores sigma alternativos que controlan la transcripción de genes relacionados con diversos procesos celulares, cuyas secuencias promotoras son muy diferentes a aquellas reconocidas por los factores sigma principales (1, 2, 17, 21, 35).

El análisis comparativo de las secuencias de aminoácidos de factores sigma incluidos en la base de datos y la exploración de algunas de sus características regulatorias han revelado la existencia de un subgrupo de factores sigma que tienen en común la característica de regular la expresión de genes en respuesta a estímulos extracitoplasmáticos. Dada la similaridad estructural y equivalencia funcional de estos factores sigma, fueron designados colectivamente subfamilia ECF, por “extracytoplasmic function” (21, 24).

La Tabla 1 presenta una lista de los factores sigma de la subfamilia ECF identifica-

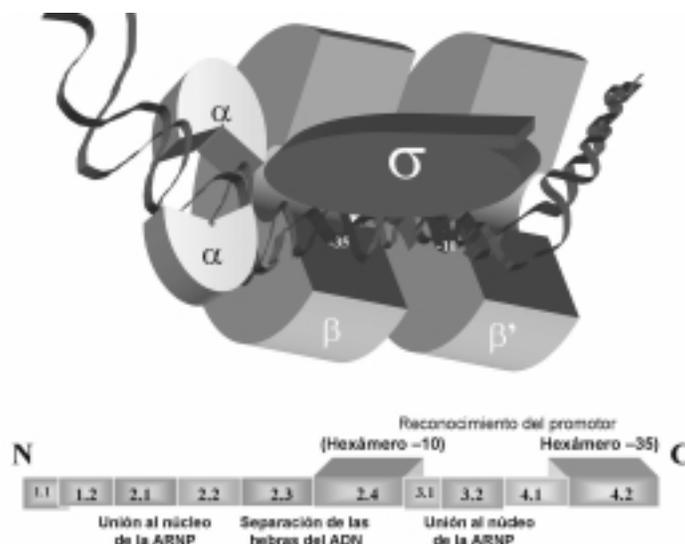


Figura 1. Representación esquemática de la Holoenzima ARN polimerasa y su interacción con el Promotor. La subunidad sigma (σ) se asocia con el núcleo de la ARNP (α 2, β y β') y le confiere especificidad de reconocimiento del promotor. En las proteínas sigma se reconocen regiones y subregiones conservadas, las cuales se acomodaron en este modelo para ilustrar su relación estructura-función. Se indican las regiones -10 y -35 del promotor de un gen que son reconocidas por las subregiones 2.4 y 4.2 respectivamente, de la subunidad sigma, pero aún no se conoce la disposición espacial de en la holoenzima. En la parte inferior se especifica la función de cada una de las subregiones de los polipéptidos sigma. N y C indican extremos amino y carboxiterminal de la proteína.

dos hasta el presente en diversos géneros bacterianos, algunos de ellos han sido parcialmente caracterizados desde el punto de vista regulatorio y se ha identificado un pequeño número de genes que forman parte de los regulones controlados por estos factores sigma, algunos de los cuales han sido señalados como factores de virulencia o supervivencia bacteriana (20, 24, 26, 32, 36, 38).

Recientemente se publicó la secuencia total del genoma de la cepa de referencia de *M. tuberculosis* H37Rv (7), el cual incluye 4.411.529 pb (4.4 Mb) con un alto contenido en guanina y citosina. Se identificaron 3924 marcos de lectura que explican aproximadamente el 91% del potencial codificante.

La secuencia del genoma de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv (7) reveló la presencia de 13 marcos de lecturas con capaci-

dad codificante para factores sigma Figura 2 y Tabla 2. Por criterios estructurales y funcionales uno de ellos, *sigA* (*mysA*) se ha reconocido como el factor sigma principal; *sigB*, homólogo estructural de *sigA*, parece ser importante para la supervivencia celular en determinadas condiciones adversas para la célula, mientras que *sigF* parece jugar un papel clave en fase estacionaria de crecimiento y su secuencia es homóloga a factores sigma de esporulación en otros organismos. Los 10 factores sigma restantes se han incluido en la subfamilia ECF, de los cuales únicamente se ha reportado la importancia funcional de σ^E y σ^H .

A pesar de la importancia clínica de algunas micobacterias patógenas, comparadas con otras bacterias, se conoce relativamente poco de la maquinaria transcripcional micobacteriana, por lo cual con esta información

Tabla 1. Factores sigma alternativos de la subfamilia ECF.

Designación Proteína/Gen	Organismo	Genes que regula y Función	Inducción
σ^E / <i>rpoE</i>	<i>Escherichia coli</i>	Dirige su propia transcripción. (operón <i>rpoE-rseA-rseB-rseC</i>). Genes <i>rpoH</i> , (factor sigma de choque térmico); <i>htrA</i> (serín proteasa periplásmica) requerido para resistencia a altas temperaturas y <i>fkpA</i> (involucrado en plegamiento de proteínas)	Alteraciones de proteínas de membrana externa y altas temperaturas
AlgU/ <i>algU</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Dirige su propia transcripción (operón <i>algU- mucA- mucB- mucC-mucD</i>). Controla genes de ruta biosintética del alginato. Regulación global de respuesta a condiciones de estrés	Intermediarios de oxígeno reactivo y altas temperaturas
σ^E / <i>rpoE</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	Dirige su propia transcripción. Gen <i>htrA</i> , requerido para resistencia a estrés oxidativo y muerte por macrófagos	Intermediarios de oxígeno reactivo
σ^E / <i>sigE</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Genes <i>dagA</i> , que codifica para una agarasa extracelular; <i>hrdD</i> (un factor sigma del grupo II de función desconocida). Controla funciones relacionadas con la integridad de la pared celular.	Deficiencia en Mg ⁺²
RpoE/ <i>rpoE</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	Operón <i>rpoE-mclA-mucB</i> . Se desconoce su función	No determinado
FecI/ <i>fecI</i>	<i>Escherichia coli</i>	Genes involucrados en el transporte de dicitrato férrico	Limitación de hierro y citrato en el espacio periplásmico
CarQ/ <i>carQ</i>	<i>Myxococcus xanthus</i>	Dirige su propia transcripción. Operón <i>carQRS</i> : genes reguladores de la biosíntesis de carotenoides localizados en membrana	Luz (absorbida por protoporfirina IX en membrana)
CnrH/ <i>cnrH</i>	<i>Alcaligenes eutrophus</i>	Operón <i>cnr</i> : genes de un sistema de eflujo localizado en membrana que confiere resistencia a iones níquel y cobalto	Iones níquel y cobalto

Tabla 1. Factores sigma alternativos de la subfamilia ECF (Continuación).

Designación Proteína/Gen	Organismo	Genes que regula y Función	Inducción
σ^E / <i>rpoE</i>	<i>Escherichia coli</i>	Dirige su propia transcripción. (operón <i>rpoE-rseA-rseB-rseC</i>). Genes <i>rpoH</i> , (factor sigma de choque térmico); <i>htrA</i> (serín proteasa periplásmica) requerido para resistencia a altas temperaturas y <i>fkpA</i> (involucrado en plegamiento de proteínas)	Alteraciones de proteínas de membrana externa y altas temperaturas
HrpL/ <i>hrpL</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> <i>pv.</i> <i>syringae</i>	Genes <i>hrp</i> (por “hypersensitive response in plants”), que codifican determinantes de virulencia en plantas y proteínas del aparato de secreción	Factores de plantas, osmolaridad, pH, fuentes de carbono, nitrógeno
PbrA/ <i>pbrA</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> M114	Síntesis de sideroporo pseudobactina M114 y su receptor requeridos para la asimilación de hierro	Limitación de Fe ⁺⁺⁺
PupI/ <i>pupI</i>	<i>Pseudomonas putida</i> WCS358	Síntesis de sideroporos: pseudobactinas BN8, BN7 y su receptor requeridos para la asimilación de hierro	Limitación de Fe ⁺⁺⁺
HrpL/ <i>hrpL</i>	<i>Erwinia amylovora</i>	Genes <i>hrp</i> que codifican determinantes de virulencia en plantas susceptibles y proteínas del aparato de secreción.	Factores de plantas, pH, osmolaridad, fuentes de nitrógeno
σ^X / <i>sigX</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	Dirige su propia transcripción (operón <i>sigX-ypuN</i>). Genes requeridos para supervivencia a altas temperaturas	Temperaturas elevadas
AlgU/ <i>algU</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i>	Dirige su propia transcripción (operón <i>algU-mucA-mucB-mucC-mucD</i>). Genes de ruta biosintética del alginato y resistencia a estrés oxidativo	Intermediarios de oxígeno reactivo
RpoE/ <i>rpoE</i>	<i>Photobacterium sp.</i> SS9	Dirige su propia transcripción (operón <i>rpoE-orfs</i>). Regulan síntesis de proteínas de membrana externa requeridos para el crecimiento a altas altas presiones y bajas temperaturas	Temperaturas bajas y altas presiones (1 atm)

disponible, se espera un avance vertiginoso en el conocimiento de la regulación de la expresión de genes en micobacterias y su contribución a la capacidad de las mismas para adaptarse por largos periodos de tiempo en tejidos del hospedador.

Factores sigma en micobacterias

Predich y cols. (28) purificaron 2 ARN polimerasas de *M. smegmatis* e identificaron dos proteínas de pesos moleculares de 65 y 40 Kilodaltons (Kda), presumiblemente dos factores sigma que se encontraban en esta mezcla de RNA polimerasas. Al mismo tiempo, aislaron dos fragmentos de una genoteca de cósmidos de *M. smegmatis* que hibridizaban con una sonda

correspondiente a regiones conservadas del gen *hrdB*, el factor sigma principal de *S. coelicolor* (36). El patrón de restricción de uno de los cósmidos reveló la presencia de 2 genes homólogos separados por ~3000 pares de bases (pb). Estos genes, designados *mysA* y *mysB* mostraron capacidad codificante para dos factores sigma con pesos moleculares predichos de 52 Kda (466 aminoácidos) y 36 Kda (323 aminoácidos), correspondiendo a los pesos moleculares (PMs) de las proteínas separadas del núcleo de la ARNP, 65 y 40 Kda, y hoy conocidas como σ^A y σ^B , respectivamente. La homología de estas secuencias con proteínas de la base de datos confirmó la identidad de estas 2 proteínas como factores sigma de la familia Sigma 70, siendo la mas alta similitud entre MysA y HrdB de *S. coelicolor* (36). Este fue uno de los criterios utilizados para proponer la proteína MysA o σ^A como factor sigma principal de micobacterias.

Los genes *mysA* y *mysB* se utilizaron como sondas para aislar los genes correspondientes en *M. tuberculosis* y *M. leprae* (12). La organización genómica de estos genes es idéntica en las especies micobacterianas analiza-

das (Figura 2 y 3). La distancia intergénica entre *mysA* y *mysB* es de 3 Kilopares de bases (Kpb) para *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* y de 3.9 Kpb para *M. leprae*. Las proteínas σ^A de estas especies comparten un 99% a 100% de identidad en toda su extensión. La secuencia de aminoácidos de σ^B también es conservada, siendo 92% a 96% idénticas entre *M. smegmatis*, *M. tuberculosis* y *M. leprae* (12).

Como se observa en la Figura 3, otros marcos de lectura presentes en esta región incluyen un gen con capacidad codificante para una posible proteína de membrana, localizado entre *sigA* y *sigB*, y después de este último se identificó el gen *ideR*, un homólogo del gen *dtxR*, que codifica un represor para la captura de hierro y producción de toxina en *C. diphtheriae* (4, 33).

MysA o σ^A es el factor sigma principal

mysA (*sigA*) también fue identificado en *M. bovis* por Collins y cols. (8), utilizando técnicas de complementación "in vivo". El gen fue reportado como *rpoV* (por virulencia) debido a que éste fue aislado como un fragmento de ADN de una cepa virulenta de *M. bovis* Wag200 que confería virulencia a una cepa no virulenta (*M. bovis* ATCC35721) en un modelo animal. Se reportó que el marco de lectura de 1950 pb responsable de la complementación de virulencia, codificaba para un factor sigma de aproximadamente 60Kda (534 aminoácidos) que resultó idéntico a MysA de *M. tuberculosis* y 86% homólogo a MysA de *M. smegmatis*.

El fenotipo no virulento de la cepa de ATCC35721 se atribuyó a una mutación GuaninaAdenina que resulta en una sustitución de una arginina por histidina en posición 522 (R522H), ya que dicha mutación no se detectó en ninguna de las cepas virulentas del complejo

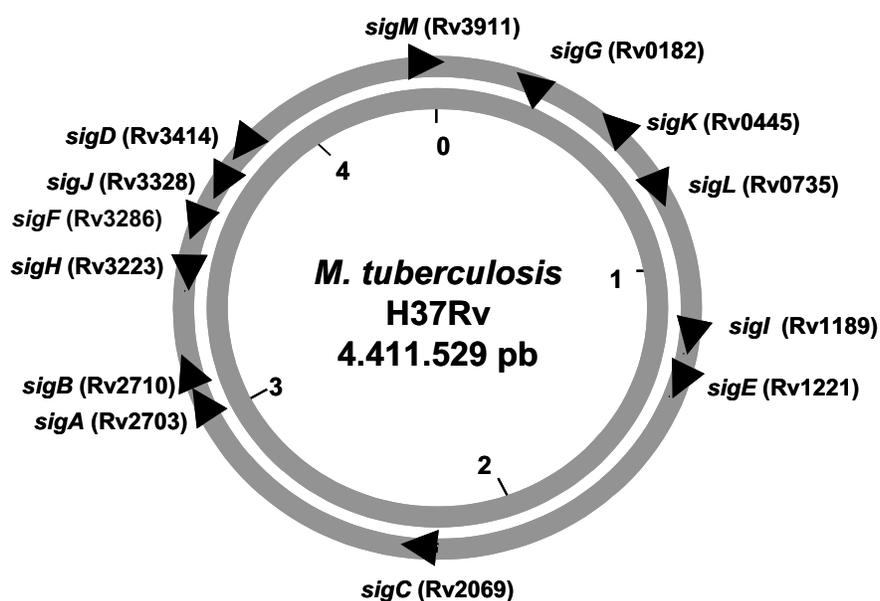


Figura 2. Posición relativa de los genes que codifican los 13 factores sigma identificados en el genoma de la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv. En el anillo interno se muestra la escala en megabases, donde 0 representa el primer nucleótido del primer codón del gen *dnaA* cerca del origen de replicación. DnaA se tomó como el primer ORF (Rv0001) y la designación de cada proteína mostrada entre paréntesis corresponde al orden secuencial de cada ORF en el mapa lineal del genoma. Las flechas indican la orientación transcripcional de los genes.

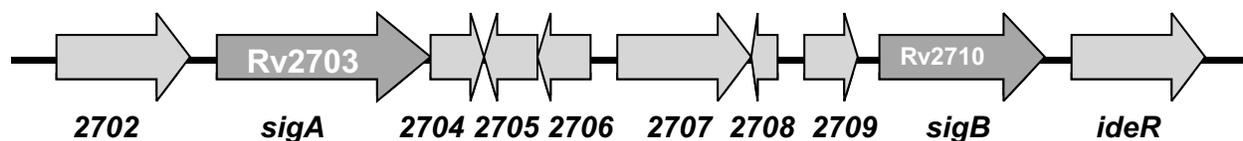


Figura 3. Organización genómica del locus conteniendo genes *mysA* (*sigA*) y *mysB* (*sigB*) en micobacterias. Se muestran las posiciones relativas de *sigA* y *sigB* y el gen *ideR* (*dtxR*), el determinante genético para el represor de captación de hierro. El *orf* RV2707 no tiene función conocida, pero su secuencia de aminoácidos es altamente hidrofóbica con 7 posibles dominios transmembrana. Los otros *orfs*, la mayoría sin función conocida, se designan de acuerdo a su posición en el mapa del cromosoma de *M. tuberculosis* H37Rv. Esta organización es conservada entre *M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, y *M. leprae*.

tuberculosis. La mutación mapea en un segmento de la subregión 4.2 (Figura 1) que parece estar involucrada en contactos entre factores sigma y proteínas activadoras. Entonces esta mutación podría bloquear interacciones apropiadas de σ^A con proteínas regula-

doras, resultando en la expresión defectuosa de un grupo de genes en esta cepa, algunos de los cuales podrían estar relacionados con funciones de supervivencia de la bacteria.

Una explicación alternativa para estos hallazgos, fue que σ^A podría ser un factor sig-

ma alternativo requerido para la expresión de genes de virulencia, sin embargo, recientemente Gomez y cols. (16) descartaron esta hipótesis al demostrar el carácter esencial de *sigA* y su expresión constitutiva. Estos autores intentaron inactivar el gen *sigA* por reemplazo alélico, utilizando cepas de *M. smegmatis* haploides y merodiploides para *sigA* (con dos copias de *sigA*). Demostraron que el reemplazo alélico de la copia silvestre *sigA* por una copia *sigA* mutada ocurrió solo en las cepas merodiploides, es decir, *sigA* no puede ser interrumpido, a menos que una segunda copia esté presente en otro lugar del cromosoma.

Entonces, SigA o MysA es considerado el factor sigma principal de Micobacterias, basándose tanto en la homología de secuencia con factores sigmas principales (12, 28) así como su carácter esencial para la supervivencia celular (16). Consistente con esto, la expresión *sigA* se mantiene constante durante todas las fases de crecimiento en *M. smegmatis* y en células de *M. tuberculosis* sometidas a diversas condiciones de estrés Tabla 2 (18).

MysB es un factor sigma alternativo

La transcripción de *sigB* en *M. tuberculosis* incrementa significativamente cuando el bacilo entra en fase estacionaria y cuando es sometido a una variedad de condiciones de estrés Tabla 2, particularmente en casos de deprivación de nutrientes, altas temperaturas, exposición a detergentes y anaerobiosis (18, 23). Los hallazgos sugieren que σ^B controla un regulón importante en fase estacionaria de crecimiento y respuesta a estrés. La mutación del gen *sigB* en una cepa de *M. smegmatis* resulta en disminución de la supervivencia de esta cepa al ser sometida a condiciones de estrés oxidativo y altas temperaturas.

SigF: un factor sigma de fase estacionaria

De Maio y cols. (9), utilizando oligonucleótidos degenerados dirigidos a la secuencia de regiones conservadas 2.1-2.4 y 4.1-4.2 de los factores sigma de la familia σ^{70} Figura 1, aislaron un fragmento de ADN de *M. tuberculosis*, cuya secuencia resultó homóloga a los factores sigma de esporulación SigF de *S. coelicolor* y *B. subtilis*, así como al factor SigB de *B. subtilis*, un factor sigma de respuesta a estrés bien caracterizado (1). *sigF* fue detectado por "Southern blot" solo en micobacterias de crecimiento lento como *M. bovis*, *M. avium*, y *M. triviale*.

Estudios de la expresión de este gen en *M. bovis* BCG (Figura 2 y Tabla 2), demuestran que *sigF* es fuertemente inducido en fase estacionaria de crecimiento, depleción de nitrógeno y baja temperatura, aunque también se observó una débil inducción en anaerobiosis y estrés alcohólico (9). A través de un análisis de expresión de este gen en *M. tuberculosis*, se reportó poca o ninguna inducción de *sigF* en las condiciones mencionadas (23). La contradicción entre estos reportes podría ser explicada por diferencias en la regulación de *sigF* entre ambas especies micobacterianas o más probablemente por diferencias en las condiciones experimentales.

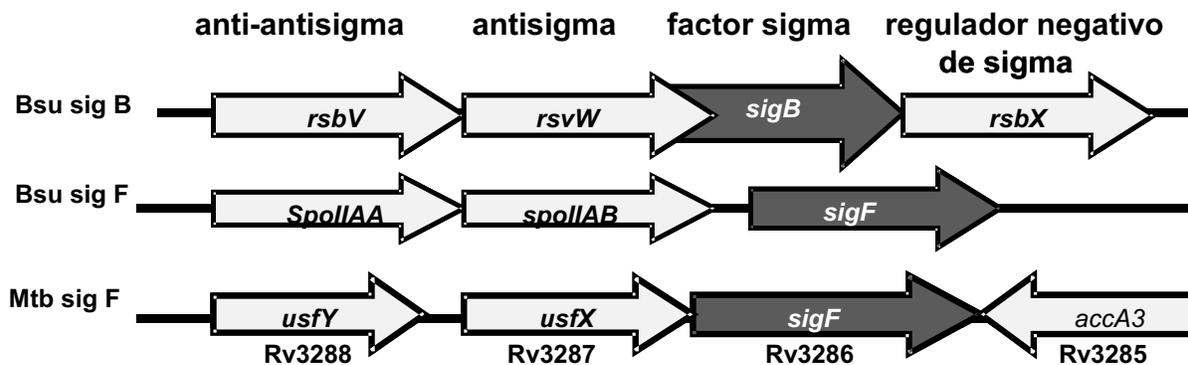
Como se muestra en la Figura 4, en la región que precede a *sigF* y en la misma orientación transcripcional se distinguen 2 marcos de lectura designados *usfY* y *usfX*, por genes "upstream" de *sigF* (10). UsfX exhibe identidad de secuencia de 19% con RsbW y 13% con SpoIIAB, los factores antisigma caracterizados de las proteínas σ^B y σ^F de *B. subtilis*, respectivamente (5, 13). Las proteínas antisigma se asocian con los factores sigma y lo mantienen en un complejo inactivo para actividad

Tabla 2. Factores sigma en Micobacterias.

Proteína	PM en Mtb	Especies donde se ha reportado	Función	Condición inductora	Referencia
<i>sigA</i> / σ^A (MysA)	59 Kda (528 aa)	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> <i>M. leprae</i> <i>M. smegmatis</i>	Factor sigma principal	Expresión constitutiva. Ligera disminución en fase estacionaria de crecimiento	7,12,16,18,23,28
<i>sigB</i> σ^B (MysB)	36 Kda (323 aa)	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> <i>M. leprae</i> <i>M. smegmatis</i>	Resistencia a estrés oxidativo, alta temperatura y detergente.	Alta temperatura y exposición a detergente. Ligera inducción en anaerobiosis y fase estacionaria de crecimiento	7, 12, 6, 18, 23, 28
<i>sigC</i> / σ^C	24,6 Kda (222 aa)	<i>M. tuberculosis</i>	ECF Función desconocida	Transcritos elevados en fase exponencial de crecimiento	7, 23
<i>sigD</i> / σ^D	25 Kda (224 aa)	<i>M. tuberculosis</i>	ECF Función desconocida	Niveles bajos de expresión en todas las condiciones de estrés ensayadas	7,23
<i>sigE</i> / σ^E	28,9 Kda (257 aa)	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> <i>M. leprae</i> <i>M. smegmatis</i>	ECF Resistencia a stress oxidativo, alta temperatura detergente y pH ácido	Alta temperatura y exposición a detergente. Ligera inducción en anaerobiosis y fase estacionaria de crecimiento	7,22,23,37
<i>sigF</i> / σ^F	30 Kda (261 aa)	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. bovis</i> <i>M. leprae</i> <i>M. avium</i> <i>M. triviale</i>	Fase estacionaria relacionado con factores sigma de esporulación y estrés de <i>S. coelicolor</i> y <i>B. subtilis</i>	Se induce en varias condiciones de estrés, particularmente en fase estacionaria de crecimiento	6,7,9,10,23
<i>sigG</i> / σ^G	41 Kda (370 aa)	<i>M. tuberculosis</i>	ECF Función desconocida	Niveles bajos de expresión en todas las fases de crecimiento y condiciones ensayadas	7,23

Tabla 2. Factores sigma en Micobacterias (Continuación).

Proteína	PM en Mtb	Especies donde se ha reportado	Función	Condición inductora	Referencia
<i>sigH</i> , σ^H	24 Kda (216 aa)	<i>M. tuberculosis</i>	ECF Función desconocida	Alta temperatura	7,14,23,30
<i>sigI</i> / σ^I	32 Kda (290 aa)	<i>M. tuberculosis</i>	ECF Función desconocida.	Temperatura ambiente	7,23
<i>sigJ</i> / σ^J	35 Kda (312 aa)	<i>M. tuberculosis</i>	ECF Función desconocida	No determinado	7
<i>sigK</i> / σ^K	31 Kda (286 aa)	<i>M. tuberculosis</i>	ECF Función desconocida	No determinado	7
<i>sigL</i> / σ^L	20 Kda (177 aa)	<i>M. tuberculosis</i>	ECF Función desconocida	No determinado	7
<i>sigM</i> / σ^M	25 Kda (222 aa)	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. smegmatis</i> <i>M. bovis</i> BCG	ECF Resistencia a estrés térmico y oxidativo	Alcanza máximos niveles a altas temperaturas y en fase estacionaria de crecimiento	2,3,7

**Figura 4.** Organización genómica de la región de *sigF* y comparación con la organización de los genes homólogos *sigB* y *sigF* de *B. subtilis*. En la parte superior se identifica el orden de los productos génicos anti-antisigma, antisigma, factor sigma encontrados en los genes *sigB* y *sigF* de *B. subtilis*. El gen *accA* codifica una proteína transportadora de acil-biotina.

transcripcional, adicionando un nivel regulatorio post-traduccional en la expresión de genes (5, 25).

En *B. subtilis*, a esta red regulatoria se suman los productos de los genes *rsbV* y *spoIIAA* localizados en los mismos operones de *sigB* y *sigF*, respectivamente Figura 4, que codifican productos antagonistas de los factores antisigma, por lo cual son conocidos como factores anti-antisigma. Estos se asocian a los factores antisigma, inhibiendo su interacción con el factor sigma correspondiente. En consecuencia, el factor sigma queda disponible para dirigir la transcripción de genes de sus regulones. Este esquema regulatorio descansa en la asociación alternativa del factor antisigma con las proteínas sigma o anti-antisigma, dependiendo del estado de fosforilación de esta última.

La similaridad de secuencia de UsfX micobacteriano con los factores

antisigma de *B. subtilis*, sugiere un mecanismo regulatorio parcialmente equivalente. De hecho, se ha demostrado que UsfX purificado inhibe la transcripción dependiente de σ^F *in vitro* (10). UsfY no tiene homología con ningún producto conocido de la base de datos y este gen es precedido por una secuencia homóloga a los promotores dependientes de σ^F de *B. subtilis*.

La importancia de σ^F en la respuesta a estrés y aspectos fisiológicos relacionados con fase estacionaria en micobacterias de crecimiento lento, plantea nuevas expectati-

vas para dilucidar el papel de SigF y su regulación en la capacidad de adaptación del bacilo durante la infección latente y responder algunas interrogantes relacionadas con la posibilidad de que *M. tuberculosis* entre en un estado tipo espora que le confiera ventajas de supervivencia (6, 27).

Subfamilia ECF en micobacterias

En la Figura 2 se muestra la organización genómica de los diferentes genes *sig^{ECF}* de *M. tuberculosis*. Los genes se designan de acuerdo a la nomenclatura basada en su localización en el mapa lineal, en relación al primer nucleótido del primer codón del gen *dnaA*, tomado como posición 1 en el mapa lineal del genoma de *M. tuberculosis* (7).

σ^E y σ^H : dos factores ECF caracterizados

El gen *sigE* se detectó en *M. leprae*, *M. tuberculosis* Figura 5, *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. bovis* BCG y *M. fortuitum* (37). El análisis de secuencia del locus *sigE* revela la presencia de al menos 3 marcos de lectura en la misma orientación transcripcional Figura 5. *sigE* consiste en 257 codones codificando para una proteína de 28,9 Kda con una región N-terminal inusualmente larga, comparada con otros miembros de la familia ECF. El segundo y tercer marco de lectura codifican proteínas de 21,1 Kda (193 aminoácidos)

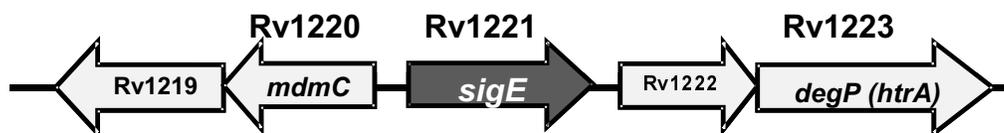


Figura 5. Organización genómica del locus *sigE*. La organización es conservada entre *M. smegmatis*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG, *M. leprae* y *M. avium*. *mdmC* codifica O-metil-transferasa. El *orf1219* que precede el gen *mdmC* codifica una posible proteína regulatoria con dominios HTH.

y 55,7 Kda (542 aminoácidos), respectivamente. El segundo marco de lectura no exhibe homología con ninguna proteína de la Base de Datos. El tercer gen codifica una proteína homóloga a la serín-proteasa DegP (HtrA), la cual es requerida para la supervivencia a altas temperaturas en *E. coli* (29, 31) y estrés oxidativo en *S. typhimurium* (19).

σ^E de *M. tuberculosis* es 91% y 92% idéntico a sus equivalentes en *M. leprae* y *M. smegmatis* respectivamente, y también es muy conservado el gen adyacente Rv1221, con una identidad de 68% a 73% entre estas especies.

La mutante *sigE*⁻ de *M. smegmatis* resultó sensible a peróxido de hidrógeno, pH ácido, detergentes y altas temperaturas (37), acorde con los niveles elevados de transcritos de *sigE* observados en cultivos de *M. tuberculosis* incubados a altas temperaturas y en presencia de detergentes Tabla 2 (23).

Se ha señalado el posible papel de *sigE* en el potencial patogénico de micobacterias, debido a que una cepa de *M. tuberculosis* mutante *sigE*⁻ resultó mas sensible a diversas condiciones de estrés y exhibió una disminución en su capacidad en crecer en el interior de macrófagos (22). 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.

El mismo grupo que publicó el primer factor sigma ECF en micobacterias *sigE*, reportaron la caracterización de *sigH* Figura 1), el cual está presente en varias especies micobacterianas y exhiben alto grado de conservación entre especies. σ^H (aproximadamente 24 Kda) de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* son 89% idénticos (14).

A diferencia del locus *sigE*, cuya organización es bien conservada entre varias especies, en la región genómica de *sigH* se detectaron algunas diferencias. En *M. tuberculosis*, *sigH* es precedido por un marco de lectura que codifica una oxido-reductasa, pero este gen no está presente en *M. smegmatis* Figura 6. Una cepa mutante de *M. smegmatis* en el gen *sigH* resultó mas susceptible a estrés oxidativo y una doble mutante de los genes *sigH* y *sigE* exhiben marcada disminución en la supervivencia tanto a estrés oxidativo, como a altas temperaturas y se han comenzado a identificar componentes del regulón de SigH, entre los cuales se destacan genes de choque térmico (30).

Otros miembros de la subfamilia ECF

El grupo de Manganeli (23) comenzó a estudiar los niveles de transcritos de 10 factores sigma seleccionados de la secuencia del genoma *M. tuberculosis*, incluyendo los 5 genes caracterizados hasta el presente (*sigA*, *sigB*,

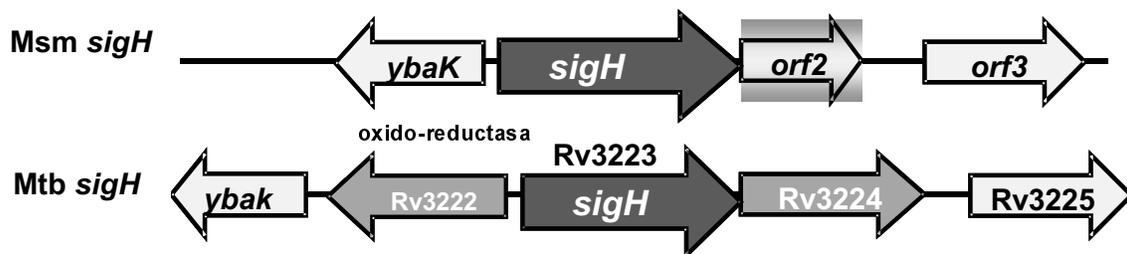


Figura 6. Organización del locus *sigH* en *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*. Los genes *sigH* son muy conservados, pero los genes sucesivos no muestran similitud. Se nota la ausencia del gen codificando una oxido-reductasa en *M. smegmatis*. *ybak* no tiene función conocida.

sigE y *sigF* y *sigH*) y 5 miembros ECF: *sigC*, *sigD*, *sigG*, *sigI* y *sigM*. Para los genes ya caracterizados, se confirmó incrementos en la expresión bajo condiciones reportadas previamente. En la figura 1 se muestra esquemáticamente la localización de estos genes y en la Tabla 2 se resume el patrón de inducción y posibles funciones de estos factores sigma.

Una caracterización parcial de la regulación de la expresión de *sigM*, indica que este gen alcanza niveles máximos de expresión a altas temperaturas y en fase estacionaria de crecimiento (2, 3), sugiriendo que este factor sigma también podría jugar un papel importante en defender las micobacterias de potenciales daños que se puedan generar en condiciones de choque térmico y cuando cesa el crecimiento exponencial, fase en la cual se han observado importantes cambios fisiológicos en micobacterias tales como ciclos de división reductiva y cambios en la composición de la pared celular (34).

Conclusiones

La presencia de múltiples factores sigma de respuesta a condiciones de estrés confiere una gran flexibilidad a la maquinaria transcripcional micobacteriana, sugiriendo que puede existir solapamiento o cooperación de funciones entre varios miembros ECF para defender las micobacterias de potenciales daños que se puedan generar en condiciones de estrés y ofrece un nuevo modelo para investigar estrategias regulatorias utilizadas por *M. tuberculosis* para el crecimiento intracelular, evasión del sistema inmune del hospedador y su contribución a la impresionante capacidad de adaptación y supervivencia de las micobacterias.

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) Arráiz R., N., Takiff, H. Análisis de un ARNm de un factor de supervivencia en micobacterias. KASMER. 2001; 29: 65-82.
- (3) Arráiz, N., Salazar, L., López, G., Rodríguez, R., Casart Y., Takiff H. Caracterización de la expresión y función de σ^M , un factor sigma ECF en micobacterias. Act. Cient. Venez. 2001; 52: 40-41.
- (4) Beggs, M.L., Cave, M.D., Eisenach, K.D. Isolation and sequence of a *Mycobacterium tuberculosis* sigma factor. Gene 1996; 174: 285-287.
- (5) Brown, K.L., Hughes, K.T. The role of anti-sigma factors in gene regulation. Mol. Microbiol. 1995; 16: 397-404.
- (6) 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.
- (7) Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry III, C. E., Tekaia, F., Badcock, K., Basham, D., Brown, D. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 1998; 393: 537-544.
- (8) Collins, D.M., Kawakami, R.P., De Lisle, G. W., Pascopella, L., Bloom, B.R. y D Jacobs, W.R., JR. Mutation of the principal factor causes loss of virulence in a strain of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. Proc. Natl. Acad. Sci. 1995; 92: 8036-8040.
- (9) Demaio, J., Zhang, Y., Ko CH., Young, D.B. y Bishai, W.R. A stationary-phase stress-response sigma factor from *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 1996; 93: 2790-2794.

- (10) Demaio, J., Zhang, Y., Ko, C. y Bishai, W.R. *Mycobacterium tuberculosis sigF* is part of a gene cluster with similarities to the *Bacillus subtilis sigF* and *sigB* operons. *Tuber. Lung. Dis.* 1997; 78: 3-12.
- (11) Doi, R., Wang, L.F. Multiple procaryotic ribonucleic acid polymerase sigma factors. *Microbiol. Rev.*; 1986; 50: 227-240.
- (12) Doukhan, L., Predich, M., Nair, G., Dussurget, O., Mandic-Mule, I., Cole, S.T., Smith, D. R., Smith, I. Genomic organization of the mycobacterial sigma gene cluster. *Gene* 1995; 165, 67-70.
- (13) Dufour, A., Haldenwang, W. G. Interactions between a *Bacillus subtilis* anti-factor (RsbW) and its antagonist (RsbV). *J. Bacteriol.* 1994; 176: 1813-1820.
- (14) 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.
- (15) Gardella, T., Moyle, H., Susskind, M. A mutant *Escherichia coli* sigma 70 subunit of RNA polymerase with altered promoter specificity. *J. Mol. Biol.* 1989; 206: 579-590
- (16) Gomez, M., Doukhan, L., Nair, G., Smith, I. SigA is an essential gene in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 1998; 29: 617-628.
- (17) Hengge-Aronis, R. Interplay of global regulators in the general stress response of *Escherichia coli*. *Curr. Opin. Microbiol.* 1999; 2: 148-152.
- (18) 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.
- (19) Johnson, K., Charles, I., Dougan, G., Pickard, D., O'Gaora, P., Costa, G., Ali, T., Miller, I., Hormaeche, C. The role of a stress-response protein in *Salmonella typhimurium* virulence. *Mol. Microbiol.* 1991; 5: 401-407.
- (20) Kormanec, J., Sevcikova, B., Halgasova, N., Knirschova, R., 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.
- (21) Lonetto, M.A., Brown, K.L., Rudd, K.B., Buttner, M.J. Analysis of the *Streptomyces coelicolor* sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994; 91: 7573-7577.
- (22) 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.
- (23) Manganelli, R., Dubnau, E., Tyagi, S., Kramer, F.R., Smith, I. Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 1999; 31: 715-724.
- (24) Missiakas, D., Raina, S. The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol. Microbiol.* 1998; 28: 1059-1066.
- (25) 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.
- (26) 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.
- (27) Parrish, N.M., Dick, J.D., Bishai, W.R. Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* 1998; 6: 107-112.
- (28) Predich, M., Doukhan, L., Nair, G., Smith, I. Characterization of RNA polymerase and two sigma-factor genes from *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 1995; 15: 355-366.
- (29) Raina, S., Missiakas, D., Georgopoulos, C. The *rpoE* gene encoding the σ^E (σ^{24}) heat shock sigma σ factor of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 1995; 14: 1043-1055.
- (30) Raman, S., Song, T., Puyang, X., Bardarov, S., Jacobs, W. R. Jr., Husson, R.N. The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress re-

- sponses in *Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriol. 2001; 183: 6119-6125.
- (31) Rouviere, P., De Las Peñas, A., Meccas, J., Lu, C.Z., Rudd, E., Gross, C.A. *rpoE*, the gene encoding the second heat-shock sigma factor, σ^E , in *Escherichia coli*. EMBO J. 1995; 14: 1032-1042.
- (32) Rowen, D.W., Deretic, V. Membrane-to-cytosol redistribution of ECF sigma factor AlgU and conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. Mol. Microbiol. 2000; 36: 314-327.
- (33) Schmitt, M.P., Holmes, R.K. Characterization of a defective diphtheria toxin repressor *dtxR* allele and analysis of *dtxR* transcription in wild-type and mutant strain of *Corynebacterium diphtheriae*. Infect. Immun. 1991; 59: 3903-3908.
- (34) Smeulders, M.J., Keer, J., Speight, R.A., Williams, H.D. Adaptation of *Mycobacterium smegmatis* to stationary phase. J. Bacteriol. 1999; 181: 270-283.
- (35) Tanaka, K., Takayanagi, Y., Fujita, N., Ishihama, A., Takahashi, H. Heterogeneity of the principal σ factor in *Escherichia coli*: the *rpoS* gene product σ^{38} is a second principal factor of RNA polymerase in stationary-phase *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. 1993; 90: 3511-3515.
- (36) 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.
- (37) 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.
- (38) 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.