

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



**NOVOS CIRCUITOS REGULATÓRIOS DE CONTROLO ESPACIO-
TEMPORAL DO DESENVOLVIMENTO EM *BACILLUS SUBTILIS***

JOÃO BOTA

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA**

OEIRAS, NOVEMBRO DE 2011

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA



**NOVOS CIRCUITOS REGULATÓRIOS DE CONTROLO ESPACIO-
TEMPORAL DO DESENVOLVIMENTO EM *BACILLUS SUBTILIS***

JOÃO BOTA

DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
MICROBIOLOGIA MÉDICA

ORIENTADOR: PROFESSOR DOUTOR ADRIANO O. HENRIQUES
CO-ORIENTADORA: DOUTORA MÓNICA SERRANO

TRABALHO REALIZADO NO GRUPO DE DESENVOLVIMENTO MICROBIANO,
INSTITUTO DE TECNOLOGIA QUÍMICA E BIOLÓGICA, UNIVERSIDADE NOVA
DE LISBOA, AVENIDA DA REPÚBLICA, EAN, 2781-125 OEIRAS.

OEIRAS, NOVEMBRO DE 2011

ISBN: 978-989-20-2819-4

ELEMENTOS BIBLIOGRÁFICOS RESULTANTES DESTA DISSERTAÇÃO

Comunicações orais¹

Serrano, M., J. V. Bota, G. Real, J. Santos, C. P. Moran Jr., e A. O. Henriques. 2011. A Negative Feedback Loop that Limits the Ectopic Activation of a Cell Type-Specific Sporulation Sigma Factor of *Bacillus subtilis*. *The 16th International Conference on Bacilli*. June 19-23. Montecatini Terme, Toscana, Itália.

Artigos

Serrano, M., J. Bota, P. E. Eichenberger, A. H. Camp, C. P. Moran Jr., e A. O. Henriques. 2011. An anti-sigma factor promotes the transition from the early to the late phase of gene expression during development in *Bacillus subtilis*. *Manuscripto em preparação*.

¹ O autor que apresentou o trabalho está sublinhado.

AGRADECIMENTOS

À comissão Científica do IV Curso de Mestrado em Microbiologia Médica, da Universidade Nova de Lisboa, pela oportunidade de enriquecer os meus conhecimentos académicos.

Ao Instituto de Tecnologia Química e Biológica (ITQB, UNL) por me ter proporcionado todas as condições físicas e humanas necessárias à realização da presente tese.

Ao meu orientador, Professor Doutor Adriano O. Henriques, por me ter aceitado no seu grupo de investigação, pela sua valiosa transmissão de conhecimentos ao longo do curso, pela dedicação que demonstrou no seguimento do trabalho e na correcção da presente tese, pelo seu contagiante entusiasmo pela ciência.

À Doutora Mónica Serrano, minha co-orientadora, pelo incansável apoio na minha aprendizagem laboratorial, pela partilha de conhecimentos, pela correcção desta tese e pela sua enorme paciência, amizade, descontração e excelente humor.

A todos os colegas de Laboratório, Catarina, Teresa, Ana, Fátima, Tiago, Cláudia, Teresa Maio, Filipa e Carolina pelo óptimo ambiente de trabalho e por contribuírem para que a minha iniciação em investigação fosse a mais agradável e enriquecedora possível, assim como pelos momentos de boa disposição.

Aos meus amigos pelas discussões, apoio e amizade ao longo do meu percurso académico e fora dele. A todos por acreditarem nas minhas capacidades e me incentivarem a dar o máximo todos os dias.

E por fim, um agradecimento ao meu núcleo familiar, em especial à minha mãe, pelo constante incentivo na realização dos meus objectivos profissionais, pelo enorme carinho transmitido e por acreditarem e fazerem-me acreditar que as metas são alcançáveis.

Esta dissertação foi escrita segundo as regras anteriores ao novo acordo ortográfico.

RESUMO

A esporulação em *Bacillus subtilis* é controlada por uma cascata de factores sigma da polimerase do RNA. σ^F e σ^E controlam os estágios precoces do desenvolvimento no pré-esporo e na célula mãe, respectivamente. Numa fase intermédia da diferenciação, quando a célula mãe acaba por envolver o pré-esporo, σ^F é substituído por σ^G e σ^E é substituído por σ^K . Vários mecanismos asseguram que a actividade dos diferentes factores sigma seja confinada a uma janela temporal precisa na célula adequada. Neste estudo, investigámos a função de um factor anti- σ^G , designado por CsfB. Mostramos que para além da sua função de inibição da actividade do factor σ^G em células pré-divisionais, CsfB é também necessário na célula mãe num estágio tardio do desenvolvimento. Mostramos que a expressão de *csfB* é activada na célula mãe a partir de um promotor dependente de σ^K . Contudo, demonstramos que CsfB interage directamente com σ^E e não com σ^K , e que CsfB é suficiente para inibir a actividade transcricional dependente de σ^E em células vegetativas de *B. subtilis*. Propomos que CsfB contribui para reduzir o período dependente de σ^E , na linha de expressão genética da célula mãe, desse modo reduzindo a sobreposição entre os regulões σ^E e σ^K e aumentando a fidelidade do processo de desenvolvimento. Uma segunda proteína, YabK, partilha semelhança estrutural com CsfB. YabK é produzida no pré-esporo sob o comando de σ^F , e é necessária para a esporulação. YabK contribui para a transição σ^F/σ^G no programa genético do pré-esporo, porque uma mutação que torna σ^F sensível a CsfB ultrapassa parcialmente a função de YabK na esporulação. No entanto, YabK e CsfB funcionam por mecanismos diferentes, uma vez que YabK não liga directamente a σ^F .

ABSTRACT

Gene expression during spore development in *Bacillus subtilis* is governed by a cascade of RNA polymerase sigma factors. σ^F and σ^E control the early stages of development in the forespore and in the mother cell, respectively. At an intermediate stage in the differentiation process, when the larger mother cell finishes engulfment of the smaller forespore, σ^F is replaced by σ^G and σ^E is replaced by σ^K . Several mechanisms ensure the proper timing of activation of the cell type-specific sigma factors. Here, we have investigated the function of an anti-sigma σ^G factor, called CsfB. We show here that in addition to its role in inhibiting σ^G in pre-divisional cells, CsfB is also required in the mother cell at a late stage in development. We show that the expression of *csfB* is activated in the mother cell from a σ^K -specific promoter. However, we demonstrate that CsfB binds directly to σ^E but not to σ^K in a yeast two-hybrid assay, and that CsfB is sufficient to inhibit σ^E -dependent transcriptional activity in vegetative cells of *B. subtilis*. We posit that CsfB contributes to shutting off the early, σ^E -controlled period in the mother cell line of gene expression, thus reducing the overlap between deployment of the σ^E and σ^K regulons and increasing the fidelity of the developmental process. A second protein, YabK, shares structural similarity with CsfB. YabK is produced in the forespore under σ^F control, and is required for efficient sporulation. YabK contributes to the transition from the σ^F - to the σ^G -dependent period of gene expression, because a mutation that renders σ^F sensitive to CsfB partially bypasses the need for YabK. Yet, YabK and CsfB must function in the control of sigma factor activity by different mechanisms because YabK does not bind directly to σ^F .

ÍNDICE

ELEMENTOS BIBLIOGRÁFICOS RESULTANTES DESTA DISSERTAÇÃO	i
AGRADECIMENTOS	ii
RESUMO	ii
ABSTRACT	iv
ÍNDICE	v
ÍNDICE FIGURAS	viii
ABREVIATURAS	ix
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Polimerase do Ácido Ribonucleico	1
1.2. Os factores sigma da família σ^{70}	3
1.3. Factores anti-sigma	5
1.4. <i>Bacillus subtilis</i> , organismo modelo.	6
1.5. Esporulação de <i>Bacillus subtilis</i> e factores sigma específicos	8
1.6. A divisão assimétrica do esporângio e a activação de σ^F no pré-esporo.	9
1.7. A expressão génica precoce na célula-mãe: regulação σ^E	12
1.8. Regulação da síntese e da activação do factor σ^G no pré-esporo	13
1.9. Expressão genética tardia na célula-mãe: o último factor sigma da esporulação σ^K	16
1.10. OBJECTIVOS	17
2. MATERIAIS E MÉTODOS	19
2.1. Técnicas microbiológicas	19
2.1.1. Estirpes bacterianas, condições de crescimento e técnicas gerais	19
2.1.2. Indução da esporulação	19
2.1.3. Determinação da eficiência da esporulação	20
2.1.4. Microscopia óptica de contraste de fase e de fluorescência	20
2.2. Técnicas gerais de genética microbiana e de biologia molecular	21

2.2.2. Extracção de DNA plasmídico em pequena escala	21
2.2.3. Extracção e purificação de DNA plasmídico por troca iónica	21
2.2.4. A competência	21
2.2.5. Preparação de células competentes de <i>E. coli</i> pelo método do CaCl ₂	22
2.2.6. Transformação de células competentes de <i>Escherichia coli</i> por choque térmico	22
2.2.7. Extracção de DNA genómico total de <i>Bacillus subtilis</i>	22
2.2.8. Preparação de células competentes de <i>B. subtilis</i> e a sua transformação	23
2.2.9. Transformação de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2.2.9.1. Preparação das células electrocompetentes	24
2.2.9.2. Electroporação e transformação	24
2.2.9.3. Conjugação	25
2.2.10. Reacção em cadeia da polimerase do DNA (PCR)	26
2.2.11. Electroforese de ácidos nucleicos em géis de agarose	26
2.2.12. Manipulações enzimáticas do DNA	27
2.3. Técnicas bioquímicas	27
2.3.1. Determinação da actividade da enzima β-galactosidase	27
2.3.1.1. Em <i>B. subtilis</i>	27
2.3.1.2 Em <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
Ensaio em meio líquido	28
Ensaio em meio sólido	29
2.3.2. Determinação qualitativa da actividade enzimática da α-amilase	29
3. RESULTADOS	31
3.1. A estrutura do operão <i>yabK-mfd</i> .	31
3.2. A transcrição do gene <i>yabK</i> é activada especificamente no pré-esporo	32
3.3. A proteína YabK é necessária para a esporulação e regula a expressão genética no pré-esporo	34
3.4. YabK pode ser substituído pelo anti-sigma CsfB durante a esporulação	38

3.5. YabK não interage directamente com nenhum dos factores sigma que controlam a esporulação	41
3.6. CsfB interage directamente com σ^E	43
3.7. A expressão de <i>csfB</i> é activada na célula-mãe em fases tardias do desenvolvimento	43
3.8. CsfB modula a actividade de σ^E de uma forma directa em <i>B. subtilis</i>	47
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	55
ANEXOS	73
Tabela 1 - Composição dos meios de cultura utilizados (para 1 L)	73
Tabela 2 - Antibióticos utilizados para o crescimento selectivo	73
Tabela 3 - soluções utilizadas na electroforese de DNA em géis de agarose	73
Tabela 4 - Outras soluções utilizadas durante este trabalho	74
Tabela 5 - soluções utilizadas para a preparação de células competentes de <i>B. subtilis</i>	74
Tabela 6 - Soluções utilizadas para ensaios de β -galactosidase	75
Tabela 7 - Sequências de oligonucleótidos, iniciadores, para a amplificação de regiões de DNA	75
Tabela 8 - Lista de plasmídeos	77
Tabela 9 - Estirpes de <i>B. subtilis</i> utilizadas e construídas durante este trabalho	78
Tabela 10 - Estirpes de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas e construídas ao longo deste trabalho	80

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1 - Esquema das regiões conservadas de factores sigma	4
Figura 2 - Esporos de <i>B. subtilis</i> .	7
Figura 3 - Os ciclos vegetativo e de esporulação/germinação de <i>B. subtilis</i>	11
Figura 4 - Esquema exemplificativo do protocolo de conjugação.	25
Figura 5 - Operação <i>yabk-mfd</i>	32
Figura 6 - <i>yabK</i> é transcrito por σ^F e σ^G	34
Figura 7 - <i>yabK</i> é indispensável para a esporulação.	36
Figura 8 - CsfB consegue substituir YabK durante a esporulação	40
Figura 9 - YabK não regula directamente nenhum factor sigma na esporulação	42
Figura 10 - CsfB é expresso tarde durante a esporulação sob controlo de σ^K	46
Figura 11 - CsfB consegue inibir a transcrição dependente de σ^E	48
Figura 12 - Modelo esquemático das vias regulatórias que envolvem CsfB e YabK	53

ABREVIATURAS¹

Δ	Eliminação
::	Inserção
°C	Graus Celsius
σ	Factor sigma
μm	Micrómetro
μF	Microfarad
μg	Micrograma
μl	Microlitro
Amp	Ampicilina
Amp ^R	Resistência à ampicilina
CFU/ml	Unidades formadoras de colónias por ml
cm	Centímetro
Cm	Cloroanfenicol
Cm ^R	Resistência ao cloroanfenicol
ddH ₂ O	Água bidistilada
DO	Densidade óptica
DO ₄₂₀	Densidade óptica medida a 420 nm
DO ₆₀₀	Densidade óptica medida a 600 nm
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSM	<i>Difco Sporulation Medium</i>
DTT	Dititriol
EDTA	Ácido etileno diamino tetracéptico
Erm	Eritromicina
Erm ^R	Resistência à eritromicina
g	Força g
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>

¹ As abreviaturas utilizadas e a nomenclatura para as unidades de medida e quantidades físicas e químicas estão de acordo com as instruções aos autores do *Journal of Biological Chemistry*, (www.jbc.org).

h	Horas
IPTG	Isopropil β -D-1- tiogalactopiranosideo
kb	Quilo de bases
kDa	Quilo Dalton
Km	Canamicina
Km ^R	Resistência à canamicina
kV	Quilo Volt
l	Litro
LB	Meio Luria Bertani
M	Molar
ml	Mililitro
mM	Milimolar
Neo	Neomocina
Neo ^R	Resistência à neomicina
ONPG	<i>o</i> -nitrophenyl- β -D-galactosidase
pb	Pares de bases
PBS	<i>Phosphate Buffeed Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PG	Peptidoglicano
RNA	Ácido ribonucleico
RNAP	Polimerase de RNA
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
SD	<i>Synthetic Dextrose</i>
SET	Solução tampão Sacarose EDTA Tris NaCl
Sp	Spectinomicina
Sp ^R	Resistência à spectinomicina
Spo ⁺	Estirpes esporogénicas
Spo ⁻	Estirpes oligo ou asporogénicas
STET	Solução tampão Sacarose Tris NaCl EDTA Triton [®] X-100

TAE	Solução tampão Tris Acetato-EDTA
tRNA	Ácido ribonucleico de transferência
TE	Solução tampão Tris HCl-EDTA
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UM	Unidades de Miller
UV	Utra Violeta
v/v	Concentração em Volume/Volume
<i>wt</i>	Estirpe, genótipo ou fenótipo selvagem
Y2H	<i>Yeast two Hybrid</i>
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose</i>
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoli- β -D-galactosidase

1. INTRODUÇÃO

A utilização da informação genética, de um modo ajustado às condições particulares em que uma célula se encontra, é um processo central da vida. A informação genética está ‘escrita em código’ numa sequência de ácido Desoxirribonucleico (DNA), sendo que a produção dos componentes codificados, tais como proteínas e ácidos RiboNucleicos (RNAs), envolvem vários processos. Um desses processos é a transcrição do DNA. Este processo passa pela polimerização de RNA a partir de DNA levada a cabo por um complexo enzimático denominado de polimerase do RNA, RNAP.

1.1. Polimerase do Ácido Ribonucleico

RNAP é uma enzima com várias subunidades. As subunidades β , β' e α (esta última em duas cópias) compõem o núcleo catalítico mínimo da enzima (15, 102). Do complexo podem também fazer parte várias proteínas acessórias, tais como duas subunidades ω , ω_1 e ω_2 , e uma subunidade delta, δ (59). Ao núcleo da enzima associa-se ainda a subunidade σ , de forma a produzir uma holoenzima capaz de iniciar transcrição a partir de sequências promotoras específicas (102). Este complexo é conservado a nível de estrutura primária, estrutura tridimensional e função desde as bactérias até aos humanos (2, 102, 165). As subunidades β e β' estão codificadas no mesmo operão e os genes que as codificam são *rpoB* e *rpoC*, respectivamente. Certas mutações pontuais nestes genes provocam sensibilidade à rifampina e à streptolidigina. A subunidade β catalisa a síntese de RNA, enquanto a subunidade β' liga ao DNA de um modo não específico, sendo a estas duas subunidades exclusivamente que se ligam os factores σ (12). A subunidade α é codificada pelo gene *rpoA* e faz parte de um grande operão de 30 genes com mais de 15 kb. A região C-terminal desta subunidade interage com factores de transcrição acessórios, e pode também ligar ao DNA a montante da região promotora, a sequências designadas por elementos UP (ver abaixo), de forma a estimular a transcrição. A região N-terminal da subunidade contém os determinantes de ligação à polimerase. As proteínas acessórias ω_1 e ω_2 com massas aparentes de 11 e 9.5 kDa, respectivamente, não sendo essenciais, co-

purificam juntamente com a RNAP (59). Estudos realizados em *Escherichia coli* indicam que $\omega 2$ parece funcionar como um chaperão molecular durante a montagem do núcleo da polimerase (59). A proteína acessória δ , de 21 kDa, altamente acídica, é codificada pelo gene *rpoE*. *In vitro*, dependendo das condições de reacção, pode aumentar ou diminuir o rendimento da transcrição e suprime a iniciação da transcrição não específica em locais sem promotor (59). *In vivo*, apenas se conhece uma função em *Bacillus subtilis*: a subunidade delta é necessária para a transcrição de determinados genes nas fases intermédias da esporulação, fases II e III (50). Além destes factores acessórios da RNAP, existem outros que têm funções de alongamento (NusA, NusB e NusG), acoplamento da transcrição à reparação (Mfd), terminação da transcrição (86), e clivagem do RNA mensageiro (RNAm) (um exemplo é GreA) (59).

O início da transcrição começa com o reconhecimento específico de um promotor pela holoenzima, de uma forma dependente da subunidade σ . Os factores sigma são apenas necessários para o reconhecimento específico dos promotores e início da transcrição (59), sendo aceite que são libertados durante a fase de alongamento do transcrito. Classicamente, um promotor define-se como a região de DNA mínima necessária para permitir a iniciação selectiva da transcrição e que é frequentemente identificada por sequências conservadas (elementos consensos), geralmente centradas nas posições -35 e -10 pares de bases (17) relativamente ao local de início da transcrição (nucleotídeo de iniciação). Esta região define basicamente o tamanho do promotor e a sua sequência determina o(s) sigma(s) que podem activar transcrição normal (basal) de um gene. No entanto, um promotor pode ter outros componentes. Geralmente existe localizada entre -40 e -70 uma região rica nos nucleótidos A-T (Adenina-Timina), denominada UP elemento, *UPstream*, (sequência a jusante da região promotora -35 -10), onde a região terminal carboxílica da subunidade α da RNAP pode ligar (fig. 1). Estes elementos são também importantes para o reconhecimento dos promotores por factores σ secundários. Além dos elementos UP, a sequência entre região +1 e +20 tem grande influência no eficiente começo da transcrição (59).

A especificidade da RNAP para diferentes promotores depende do factor sigma que está presente. σ^{70} em *E. coli* e σ^A em *B. subtilis* são os factores sigma primários, e reconhecem promotores de genes essenciais ao crescimento exponencial. Ambos os

factores sigma pertencem à família σ^{70} (59, 106). Além dos sigmas primários existem factores sigma secundários, que variam entre espécies, e que dirigem a RNAP para promotores de genes que são necessários em situações fisiológicas particulares, que geram fortes estímulos intra ou extra-celulares (59).

1.2. Os factores sigma da família σ^{70}

A família σ^{70} agrupa factores sigma filogeneticamente relacionados que reconhecem promotores com elementos conservados nas regiões -35 e -10 contando a partir do local de início da transcrição. A maioria dos factores sigma conhecidos pertence a esta família (106). Uma outra família de factores sigma, conhecida por família σ^{54} , engloba proteínas que reconhecem promotores com os elementos conservados perto das região -24 e -12 relativamente à posição de iniciação de transcrição. Esta família diverge estruturalmente e filogeneticamente da anterior (59).

A família σ^{70} foi dividida em 4 grupos filogenéticos com base em considerações estruturais e funcionais. Ao grupo 1 pertencem os factores sigma primários que são muito semelhantes ao factor σ^{70} de *E. coli*. No grupo 2 estão factores que sendo muito semelhantes aos do grupo 1 não são necessários para o crescimento e a viabilidade das células bacterianas. No terceiro grupo estão colocados factores sigma mais específicos cuja actividade é circunscrita a determinadas fases do ciclo de vida, em resposta a sinais específicos. Este grupo é dividido em subgrupos que reúnem factores σ relacionados funcionalmente, como por exemplo os envolvidos na esporulação, no choque térmico ou na biossíntese do flagelo. O grupo 4, cujos elementos são os mais divergentes estruturalmente relativamente aos σ do grupo 1, foi inicialmente denominada de ECF (*extracytoplasmic factor*). A designação de ECF vem do facto dos primeiros elementos desta família caracterizados responderem a sinais com origem no ambiente extra-citoplasmático, e pelo facto de uma classe de reguladores directos designados por factores anti-sigma serem transmembranares. O número de factores sigma de cada grupo que cada organismo possui é muito variável, mas todos têm obrigatoriamente um factor do grupo 1 (106).

Estruturalmente os factores sigma da família σ^{70} podem ser definidos por terem 4 regiões principais e algumas sub-regiões. Das 4 regiões principais existem duas mais importantes, as regiões 2 e 4. Estas regiões são divididas em sub-regiões com diferentes funções. Nas regiões 2.1 e 2.2 estão presentes os resíduos necessários para a ligação ao núcleo da RNAP (6, 17, 106). A região 2.3 promove a separação da cadeia de DNA aquando da formação do complexo aberto no início da transcrição. A região 2.4 contém os aminoácidos que contactam o DNA na região -10 dos promotores (fig.1). A região 4, em particular a sub-região 4.2 está envolvida no reconhecimento do elemento -35 dos promotores (fig.1), e na interacção com proteínas acessórias de activação da transcrição que ligam a montante do elemento -35 (6, 17, 106). A região 4.1 é também o alvo de ligação de alguns anti-sigmas (141). Relativamente às regiões 1 e 3, estas são menos conservadas entre os factores sigma da família σ^{70} . A primeira é dividida em duas sub-regiões, na qual a 1.1 funciona como um elemento inibitório que por vezes impede a ligação do factor sigma à região promotora (33, 34, 64, 152) e também parece acelerar a formação do complexo aberto em alguns promotores (64, 152, 155). A região 1.2 liga a uma sequência de 3 nucleótidos situada a jusante da região -10 e estimula a taxa de iniciação de transcrição (fig.1) (57, 58). A região 3 também se divide em três sub-regiões: a sub-região 3.0 (anteriormente denominada 2.5) está envolvida no reconhecimento de um motivo -10 “estendido” presente em alguns promotores (fig1) (6, 17), enquanto a sub-região 3.2 é importante na inicialização da transcrição pela interacção com os substratos iniciais no núcleo catalítico da RNAP e pela sua libertação do promotor (83).

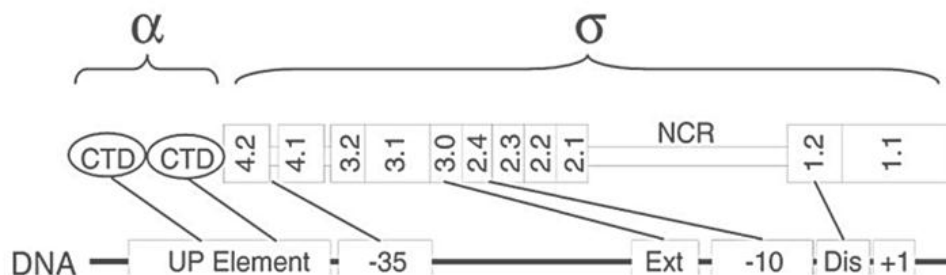


Figura 1 - Esquema das regiões conservadas em factores sigma. Diagrama esquemático das interações entre o promotor e as regiões indicadas dos factores sigma no contexto da RNAP (holoenzima) e também entre a sub-unidade α do núcleo da RNAP com o DNA. As linhas ligam os elementos do promotor (em baixo)

às regiões das subunidades α e σ (em cima). Da esquerda para a direita, elemento UP (*UP element*); regiões -35 e -10 do promotor; Ext, extensão da região -10; Dis, elemento discriminatório (*discriminator element*); +1, local de início da transcrição. Em cima: CTD, domínio C-terminal de α (*C-terminal domain*); NCR, região não conservada (*no conserved region*). As representações não estão à escala. A figura foi mantida como a original em Haugen *et al.*, 2008 (58).

Os factores sigmas pertencentes aos grupos 2-4 funcionam activando em certas condições fisiológicas, determinados conjuntos de genes. Estes factores podem ser divididos em 3 categorias: i) resposta a stresses vários, ii) diferenciação celular e desenvolvimento, iii) e metabolismo auxiliar. Alguns exemplos incluem σ^R em *Streptomyces coelicolor*, que é activado em resposta a stresse oxidativo. Outro exemplo, directamente relacionado com a temática deste trabalho, diz respeito a *B. subtilis* onde existe um conjunto de quatro factores sigma, σ^F , σ^E , σ^G e σ^K , que controlam o processo de diferenciação de endósporos (NB: a designação esporo será daqui mediante utilizada para efeitos de simplificação) (106).

B. subtilis parece ter pelo menos 17 factores sigma, 5 dos quais não têm uma função conhecida (59, 86). Com excepção do factor σ^L que é do tipo σ^{54} , todos os demais pertencem à família σ^{70} (7, 59)

1.3. Factores anti-sigma

O texto acima identifica a existência de múltiplos factores sigma como elementos centrais no estabelecimento da expressão génica diferencial. Por sua vez a actividade dos factores σ pode ser regulada especificamente pela acção de proteínas regulatórias designadas por factores anti-sigma (66). Estas são proteínas que interagem com os factores sigma e impedem que estes promovam a transcrição de genes a partir dos promotores que deles dependem. Nem todos funcionam da mesma forma. Existem anti- σ que ligam directamente ao σ correspondente, inibindo a sua ligação à região do promotor no DNA e impedindo que o posicionamento produtivo da RNAP no promotor. Este tipo de factor anti- σ liga normalmente à região 4 do factor σ (fig. 1) impedindo o reconhecimento da região -35 do promotor (66). Em alguns casos estes anti-sigmas possibilitam o direccionamento da RNAP para promotores com um motivo -10 estendido (nos quais o elemento -35 está

ausente ou é dispensável). Um exemplo é o anti-sigma AsiA, que liga ao factor σ^{70} de *E. coli* (62, 66). Outros factores anti-sigma interferem com a ligação do σ ao núcleo da RNAP. Estes anti-sigmas ligam normalmente ao σ em regiões que estão envolvidas no contacto com a RNAP, principalmente com a sub-unidade β' (163). Outros ainda poderão utilizar vários destes mecanismos inibitórios. Um exemplo é FlgM que serve como anti-sigma para o factor σ^{28} de *Salmonella typhimurium*, por sua vez envolvido na morfogénese do flagelo (66, 87).

Os factores sigma de função extracitoplasmática (ECF) actuam em resposta a sinais do meio extracelular. Os genes para estes factores sigma são normalmente co-transcritos com genes que codificam para reguladores negativos, anti- σ , que possuem um domínio extracelular que permite receber sinais externos e um domínio intracelular que funciona como anti- σ . Os dois domínios do factor anti- σ são separados por um segmento transmembranar. O domínio intracelular mantém o factor inactivo, associado à membrana (162). A interacção de uma molécula sinalizadora com o domínio extracelular inicia uma cascata de sinalização que resulta na inactivação do domínio intracelular, libertando o factor que pode então activar a expressão de um regulão de resposta ao sinal original (66).

Esta dissertação centra-se no estudo da regulação negativa exercida por dois factores anti-sigma, YabK (16) e CsfB (24, 75), na actividade de alguns dos factores sigma envolvidos na esporulação de *B. subtilis*.

1.4. *B. subtilis*, organismo modelo.

Desde a segunda metade do século XIX que são estudadas bactérias formadoras de esporos. Tyndall, Cohn e Koch demonstraram a sua existência independentemente (103). A capacidade de resistência dos esporos permite-lhes a sobrevivência em ambientes extremos de impensável existência de vida. São a forma celular mais resistente conhecida e a compreensão dos mecanismos de diferenciação celular, e daqueles responsáveis pela extrema resistência dos esporos, tem sido uma das motivações dos estudos intensos que se incidem sobre os organismos endoesporulantes desde há mais de um século (103) (NB: apenas os endósporos apresentam características de resistência a valores extremos de

factores físico-químicos: outros tipos de esporos bacterianos, como os mixoesporos formados por bactérias do género *Myxococcus*, ou os exósporos de *Streptomyces*, ficam fora desta discussão).

São exemplo de organismos (endo)esporulantes as bactérias gram positivas de baixo conteúdo G/C do filo Firmicutes. Este grupo inclui organismos que populam uma ampla diversidade de habitats, incluindo heterotróficos aeróbios (*Bacillus* spp.), halófilos (*Sporosarcina halophil*), fermentadores de lactato microaerófilos (*Sporolactobacillus* spp.), anaeróbios (*Clostridium* spp.), redutores de sulfato (*Desulfotomaculum* spp.), e fototróficos (*Heliobacterium* e *Heliophilum* spp.). No entanto, os organismos mais estudados pertencem aos géneros *Bacillus* e *Clostridium*. E de entre estes, é em *B. subtilis* 168 e derivados que se tem concentrado maioritariamente a investigação, em parte devido à existência de sofisticadas ferramentas genéticas para a sua manipulação (103). Em 1997 a sequenciação do genoma da estirpe *B. subtilis* 168 (86), por um consórcio Europeu e Japonês, permitiu fechar uma lacuna na genómica e abrir as portas, mediante abordagens experimentais novas, a um novo fôlego nos estudos em *B. subtilis*, e à análise funcional de um grupo mais vasto de bactérias gram positivas (56, 149).

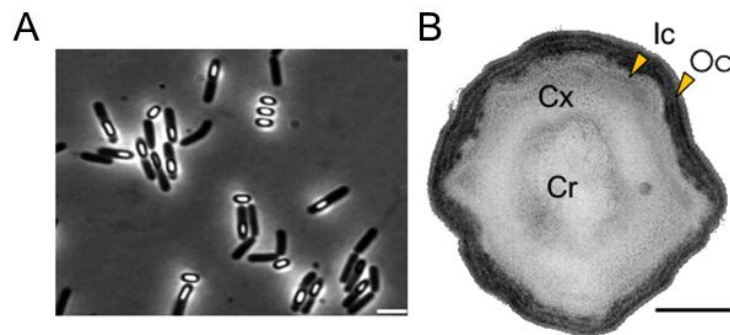


Figura 2 – Esporos de *B. subtilis*. (A) cultura de *B. subtilis* numa fase tardia do processo de esporulação. Verifica-se a existência de esporos livres e outros ainda contidos na célula-mãe. (B) Secção transversal fina de um esporo de *B. subtilis*, observado por microscopia electrónica de transmissão. As principais estruturas do esporo estão indicadas: Núcleo (Cr, *core*), córtex (Cx, *cortex*), manto interno (Ic, *inner coat*), e manto externo (Oc, *outer coat*). A barra representa 1 μm no painel A e 0.2 μm no painel B.

1.5. Esporulação de *B. subtilis* e factores sigma específicos

B. subtilis é induzido a diferenciar-se em esporos quando está presente num meio deficitário em carbono, azoto e em algumas circunstâncias fósforo (117). Além destes défices, a densidade celular é um requisito para a esporulação, sendo necessária densidade elevada (38). O início do processo de esporulação resulta da activação do factor de transcrição Spo0A, que regula, activando ou reprimindo directamente 121 genes, entre eles alguns essenciais à esporulação. A nível morfológico, a ocorrência de uma divisão polar/assimétrica marca o início da esporulação (fig. 3) (100, 117). A divisão assimétrica resulta assim na formação de duas células diferentes, na qual uma é mais pequena que outra. O esporo desenvolve-se a partir da pequena, pré-esporo. A célula maior, célula-mãe, essencial ao desenvolvimento do esporo, lisa no final do processo para libertar o esporo maduro (117). No laboratório, o processo de diferenciação até ao aparecimento de esporos livres demora cerca de 7-8 horas a 37 °C (61).

O processo de esporulação foi definido em estágios morfológicos por Roman e Ryter (61, 129). Antes do início da esporulação a célula está no estado vegetativo pelo que foi nomeado como estágio 0 (fig. 3). Durante este período há a formação de um filamento axial de cromatina onde duas cópias do cromossoma condensam e alongam ao longo do comprimento da célula, estágio I (10, 13, 159). Seguidamente ocorre a divisão polar com a formação de duas células de desigual tamanho, célula-mãe e pré-esporo. A formação do septo assimétrico define o estágio II (fig. 3). Nesta fase apenas 1/3 do cromossoma centrado na região de iniciação de replicação (ou *oriC*) reside no pré-esporo. Muito rapidamente, o restante é transferido para o pré-esporo por uma translocase de DNA, a proteína SpoIIIE (8, 158). Neste momento o resultado são duas células de volumes diferentes mas com o mesmo genoma. O septo é construído por duas membranas e peptidoglicano (PG). Após a conclusão do processo de segregação do cromossoma para o pré-esporo o PG do septo é hidrolisado, e as membranas migram pelos dois lados do pré-esporo envolvendo-o, e acabando por fundir no polo mais próximo. Este acontecimento dá origem a um protoplasto no interior da célula-mãe e é designado como estágio III (fig. 3) (114). A partir desta fase o desenvolvimento do esporo traduz-se principalmente na

formação das suas estruturas periféricas de protecção. Numa primeira fase, ocorre a deposição de duas camadas de PG entre as duas membranas do pré-esporo. Estas são a parede primordial de germinação (que forma a parede da célula que emerge após a germinação do esporo) e o córtex (uma estrutura essencial para a resistência ao calor). A síntese destas camadas define o estágio IV (fig. 3). A este segue-se mais uma fase de deposição de uma estrutura complexa de proteínas denominada manto, estágio V (fig. 3) (60). Segue-se um período de maturação (estágio VI), onde as propriedades de resistência à radiação UV e a temperaturas elevadas se desenvolvem (61, 103). Por último, no estágio VII, decorre a lise da célula-mãe e o esporo é libertado no meio circundante (fig. 3) (61). Durante este processo há diferentes genes a serem transcritos, que na esporulação são em geral designados inicialmente por *spo*, seguido do estágio no qual o mutante para o referido gene se encontra bloqueado e a letra distinguível, como por exemplo, *spoIIA* (61, 115). Embora ambas as células contenham o mesmo genoma a expressão génica é distinta entre os dois compartimentos, devido à activação de diferentes factores sigma. σ^F e σ^E são activados após a formação do septo no pré-esporo e na célula-mãe, respectivamente. Nas fases tardias, após o envolvimento, σ^G e σ^K são os últimos factores sigma a ficarem activos no pré-esporo e na célula-mãe, respectivamente (38, 61, 117).

1.6. A divisão assimétrica do esporângio e a activação de σ^F no pré-esporo.

σ^F é o primeiro factor sigma a ficar activo no pré-esporo (117), e é codificado por *sigF*, o terceiro cistrão de um operão (*spoIIA*), transcrito pela polimerase contendo σ^H , assistida por Spo0A (156, 157). Consequentemente, o factor σ^F é produzido na célula pré-divisional, sendo mantido numa forma inactiva pelo anti-sigma SpoIIAB, o qual é codificado pelo segundo cistrão do operão (51, 116). SpoIIAB liga directamente a σ^F e impede que este ligue à RNAP (135). σ^F só fica activo após a divisão assimétrica (51, 61). O primeiro cistrão do operão *spoIIA* codifica para SpoIIAA, cuja função é antogonizar SpoIIAB, actuando assim como um anti-anti-sigma (31). São necessárias duas moléculas de SpoIIAB para ligar a σ^F . O complexo SpoIIAB₂- σ^F é inactivo transcricionalmente, sendo necessário SpoIIAA desfosforilado para romper o complexo e permitir a libertação de σ^F

que pode então ligar ao núcleo catalítico da polimerase de RNA (67, 117). No entanto, na presença de ATP, SpoIIAB funciona como cinase capaz de fosforilar SpoIIAA, tornando-o inactivo e formando um complexo *dead-end*. Este efeito decorre da estabilidade elevada do complexo SpoIIAA-SpoIIAB-ADP (67). SpoIIIE, que localiza na membrana do septo assimétrico é a fosfatase capaz de desfosforilar SpoIIAA permitindo a activação de σ^F (67). SpoIIIE é codificado pelo gene *spoIIIE*, cuja transcrição se dá na célula pré-divisional sob o controlo de Spo0A e da forma da polimerase contendo σ^A (80). Pensa-se que SpoIIIE leve à desfosforilação de SpoIIAA preferencialmente no pré-esporo, porque a sua acção é inibida na célula mãe, ou porque a sua acumulação ocorre preferencialmente no pré-esporo (44, 61). Além do seu papel na desfosforilação de SpoIIAA tem sido sugerido que SpoIIIE também participa na activação de σ^F monitorizando o estado de formação do septo assimétrico (20). Existem outros dois factores que contribuem para a activação de σ^F no pré-esporo. Um deles é o facto de SpoIIAB quando está livre, não complexado com σ^F ou SpoIIAA, ser um substrato para a protease ClpCP (109). Por outro lado, quando se dá a divisão assimétrica uma das cópias do cromossoma (a que irá para o pré-esporo) fica interceptada pelo septo pelo que apenas está disponível no pré-esporo cerca de 30 % do cromossoma (8, 158, 160). O operão *spoIIA*, que fica localizado longe da origem, encontra-se nesta fase na célula mãe (38, 61, 128). Desta forma, devido à exclusão temporária de *spoIIAB* do pré-esporo, e à concomitante degradação de SpoIIAB no pré-esporo as concentrações de σ^F , SpoIIAB, SpoIIIE e SpoIIAA desfosforilado neste compartimento estarão num rácio que favorece a activação de σ^F (67).

Recentemente foi identificado um novo regulador da actividade de σ^F , YabK, necessário para a eficiente transição entre os dois sigmas activos no pré-esporo (16). *yabK* é transcrito no pré-esporo sob o controlo de σ^F (143) e de σ^G e parece funcionar como um inibidor da actividade de σ^F mas não de σ^G (16). A inibição da actividade de σ^F será necessária para a eficiente activação do factor sigma seguinte do pré-esporo, σ^G . Na ausência de YabK observa-se um aumento da actividade do factor σ^F e uma consequente diminuição na actividade do factor σ^G . Este efeito leva a uma diminuição na eficiência de esporulação (16). YabK parece assim promover a transição entre as fases precoces (anterior

à conclusão do processo de envolvimento) e tardia (com início após a conclusão do processo de envolvimento) da expressão gênica no pré-esporo, e esta transição é essencial para a eficiência da esporulação. A função de *yabK* durante a esporulação é uma das questões abordadas neste trabalho.

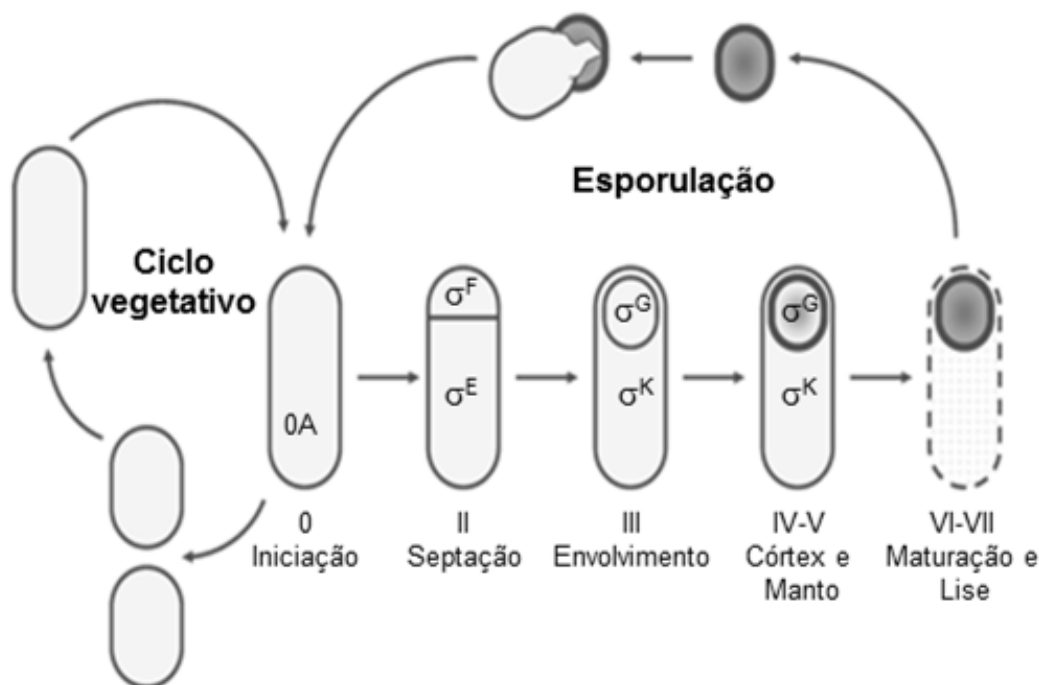


Figura 3 - Os ciclos vegetativo e de esporulação/germinação de *B. subtilis*. A figura representa os estágios vegetativos e de esporulação, com ênfase neste último. A partir de uma célula vegetativa (estágio 0) a esporulação inicia-se com a formação do filamento axial (estágio I) e logo após com a ocorrência de uma divisão assimétrica (perto de um dos polos) (estágio II). Esta divisão dá origem a dois compartimentos de diferentes tamanhos, o pré-esporo e a célula-mãe de maiores dimensões. No esporângio pré-divisional os factores que controlam a transcrição são σ^A , σ^H e Spo0A. Após a divisão assimétrica, σ^F é activado no pré-esporo e σ^E é activado na célula-mãe. O envolvimento (estágio II-III), um processo com semelhanças à fagocitose, é o passo que se segue. Logo após σ^G e σ^K são activados no pré-esporo e na célula-mãe, respectivamente. Neste momento o pré-esporo é um protoplasto livre e isolado dentro da célula-mãe, envolvido por duas membranas derivadas do septo assimétrico. A partir deste estágio tem lugar os passos finais da morfogénese das camadas protectoras do esporo. Nos estágios IV e V processa-se a deposição do córtex e o do manto, respectivamente. De seguida, o esporo sofre um processo de maturação (estágio VI) e finalmente a célula-mãe, por um mecanismo de morte celular programada, lisa libertando o esporo no meio (estágio VII). A figura foi adaptada de Errington, 2010 (37).

A activação do factor σ^F leva à activação do factor σ^E na célula mãe (*spoIIR*) (76, 92) e à expressão até 66 genes e operões no pré-esporo (143). Os genes expressos sob o controlo do factor σ^F codificam para proteínas com funções diversificadas durante a esporulação, desde envolvidas no processo de envolvimento do pré-esporo pela célula mãe (*spoIIQ*) (91, 147), no processo de germinação (*gerAABC*), na produção do factor sigma tardio σ^G (*sigG*) (145, 146) e na regulação do factor σ^K (que substitui σ^E em fases tardias do desenvolvimento na célula-mãe; *spoIVB*) (52). O regulão σ^F inclui também um factor de transcricional, *rsfA*, mas este não tem grande impacto na expressão génica dependente de σ^F (61, 73).

1.7. A expressão génica precoce na célula-mãe: regulação σ^E

Tal como σ^F , σ^E é sintetizado antes da formação do septo assimétrico (79). *sigE*, o segundo cistrão do operão *spoIIG*, codifica para σ^E , e é transcrito pela forma da polimerase contendo σ^A com a assistência de Spo0A (79). σ^E é sintetizado na forma de uma pré-proteína inactiva, pró- σ^E (69, 72). A extensão N-terminal de pró- σ^E é removida por proteólise para que σ^E possa associar à polimerase do RNA (113). Além de inibir σ^E , o N-terminal de pró- σ^E dirige a proteína para a membrana (71), onde a enzima responsável pelo seu processamento se localiza, SpoIIGA (43). *spoIIGA* é o primeiro cistrão do operão *spoIIG* e por isso é também expresso na célula pré-divisional (79). A activação de SpoIIGA depende da acção de uma proteína sintetizado no pré-esporo, SpoIIR, e excretada para o espaço intermembranar do septo. SpoIIR deverá interagir com SpoIIGA activando a protease, resultando no processamento de pró- σ^E e na consequente activação de σ^E (63, 76, 92).

A activação específica de σ^E na célula-mãe resulta da acção concertada de três mecanismos: proteólise de pró- σ^E no pré-esporo (118), presença de um anti-sigma, CsfB, capaz de inibir baixos níveis de σ^E que possam acumular indevidamente no pré-esporo (23), e ao aumento da síntese de pró- σ^E na célula-mãe (48).

A expressão génica dependente de σ^E é modelada por os dois factores transcricionais SpoIIID e GerR. Estes factores são importantes para a regulação de genes do regulão σ^E . SpoIIID actua como activador da transcrição de alguns genes σ^E dependentes e como inibidor na transcrição de outros genes do mesmo regulão. Pelo contrário, GerR, tem uma acção negativa sob alguns dos genes do regulão σ^E . Sugere-se que esta rede regulatória seja essencial para a correcta morfogénese do esporo (19, 36).

Prevenir a divisão assimétrica na célula-mãe, permitir o envolvimento do pré-esporo (*spoIID*, *spoIIP*, *spoIIM*), iniciar a montagem do manto (*spoIVA*, *spoVID*, *cotE*) (19, 36), e transcrever o gene que codifica para o último factor sigma na esporulação, σ^K , são algumas das principais funções do regulão σ^E (61).

1.8. Regulação da síntese e da activação do factor σ^G no pré-esporo

σ^G fica activo após o envolvimento e é o terceiro factor sigma na esporulação, activo no pré-esporo (fig. 3) (51, 74). A expressão génica dependente de σ^G é regulada no pré-esporo a dois níveis: expressão do gene *sigG*, que codifica para σ^G , e sua activação. *sigG* é co-transcrito com o operão *spoIIG*, e conseqüentemente transcrito na célula pré-divisional (94, 145). No entanto este RNA mensageiro não leva à produção de σ^G , devido ao facto deste RNA longo formar uma estrutura secundária que sequestra o RBS (*ribosome binding site*) do gene *sigG*, bloqueando a sua tradução (94). A acumulação de σ^G depende então de um promotor localizado na região intergénica *sigE-sigG*, o qual é reconhecido por σ^F (145). Uma vez que o promotor de *sigG* é dependente de σ^F , o factor σ^G acumula principalmente no pré-esporo (46, 74, 93).

A transcrição a partir do promotor do gene *sigG* é atrasada quando comparada com a expressão de outros genes dependentes de σ^F (61, 77). Este atraso poderá ser causado pelo facto da expressão a partir deste promotor ser dependente de um outro gene do regulão σ^F , *spoIIQ*, e da actividade de σ^E na célula-mãe (110, 147). No entanto o sinal gerado na célula-mãe necessário para a expressão de *sigG* no pré-esporo não é até hoje conhecido. Uma vez activo, σ^G é capaz de utilizar o promotor do gene *sigG*, iniciado um ciclo auto-catalítico que permite a acumulação rápida do factor sigma (61, 145).

Após a sua síntese no pré-esporo σ^G é mantido num estado inactivo até à finalização do envolvimento pela célula mãe. São conhecidos três inibidores de σ^G : a protease LonA (134), e os anti-sigmas SpoIIAB (26, 78, 81, 121) e CsfB (24, 75). LonA, pertencente à família de proteases dependentes de ATP (21, 124), actua inibindo σ^G em situações em que as células não seguem o caminho da esporulação (134, 137). Durante a esporulação LonA actua de modo a prevenir a activação ectópica de σ^G na célula mãe (24, 137). SpoIIAB, o anti-sigma que regula σ^F , é também capaz de interagir directamente com σ^G (26, 41, 78, 81). É importante na regulação da actividade de σ^G em condições em que a esporulação não é induzida, e durante a esporulação na célula mãe (22, 138). No entanto não há evidência para que tenha um papel na regulação de σ^G no pré-esporo (138). O terceiro regulador negativo é CsfB (ou Gin), um novo tipo de factor anti-sigma (24, 75). CsfB tem 4 cisteínas dispostas de uma forma conservada comparando com proteínas ortólogas, que ligam iões de zinco (75) que são essenciais para a sua actuação sobre σ^G (122). CsfB combina duas características essenciais a um regulador capaz de inibir σ^G no pré-esporo: liga especificamente a σ^G e não a σ^F (ao contrário do que acontece com SpoIIAB) e é produzido sob o controlo de σ^F no pré-esporo (29). No entanto a literatura não é clara quanto ao papel de CsfB durante a esporulação: enquanto alguns autores propõem que CsfB tem uma função essencial na regulação de σ^G no pré-esporo, outros sugerem que a ausência de *csfB* leva à activação desregulada de σ^G mas apenas em células que não entraram ainda em esporulação (15, 24, 75). Unânime parece ser o papel de CsfB como anti-sigma capaz de inibir a actividade de σ^E no pré-esporo ((23), este trabalho). Em qualquer caso, devido à capacidade auto-regulatória de σ^G , a acção concertada destes 3 inibidores do sigma é essencial para evitar a activação ectópica do mesmo (139).

Activação de σ^G no pré-esporo requer o fim do envolvimento do pré-esporo pela célula mãe, expressão do operão *spoIIIA* na célula mãe, e a expressão do gene vegetativo *spoIIJ*. A conclusão do processo de envolvimento é um requisito para a eficiente activação de σ^G , já que mutações que o bloqueiam previnem também a activação de σ^G , mas não afectam a transcrição de *sigG* (38, 39, 78, 136, 146). Não se sabe se a dependência é directa ou indirecta, mas parece improvável que os produtos dos genes necessários ao processo de

envolvimento (*spoIID*, *spoIIP*, *spoIIM*) tenham uma acção directa na actividade de σ^G (38). No entanto o mecanismo que liga a activação de σ^G à conclusão do processo de envolvimento não foi até hoje identificado. Do operão *spoIIIA* fazem parte 8 genes que são transcritos na célula mãe sob o controlo do factor σ^E (68). Todos os genes *spoIIIA* codificam para proteínas membranares que junto com a proteína membrana do pré-esporo, SpoIIQ, formam um novo sistema de secreção (15, 95). A inserção na membrana de pelo menos uma das proteínas SpoIIIA, SpoIIIAE, necessita do auxílio da translocase de proteínas de membrana, SpoIIIJ (140). Este factor explica por si o envolvimento de SpoIIIJ, codificado pelo gene vegetativo *spoIIIJ*, na activação do σ^G (140). O complexo SpoIIIA-SpoIIQ estende-se pelo espaço intermembranar que separa o pré-esporo da célula mãe, estabelecendo um contacto directo entre o citoplasma das duas células (15, 95). Recentemente foi sugerido que este canal poderia funcionar como um “cordão umbilical” que manteria o potencial de síntese macromolecular do pré-esporo mesmo após o seu isolamento do meio exterior, o que seria essencial para a actividade dos factores sigma no pré-esporo (14, 32).

Após a activação de σ^G este vai permitir a transcrição de vários genes. Existem pelo menos 3 classes de genes dentro do regulão σ^G : uma envolvida no processo de esporulação, outra na germinação e por fim na protecção do DNA contra degradação (61). As funções de σ^G essenciais para a esporulação incluem a transcrição do seu próprio promotor, de *yabK* que é necessário para a transição de σ^F para σ^G , dos genes *spoIVB* e *bofC* que codificam para proteínas que permitem a activação do último factor sigma da célula-mãe, σ^K , a expressão do operão *spoVA* que é necessário para a entrada de ácido dipicolínico da célula mãe para o pré-esporo, e por fim de *spoVT* que codifica para um regulador transcricional de genes dependentes de σ^G (5, 16, 35, 40, 52, 74, 99, 145, 150, 153). As funções de σ^G na germinação incluem a transcrição dos operões *gerA* e *gerB* que codificam para receptores de compostos germinativos, e *pdaA* que é necessário para uma modificação única do PG do córtex, a acumulação de ácido murâmico na forma δ -lactâmica (49, 107, 108). Por fim a protecção do DNA envolve a transcrição dos genes *splB* (protecção contra UV), *ygfS*

(endonuclease), e os genes *ssp* que codificam SASPs (pequenas proteínas ácidas solúveis), proteínas dominantes no núcleo do esporo (42, 59, 61, 112, 130, 151).

1.9. Expressão genética tardia na célula-mãe: o último factor sigma da esporulação σ^K

O último factor sigma a ser activado na cascata de diferenciação do esporo é σ^K . O gene codificante para o factor pró- σ^K é interrompido por um elemento profágico (148) (elemento *skin*, de *sigma K intervening sequence*) que deve ser excisado para reunir as extremidades 5' e 3' do gene (38, 61, 117, 128). A excisão do elemento *skin* requer a recombinase SpoIVCA (84, 85, 119). O gene *spoIVCA* é transcrito sob a direcção de σ^E com a assistência do factor transcricional SpoIIID, e por isso a recombinação/reparação do gene composto codificante para σ^K é circunscrita à célula-mãe (54, 85, 132, 133). O elemento *skin* não está presente em mais nenhum organismo esporulante com a excepção de *Clostridium difficile* (61). A transcrição do gene rearranjado *sigK* ocorre sob o controlo de σ^E e SpoIIID, e deste modo perto do final do processo de envolvimento quando SpoIIID acumula a níveis suficientes na célula (84, 133). Tal como σ^E , também σ^K é inicialmente produzido sob a forma de uma pré-proteína inactiva, pro- σ^K , com uma extensão N-terminal de 20 resíduos hidrofóbicos (82, 144), que dirige a proteína para a membrana externa do pré-esporo (164). O processo de activação de σ^K está bem estudado e depende de proteínas codificadas tanto na célula mãe como no pré-esporo (σ^G dependentes). Da célula mãe provêm, codificadas pelo operão bicistrónico *spoIVF*, SpoIVFA e SpoIVFB e codificada pelo gene *bofA*, a proteína BofA. Todas co-localizam num complexo na membrana externa do pré-esporo onde se dá a proteólise de pró- σ^K (35, 53, 126, 167). Estudos mais recentes sugerem que no complexo, BofA é um inibidor da metalo-protease SpoIVFB, responsável pelo processamento de pró- σ^K , e SpoIVFA é a proteína que medeia o contacto entre SpoIVFB e BofA (35, 126, 167). No pré-esporo é produzida uma protease de serina, SpoIVB (27, 52), que é necessária à activação da protease SpoIVFB (35). Embora SpoIVB seja produzida no pré-esporo é posteriormente excretada para o espaço intermembranar, onde depois contacta com o complexo SpoIVFA/SpoIVFB/BofA (126). SpoIVB promove então o corte de SpoIVFA, desta forma libertando BofA e permitindo a acção da protease

SpoIVFB sobre pró- σ^K (18, 168). Como a síntese de SpoIVB é maioritariamente dependente de σ^G , a activação de σ^K só ocorre após a conclusão do processo de envolvimento do pré-esporo pela célula mãe. Uma segunda protéase de serina, CtpB, sintetizada em ambos os compartimentos da célula em desenvolvimento, é indispensável para a activação no tempo certo de σ^K . CtpB tem igualmente uma actividade proteolítica sobre SpoIVFA. SpoIVB é também capaz de proteolisar CtpB, mas este corte não é necessário para correcta activação de σ^K (18). Supõe-se assim que SpoIVB e CtpB façam parte de uma cadeia catalítica que intervém na activação de SpoIVFB mediante a degradação de SpoIVFA (18).

O factor σ^K dirige a expressão de genes envolvidos nos passos finais da morfogénese do córtex e do manto do esporo, incluindo genes necessários para a germinação do esporo e para a autólise da célula mãe (61). O regulão σ^K inclui também um factor transcricional, *gerE*. GerE é necessário para a repressão da expressão de alguns genes assim como para a activação de outros genes deste regulão (166). Esporos produzidos na ausência de GerE não germinam eficientemente (98).

1.10. OBJECTIVOS

Este estudo debruçou-se sobre o papel de duas proteínas regulatórias, YabK e CsfB, durante a esporulação. CsfB é um factor anti-sigma recentemente identificado capaz de inibir os factores σ^G e σ^E no pré-esporo (23, 24, 75). Uma análise bioinformática revelou a existência de um segundo gene, *yabK*, que codifica para uma proteína com alguma semelhança com CsfB. Tal como CsfB (64 aminoácidos e 7.3 kDa) (24, 75), YabK é uma proteína pequena (76 aminoácidos, ou 8.8 kDa) (16). Além disso, ambas as proteínas possuem 4 cisteínas dispostas num motivo de ligação de Zn^{2+} . Exibem ainda duas tirosinas conservadas, a jusante do motivo definido pelas 4 cisteínas, conservadas e essenciais para função (16). Tal como *csfB*, o gene *yabK* é transcrito no pré-esporo sob o comando de σ^F (143). Resultados preliminares indicam contudo que CsfB desaparece do pré-esporo em fases tardias do desenvolvimento, passando a acumular na célula mãe. O significado biológico desta observação não é conhecido. Também não se sabe se o mesmo fenómeno

de transição pré-esporo-célula mãe se passa com YabK. Este trabalho incidiu sobre a análise da função funcional do gene *yabK* durante a esporulação e sobre os mecanismos que possibilitam a acumulação tardia de CsfB na célula mãe. Os objectivos deste trabalho foram assim definidos:

1. Estudo do padrão temporal e espacial da expressão de *yabK* durante a esporulação. Utilizámos para tal uma fusão transcricional do gene repórter *yfp* ao promotor do gene *yabK*;
2. Caracterização funcional de um mutante *yabK*;
3. Estudo da possível redundância entre YabK e CsfB durante a esporulação;
4. Teste da interacção directa entre YabK e CsfB com os factores sigma que controlam a esporulação recorrendo ao sistema de dois híbridos (*yeast two hybrid*).
5. Estudo da expressão tardia de CsfB na célula mãe recorrendo à construção de fusões transcricionais e traducionais entre *csfB* e os genes repórter *gfp* e *lacZ*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Técnicas microbiológicas

2.1.1. Estirpes bacterianas, condições de crescimento e técnicas gerais

A estirpe de *E. coli* DH5 α foi utilizada neste trabalho enquanto hospedeiro para clonagem molecular. Todas as estirpes de *B. subtilis* utilizadas neste trabalho são congênicas com a estirpe Spo⁺ MB24 (*trpC2 metC3*), e encontram-se descritas na secção de anexos (tabela 8). Foram também utilizadas estirpes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ver a tabela 9) para a análise de interações proteína-proteína num sistema de dois híbridos (*Yeast two-hybrid*).

Todas as espécies bacterianas foram mantidas e propagadas em meio de Luria Bertani (LB), cuja composição é indicada na tabela 1 (anexos). Quando necessário, para manter ou seleccionar plasmídeos replicativos ou integracionais, foram adicionados antibióticos aos meios, em concentrações definidas na tabela 2 (anexos). As espécies de levedura foram propagadas e mantidas em meio *Yeast Peptone Dextrose* (YPD, tabela 1, anexos). Para a selecção de transformantes de *Saccharomyces cerevisiae* foi utilizado o meio mínimo *Synthetic Dextrose* (SD) suplementado por adição de diferentes aminoácidos para as concentrações indicadas na tabela 1 (ver em anexos).

Todos os meios de crescimento foram autoclavados a 120 °C durante 20 minutos e mantidos à temperatura ambiente (TA) por períodos não superiores a duas semanas. Todas as demais soluções utilizadas neste estudo encontram-se descritas na tabela 4 (anexos).

2.1.2. Indução da esporulação

A esporulação das estirpes de *B. subtilis* foi induzida por crescimento e exaustão de nutrientes em *Difco Sporulation Medium* (DSM). O início da esporulação ou T0 (“tempo zero”), é definido como o final da fase exponencial de crescimento e início da fase estacionária. Para definir o T0 é realizada uma curva de crescimento através da medição da densidade óptica (DO) a 600 nm a intervalos de 30 min.

2.1.3. Determinação da eficiência da esporulação

A partir de um pré-inóculo crescido em LB a 37 °C durante 6 horas a 180 rpm, foram inoculados 10 ml de DSM suplementado (ver acima) para uma DO_{600} aproximada de 0.05. A cultura foi incubada com agitação de 150 rpm a 37 °C. Dezoito horas após o T0, foram realizadas diluições seriadas até 10^{-6} em sais B&W e foram plaqueados 100 µl das diluições 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} em caixas de LB agar para a determinação do título de células viáveis. Os tubos das diluições originais apropriadas, estimadas por observação das culturas em microscopia de contraste de fase¹, foram de seguida incubados durante 20 minutos a 80 °C. Foram plaqueados 100 µl de cada diluição em caixas de LB agar e estas incubadas durante a noite a 37 °C. A percentagem de esporulação é calculada como a razão entre o número de unidades formadoras de colónias (UFC/ml) resistentes ao calor e o número de UFC/ml viáveis, multiplicado por 100.

2.1.4. Microscopia óptica de contraste de fase e de fluorescência

Foram recolhidas amostras de 1 ml de culturas de *B. subtilis*, e estas foram centrifugadas durante 2 min a 4700 g. O sedimento celular foi ressuspensão em 200 µl de tampão PBS (1X) e foi adicionado o corante membranar FM4-64 (*Molecular Probes*) para uma concentração final de $10 \mu\text{g ml}^{-1}$. Foram preparadas lâminas de microscopia com uma película de agarose (1.7%) e sobre esta foram aplicados 3 µl da suspensão celular. As amostras foram então visualizadas num microscópio óptico equipado com óptica de contraste de fase e de fluorescência (Leica DM6000B) e com uma câmara digital arrefecida iXonEM+ 885 (Andor Technology, Connecticut, USA). As imagens de contraste de fase e de fluorescência foram obtidas com filtros *standard* para a GFP e para FM4-64, a uma ampliação de 1600X. Para o processamento das imagens foi usado o programa *Metamorph* (*Molecular devices, Berks, UK*) e *Adobe Photoshop CS* versão 8.0 (Adobe Systems Incorporated).

¹ A observação de esporos refrácteis num campo do microscópio, corresponde normalmente a um título de esporos resistentes ao calor de 10^5 .

2.2. Técnicas gerais de genética microbiana e de biologia molecular

2.2.2. Extração de DNA plasmídico em pequena escala

As estirpes ou colónias de transformantes de *E. coli* a analisar para a presença de plasmídeos e/ou para investigar a sua estrutura física, foram inoculadas em 5 ml de meio líquido LB, e as culturas incubadas durante a noite com uma agitação de 100-120 rpm a 37 °C. No dia seguinte, as células em 2 ml de cultura foram colhidas por centrifugação numa microcentrífuga (5 min a 13000 rpm, e à TA). O sedimento foi ressuspense numa solução de STET (360 µl), liozima (24 µl) e RNAase A (10µl), e incubado a 37 °C durante 15 minutos. A suspensão foi então fervida durante 1 minuto e centrifugada a 13000 rpm (numa microcentrífuga), durante 15 min à TA. Com uma ansa estéril, foi retirado o sedimento e foram adicionados 280 µl de isopropanol ao sobrenadante, após o que a mistura foi centrifugada durante 30 min 13000 rpm (numa microcentrífuga) e a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com etanol a 80%. Após a lavagem, o sedimento foi deixado a secar ao ar. Por fim, o DNA plasmídico foi ressuspense em 20 µl de ddH₂O autoclavada e guardado a -20 °C, se necessário, até ser utilizado.

2.2.3. Extração e purificação de DNA plasmídico por troca iónica

Este processo foi feito com recurso ao sistema *QIAprep Spin* (QIAGEN) de acordo com o protocolo disponibilizado pelo fabricante. O método baseia-se na lise alcalina das células e na adsorção do DNA, na presença de sal, a uma matriz de sílica imobilizada numa coluna. Esta metodologia foi utilizada em experiências de transformação genética, clonagem e sequenciação de DNA, onde o grau de pureza, a qualidade e a concentração do material final obtido é importante.

2.2.4. A competência

A competência é a capacidade das células bacterianas ligarem e adquirirem DNA exógeno. *B. subtilis* é naturalmente competente. Esta característica pode ser artificializada para espécies que não são naturalmente competentes, como *E. coli*. Um método muito utilizado consiste no seu tratamento pelo CaCl₂.

2.2.5. Preparação de células competentes de *E. coli* pelo método do CaCl₂

Uma colónia isolada de *E. coli* DH5 α foi inoculada em 5 ml de meio líquido LB, e incubada durante a noite com uma agitação orbital de 120 rpm a 37 °C. Após o crescimento a cultura foi diluída 1:50 em LB e incubada a 37 °C, com agitação orbital de 150 rpm até uma DO_{600nm} de 0.6. As células foram então colhidas por centrifugação a 4700 g no rotor JA-14 (Beckam), durante 5 minutos a 4 °C. O sedimento celular foi lavado com uma solução de 0,1 M CaCl₂ mantida a 4 °C (1/2 do volume inicial de cultura). A suspensão celular foi então mantida no gelo durante cerca de 2 horas e de novo centrifugada a 4700 g durante 5 min a 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspensão em 0,1 M CaCl₂ (6% do volume inicial da cultura) contendo 15% de glicerol. Foram feitas alíquotas de 200 μ l e estas foram mantidas a -80 °C até à sua utilização.

2.2.6. Transformação de células competentes de *E. coli* por choque térmico

A uma alíquota de células competentes (ver acima) foram adicionados 10 μ l de uma mistura de ligação ou 1 μ l de um plasmídeo purificado. A mistura foi incubada no gelo um mínimo de 30 minutos, após o que foi rapidamente transferida para um banho a 42 °C durante 90 segundos, e de novo mantido no gelo, por 2 minutos. Foi de seguida adicionado 1 ml de LB a 37 °C, e a suspensão celular foi incubada um mínimo de 1 hora a 37 °C com agitação de 180 rpm.

As células foram então colhidas por centrifugação durante 2 minutos a 3500 g, à TA. Foi retirado 1 ml do sobrenadante, e o sedimento foi ressuspensão no restante volume da suspensão original. As células foram plaqueadas em caixas de meio LB suplementado com os antibióticos necessários à concentração selectiva (ver a tabela 2, nos Anexos). As caixas foram incubadas a 37 °C durante a noite.

2.2.7. Extração de DNA genómico total de *B. subtilis*

Uma colónia de *B. subtilis* foi inoculada em 5 ml de meio líquido LB, e a cultura foi incubada durante a noite com uma agitação orbital de 100-120 rpm, a 37 °C. As células foram colhidas por centrifugação a 13000 rpm, numa microcentrífuga, durante 5 min à TA.

O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi ressuspenso em 1ml de tampão SET. Adicionaram-se 100 µl de lisozima e 10 µl de RNAase A, e a suspensão foi incubada durante 10 min, a 37 °C. Adicionaram-se então 50 µl de Sarkosyl 10% e 10 µl de proteinase K, e a mistura foi incubada durante 30 min, a 37 °C. Foi então adicionado 1 ml de uma mistura de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1), e a mistura agitada até se formar uma suspensão homogénea. De seguida, centrifugou-se a suspensão a 13000 rpm, numa microcentrífuga, durante 15 minutos à TA. A fase aquosa é recuperada para um novo tubo, sendo adicionado 1 ml de clorofórmio, e a mistura agitada até à homogeneidade. A suspensão é então centrifugada a 4700 g (13000 rpm numa microcentrífuga) durante 15 min à TA. Recupera-se a fase aquosa, contendo o DNA, sendo esta dialisada contra um excesso de ddH₂O. No final, o DNA é mantido a 4 °C.

2.2.8. Preparação de células competentes de *B. subtilis* e a sua transformação

Para induzir a competência de *B. subtilis*, uma colónia fresca foi inoculada em 5 ml de meio GM1 (tabela 5, nos anexos), e incubada a 37 °C com agitação orbital de 200 rpm, até 90 minutos após o final da fase exponencial de crescimento. De seguida, a cultura foi diluída 1:4 em meio GM2 (tabela 5, anexos), e a nova cultura incubada por 2 horas a 200 rpm e a 37 °C. Finalmente, foram transferidos 500 µl da cultura em GM2 para um novo tubo, e foram adicionados 5 µl de DNA a transformar. A mistura foi agitada 1 hora a 200 rpm, a 37 °. Foram plaqueados 200 µl da mistura de transformação em caixas de LB, com os antibióticos adequados. As caixas foram incubadas durante a noite a 37 °C.

2.2.9. Transformação de *Saccharomyces cerevisiae*

A transformação de *S. cerevisiae* foi efectuada recorrendo a electroporação. Neste método, é aplicada uma descarga eléctrica a uma suspensão celular, que leva à permeabilização temporária da membrana e a entrada de macro-moléculas como o DNA (120, 154). Este processo passa por duas fases: i) a preparação de células electrocompetentes e ii) a electroporação. Os procedimentos usados são baseados em Becker & Guarante (1991) (9) e Ausubel *et al* (1987) (4).

2.2.9.1. Preparação das células electrocompetentes

A estirpe a transformar foi inoculada em 500 ml de meio YPD e a cultura foi incubada a 30 °C com uma agitação de 250 rpm até atingir uma DO_{600} entre 0,30 e 0,35. A suspensão foi colocada em gelo durante 15 minutos para parar o crescimento. De seguida as células foram colhidas por centrifugação a 4000 g, durante 5 minutos a 4 °C, e ressuspensas em 80 ml de ddH₂O estéril. Foram adicionados 10 ml de TE (10x) e 10 ml de acetato de lítio 1M. A mistura foi incubada a 30 °C durante 45 minutos com agitação orbital (85 rpm). Foram adicionados 2.5 ml de uma solução 1M de DTT, e a mistura incubada por mais 15 minutos nas mesmas condições. Foi adicionada ddH₂O autoclavada a 4 °C, até perfazer 500 ml e a mistura foi centrifugada como anteriormente. O sobrenadante foi retirado e o sedimento foi ressuspenso em 50 ml de ddH₂O (a 4 °C) utilizando um agitador de vórtex. O volume foi elevado até aos 500 ml com ddH₂O estéril a 4 °C e as células de novo colhidas por centrifugação (como anteriormente). O sedimento celular foi ressuspenso em 25 ml de uma solução 1M, autoclavada, de sorbitol a 4 °C, e a mistura foi de novo centrifugada como acima. Por fim, o sedimento celular foi ressuspenso em 500 µl sorbitol (1M, a 4 °C). A suspensão celular é guardada no gelo e a electroporação é feita logo após. Em todos os passos deste protocolo, as células devem ser mantidas no gelo.

2.2.9.2. Electroporação e transformação

Para cada transformação, foi preparado um tubo *Falcon* contendo 1 ml de uma solução 1M sorbitol, autoclavada, e um tubo de 1,5 ml contendo 5 µl do DNA a transformar (dialisado). Ambos os tubos, juntamente com uma cuvete de electroporação de 0,2 cm, foram mantidos no gelo. Foram então adicionados 40 µl de células aos tubos contendo o DNA; a mistura foi agitada suavemente e incubada no gelo durante 5 minutos. A suspensão foi de seguida colocada na cuvete e sujeita a electroporação nas seguintes condições:

$$C = 25 \mu\text{F}; PC = 200 \text{ ohm}; V = 1,5 \text{ kV}$$

Imediatamente após a electroporação, foi adicionado 1 ml de 1M sorbitol autoclavado, e as células ressuspensas suavemente. Foram plaqueados 200 µl por cada caixa de meio selectivo e estas incubadas durante 48-72 horas a 30 °C.

2.2.9.3. Conjugação

Para realizar a conjugação de leveduras é necessário que as células intervenientes sejam de tipos diferentes, MATa e MAT α . Cada um destes tipos de células produz feromonas de acasalamento diferentes, a e α , respectivamente, que promovem a fusão das células durante a conjugação. Estas feromonas são reconhecidas por receptores específicos na membrana da levedura (70).

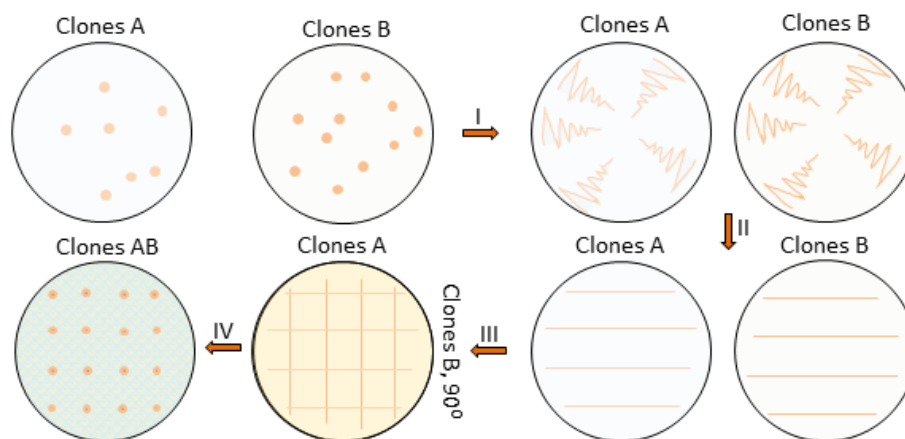


Figura 4 - Esquema exemplificativo do protocolo de conjugação. Cada circunferência representa uma caixa de Petri. As cores variam para diferenciar os meios: a cor salmão, III, representa o único meio não selectivo; a cor cinza (Meio IV), representa o meio selectivo para clones resultantes da conjugação entre A e B. A terminologia no nome dos clones é apenas ilustrativa. Os círculos representam colónias isoladas e as linhas representam riscados de células.

Após obter transformantes de leveduras MATa e MAT α , como descrito no protocolo anterior, as colónias transformadas foram repicadas (I, fig. 4). As caixas foram incubadas durante 48-72 horas a 30 °C, após o que as colónias foram de novo repicadas para caixas de meio selectivo, num padrão em linha (uma linha para cada colónia; II, Fig. 4). As caixas foram incubadas durante 48-72 horas a 30 °C. Após o crescimento foram feitas réplicas das duas linhas diferentes de levedura, para a mesma caixa de meio não selectivo. A réplica é feita de modo a que as duas linhas formem um ângulo de 90° uma em relação à outra (III, Fig. 4). As caixas são incubadas 48-72 horas, e depois as células

(englobando as duas linhas iniciais) são repicadas para meio selectivo e incubadas a 30 °C durante 48-72 horas. Os conjugantes são isolados nos locais de intercepção das duas linhas celulares (IV, Fig. 4).

2.2.10. Reacção em cadeia da polimerase do DNA (PCR)

Esta técnica recorre a uma polimerase do DNA termo-estável e de elevada fidelidade, a um DNA molde, e oligonucleotídeos iniciadores para, na presença de desoxirribonucleotídeos (dNTPs), amplificar exponencialmente uma região específica do DNA molde. Os iniciadores são sequências de DNA que hibridam com o DNA e definem os limites de região a amplificar. A amplificação exponencial é possível devido à existência de vários ciclos repetitivos de 3 etapas, desnaturação (abertura da cadeia dupla de DNA), hibridação dos iniciadores ao DNA e extensão/polimerização pela polimerase de DNA. A duração e a temperatura a que decorre cada etapa, bem como o número de ciclos, variam consoante as enzimas utilizadas a extensão e a sequência dos iniciadores, e a quantidade inicial de DNA molde (131). As polimerases de DNA foram utilizadas de acordo com os protocolos fornecidos pelos fabricantes: *Phusion*TM, (*Finnzymes, Thermo Fisher Scientific Inc.*) e *Taq*, (*Fermentas, Thermo Fisher Scientific Inc.*). A polimerase *Taq* não tem capacidade de correcção de erros e por isso, apresenta uma taxa de incorporação errónea de nucleotídeos muito superior à *Phusion* (que tem actividade correctiva). Devido a esta diferença, a *Taq* foi apenas utilizada em reacções para a verificação da estrutura de plasmídeos ou *loci* cromossomais, enquanto as amplificações com o objectivo de gerar fragmentos para sub-clonagem foram efectuadas com a *Phusion*.

2.2.11. Electroforese de ácidos nucleicos em géis de agarose

Para verificar a presença de fragmentos de DNA, estes foram sujeitos a electroforeses em géis de 1-2% de agarose em tampão TAE 1X, dependendo da gama de tamanhos moleculares a resolver. Os géis foram corridos na presença de brometo de etídeo, a uma concentração de 0,001% (v/v). Antes da aplicação em gel, foram adicionados 5 µl de tampão da laranja G a cada amostra. Os géis foram corridos a uma voltagem constante de

100 V, e o DNA visualizado sob radiação UV de baixo comprimento de onda (205 nm). Soluções utilizadas descritas na tabela 3 em anexos.

2.2.12. Manipulações enzimáticas do DNA

As manipulações enzimáticas do DNA, mediante o uso de enzimas de restrição e de modificação foram realizadas de acordo com os métodos gerais descritos por Sambrook *et al.* (131).

2.3. Técnicas bioquímicas

2.3.1. Determinação da actividade da enzima β -galactosidase

A enzima β -galactosidase é codificada pelo gene *lacZ* e consegue hidrolisar o substrato cromogénico o-nitrophenyl- β -D-galactoside (ONPG). Fusões transcricionais, nas quais o promotor de interesse dirige a transcrição do gene *lacZ* no organismo sob estudo, permitem avaliar a transcrição a partir desse mesmo promotor, medindo a hidrólise de ONPG (presente em excesso) pela β -galactosidase (97). Esta quantificação é apresentada em unidades de Miller (ver abaixo). As soluções utilizadas nestes ensaios estão apresentadas na tabela 6 em anexos.

2.3.1.1. Em *B. subtilis*

Foi feito um pré-inóculo em 5 ml de LB, a partir de colónias frescas, e este incubado durante a noite a 37 °C com uma agitação orbital de 80 rpm. No dia seguinte foram inoculados 30 ml de DSM suplementado, para uma DO₆₀₀ de 0.05, e a cultura foi incubada a 37 °C a uma agitação orbital de 150 rpm. O crescimento foi seguido medindo a DO₆₀₀ a intervalos de 30 minutos. Foi representado uma curva de crescimento para calcular o final da fase exponencial/início da fase estacionária, definido como o início da esporulação (T₀). A partir deste ponto, foram retiradas amostras de 300 μ l para tubos de 2 ml, a intervalos de 30 minutos (ao mesmo tempo que era determinada a DO₆₀₀). As células foram colhidas por centrifugação durante 5 minutos a 13000 rpm (numa microcentrífuga) à TA. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento mantido a -20 °C até ao tempo do ensaio.

Para o ensaio de actividade, foram adicionados ao sedimento 300 µl de tampão A e 700 µl de tampão Z. O sedimento foi ressuspensão e de seguida foram adicionados 10 µl de tolueno. A suspensão foi agitada durante 10 segundos à velocidade máxima de um agitador de vórtex. Os tubos foram então transferidos para um banho a 28 °C e incubados 10 min com a tampa fechada e mais 20 min com a tampa aberta para a evaporação do tolueno. Foram então adicionados 200 µl de solução de ONPG, a mistura agitada durante 3 segundos num agitador de vórtex e imediatamente transferida para um banho equilibrado a 28 °C. Após o desenvolvimento de cor amarela nas amostras, ou após um tempo apropriado para o desenvolvimento de cor nas amostras de controlo positivo, a reacção foi terminada por adição de 500 µl 1M Na₂CO₃, e as amostras centrifugadas durante 5 min a 13000 rpm (numa microcentrífuga) à TA. O sobrenadante foi transferido para uma cuvete e foi lida a absorvância a 420 nm. A actividade da enzima β-galactosidase foi determinada com recurso à equação abaixo, e expressa em unidades de Miller:

$$\text{Actividade da } \beta\text{-galactosidase} = 1,000 \times \text{DO}_{420} / (t \times V \times \text{DO}_{600})$$

t- tempo de incubação

V- volume de amostra retirado para centrifugação aquando o crescimento.

OD_{600nm}- A_{600nm} de 1 ml de cultura

2.3.1.2 Em *Saccharomyces cerevisiae*

Ensaio em meio líquido. Um pré-inoculo crescido durante a noite em meio selectivo SD a 30 °C com uma agitação orbital de 120 rpm, foi diluído 5x em 8 ml de meio YPD. A cultura foi incubada a 30 °C durante 3-5 horas a uma rotação orbital de 230-250 rpm até apresentar uma DO_{600nm} entre 0,5 e 0,8. Foram transferidos 1,5 ml de cultura para 3 tubos e estes foram centrifugados a 13000 rpm (numa microcentrífuga), durante 30 segundos à TA. O sobrenadante foi eliminado e o sedimento foi ressuspensão em 1 ml de tampão Z. De novo, o material celular foi colhido por centrifugação (como no passo anterior), e ressuspensão em 300 µl de tampão Z. Foram então transferidos 100 µl para um tubo de 1,5 ml, e este sujeito a três ciclos de imersão em azoto líquido (30-60 segundos) e transferência para 37 °C (também durante 30-60 segundos). Finalmente, foram adicionados

700 µl de tampão Z contendo β-mercaptoetanol e logo após foram adicionados 160 µl de uma solução do substrato ONPG. Os tubos foram incubados num banho a 30 °C até se verificar o desenvolvimento de cor amarela, após o que foram adicionados 400 µl de uma solução 1 M de Na₂CO₃, para terminar a reacção. A mistura foi centrifugada a 13000 rpm numa microcentrífuga durante 10 minutos, transferida para uma cuvete de plástico e foi lida a absorvância do sobrenadante a 420 nm. Foi preparado um branco sem substituindo o material celular por tampão Z, de acordo com o protocolo acima. A actividade da enzima β-galactosidase (expressa em unidades de Miller), foi determinada recorrendo à equação:

$$\beta\text{-galactosidase} = 1,000 \times \text{OD}_{420} / (t \times V \times \text{OD}_{600})$$

t- tempo de incubação

V- 0,1 (ml) x factor de concentração (= 5, ressuspensão em 300 µl a partir de 1,5 ml)

OD_{600nm}- A_{600nm} de 1 ml de cultura

Ensaio em meio sólido. Após o crescimento das estirpes de interesse em caixas de agar durante 2-4 dias, foi colocado por cima das colónias um pedaço circular de papel de filtro 3MM e este pressionado suavemente para que as colónias ficassem coladas ao papel. O círculo de papel foi então retirado com cuidado, e mergulhado em azoto líquido. Após cerca de 10s, este foi retirado e deixado à TA até descongelar. Este passo foi feito um total de três vezes. Um outro pedaço circular de papel de filtro, com as mesmas dimensões, foi mergulhado numa solução de tampão Z contendo X-gal, e sobreposto ao pedaço contendo as colónias (estas viradas para cima), evitando bolhas de ar. O conjunto foi deixado à TA, protegido da luz, por um período de tempo definido, ou até ao desenvolvimento de cor azul para o controlo positivo da experiência.

2.3.2. Determinação qualitativa da actividade enzimática da α-amilase

As estirpes de *B. subtilis* contendo o gene codificante para a α-amilase, *amyE*, intacto, têm a capacidade de degradar o amido. Não sendo essencial, este *locus* é muitas vezes utilizado para a inserção, por duplo *cross-over* de fusões de promotores a genes repórter ou de fragmentos de DNA para testes de complementação. A inserção interrompe o

gene *amyE* eliminando a produção da α -amilase e resultando na incapacidade de degradação de amido. Como um teste rápido pra verificar inserções no *locus amyE*, as estirpes ou colónias a testar são inoculadas numa caixa de LB agar com amido. Após crescimento, é adicionada uma solução de iodo, corante de iodo, que forma um complexo de cor azul com o amido. Sendo que a α -amilase é secretada, as colónias que produzem a enzima exibem um halo em seu redor, onde o amido foi degradado e portanto não há reacção com o iodo. Como o iodo tem actividade antimicrobiana, além de que a adição da solução de iodo às caixas pode resultar em contaminação cruzada, o teste é realizado em caixas-réplica (1, 28, 30).

3. RESULTADOS

O genoma de *B. subtilis* codifica para uma segunda proteína, o produto do gene *yabK*, com uma estrutura muito semelhante a CsfB, o anti-sigma capaz de inibir σ^G . O alinhamento entre CsfB e YabK é representado na figura 5B. Tal como CsfB, YabK é uma proteína pequena (76 aminoácidos, ou 8.8 kDa) com 4 cisteínas e duas tirosinas formando um motivo de ligação de Zn^{2+} (fig. 5B). Estudos anteriores mostraram que as cisteínas e as tirosinas conservadas são importantes para a função de CsfB no controlo da actividade do factor σ^G durante a esporulação (75, 122). Ambas as proteínas são conservadas em organismos esporulantes (fig. 5B). Tal como *csfB*, o gene *yabK* é transcrito no pré-esporo sob o comando de σ^F (143). Quando iniciámos este trabalho, a função de YabK durante a esporulação era desconhecida. A semelhança entre as duas proteínas levantou a questão se a sua função durante a esporulação é diferenciada ou antes redundante. Neste trabalho, a função de *yabK* durante a esporulação foi investigada em pormenor.

3.1. A estrutura do operão *yabK-mfd*.

yabK é o primeiro gene de um operão bi-cistrónico, que também inclui o gene *mfd*. Este último codifica para o factor de acoplamento transcrição/reparação complexo (“transcription-repair coupling factor” ou TRCF). (fig. 5A). Mfd reconhece polimerases do RNA que se encontram bloqueadas durante o processo de transcrição, e promove a dissociação do complexo polimerase/DNA/mRNA, de modo a libertar o transcrito e a enzima (125). Em casos em que o bloqueio da polimerase do RNA se deve a danos no DNA, é também a proteína Mfd a responsável pelo recrutamento da maquinaria de reparação do DNA (125). Este operão é ladeado por dois genes expressos durante a esporulação. *spoVC* que codifica para uma hidrolase de peptidil-tRNA (96) e *spoVT* que codifica para um regulador da expressão de genes dependentes de σ^G (5).

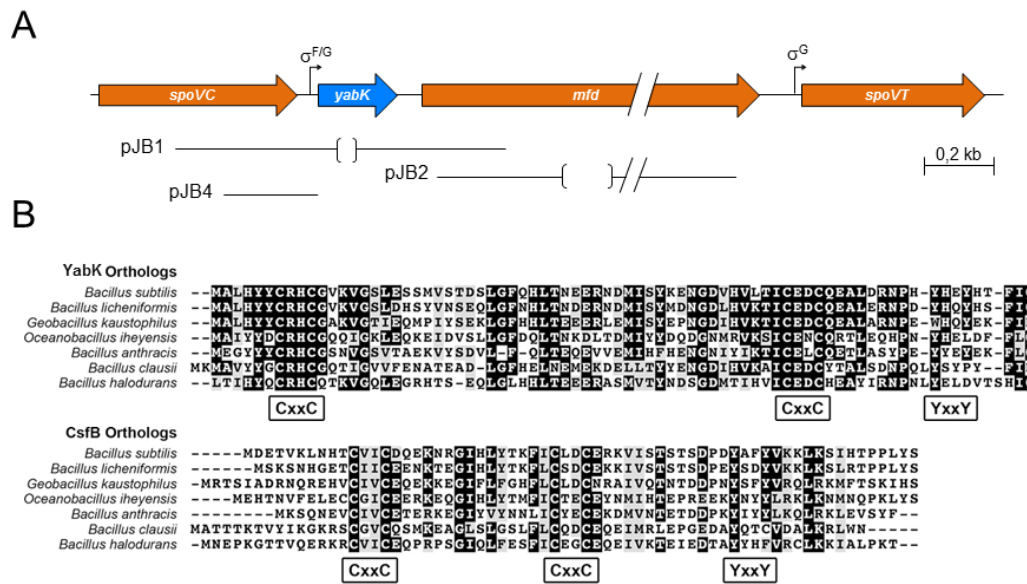


Figura 5 – O operão *yabK-mfd*. (A). Os genes *yabK* e *mfd* são transcritos a partir de um promotor reconhecido por σ^F e σ^G , e formam um operão. Este operão está rodeado por dois genes que são transcritos também durante a esporulação, *spoVC* e *spoVT*, como indicado. A esporulação. As linhas a seguir às designações pJB1, pJB2 e pJB4 referem-se às regiões do DNA clonadas nos plasmídeos indicados, com o símbolo “ () ” designando uma região do DNA removida mantendo a grelha de leitura do gene *mfd*. (B) A proteína YabK mostra-se conservada em diferentes espécies, onde se verifica também um elevado grau de semelhança entre ortólogos do factor anti-sigma G, CsfB. Estão representadas vários alinhamentos das proteínas YabK (em cima) e CsfB (em baixo) de diferentes espécies de *Bacillus* e outros organismos aparentados, selecionados. Nas sequências de aminoácidos, os resíduos idênticos ou similares em mais de 50%, estão identificados a preto ou cinzento respectivamente. As regiões Cys-X-X-Cys (CxxC) e Tyr-X-X-Tyr (YxxY) conservadas presentes nas famílias ortólogas YabK e CsfB estão indicadas. A figura retirada e mantida como a original de Camp. *et al.* (16).

3.2. A transcrição do gene *yabK* é activada especificamente no pré-esporo

De modo a verificar onde e quando era expresso o operão *yabK-mfd* durante a esporulação, foi construída uma fusão transcricional do promotor do operão ao gene que codifica para a proteína fluorescente amarela, *yfp*. Primeiro, o gene *yfp* (750 pb) foi amplificado utilizando os oligonucleotídeos iniciadores *yfpD* e *yfpR* (ver tabela 7) e como molde o plasmídeo pKL183 (88). O fragmento obtido foi inserido no vector pMLK83 (77) após digestão com *EcoRI* e *HindIII*, dando origem ao plasmídeo pJB3 (ver Fig. 5A). A região promotora do operão *yabK-mfd* (do nucleotídeo -236 até à posição -8 relativamente à adenina do códon de iniciação) foi amplificada por PCR com os oligonucleotídeos *yabK437D* e *yabK698R* usando como molde DNA cromossomal de uma estirpe selvagem.

O fragmento de 242 pb obtido foi digerido com *SalI* e *HindIII* e inserido em pJB3 digerido com as mesmas enzimas, dando origem a pJB4. pJB4 foi usado para transformar *B. subtilis* MB24, seleccionando para transformantes resistentes à neomicina. Esperava-se que os transformantes resultantes do cruzamento resultassem de uma integração por *cross-over* duplo no locus não essencial *amyE*. Assim, os transformantes foram rastreados para um fenótipo Amy^- , *i.e.*, incapacidade de produzirem a enzima α -amilase (ver material e métodos, 2.3.2.). Foi escolhida uma colónia Amy^- e a estirpe correspondente denominada de AH9509. Esta estirpe transporta uma fusão entre o promotor do gene *yabK* e o gene repórter *yfp*, inserida no locus *amyE* (*amyE::P_{yabK}-yfp*).

Para determinar o padrão de expressão do promotor em estudo, a acumulação de YFP em células da estirpe AH9509 foi seguida durante o crescimento e a esporulação em meio DSM (fig. 6). Verificou-se a produção de fluorescência no pré-esporo 2 horas após o início da esporulação (T2), coincidente com o fim da formação do septo assimétrico, e a consequente activação de σ^F no pré-esporo (fig. 6, estrela, sem septo não há fluorescência). A fluorescência mantém-se confinada ao pré-esporo após a finalização do processo de envolvimento do pré-esporo pela célula mãe (T4) e até ao final do processo de esporulação (T6). Na Figura 6 verifica-se a ausência, nos estágios tardios da esporulação (*i.e.*, após a conclusão do processo de envolvimento do pré-esporo pela célula mãe), da coloração da membrana do pré-esporo. Esta ausência de marcação das membranas do esporo, deve-se à incapacidade do corante lipofílico FM4-64 atravessar o citoplasma aquoso após a conclusão do processo de envolvimento (fig. 6, setas brancas). Deste modo, o corante FM4-64 permite monitorizar o final da sequência do envolvimento. Como a activação do factor σ^G coincide com a conclusão do processo de envolvimento, o corante FM4-64 permite também definir com precisão a activação deste factor sigma. Em conclusão, os nossos resultados mostram que a expressão do operão *yabk-mfd* é confinada ao pré-esporo e deverá ser activada sob o comando de σ^F , logo após a formação do septo assimétrico. Esta observação está de acordo com estudos anteriores, em que foram utilizados *arrays* de DNA (143). As expressões de *yabK* mantêm-se após a finalização do envolvimento do pré-esporo pela célula mãe (fig. 6), altura em que σ^G dirige o programa de expressão génica do pré-esporo. Os nossos

resultados sugerem assim que a expressão do gene *yabK* deve continuar no pré-esporo, após a conclusão do envolvimento, sob a direcção de σ^G .

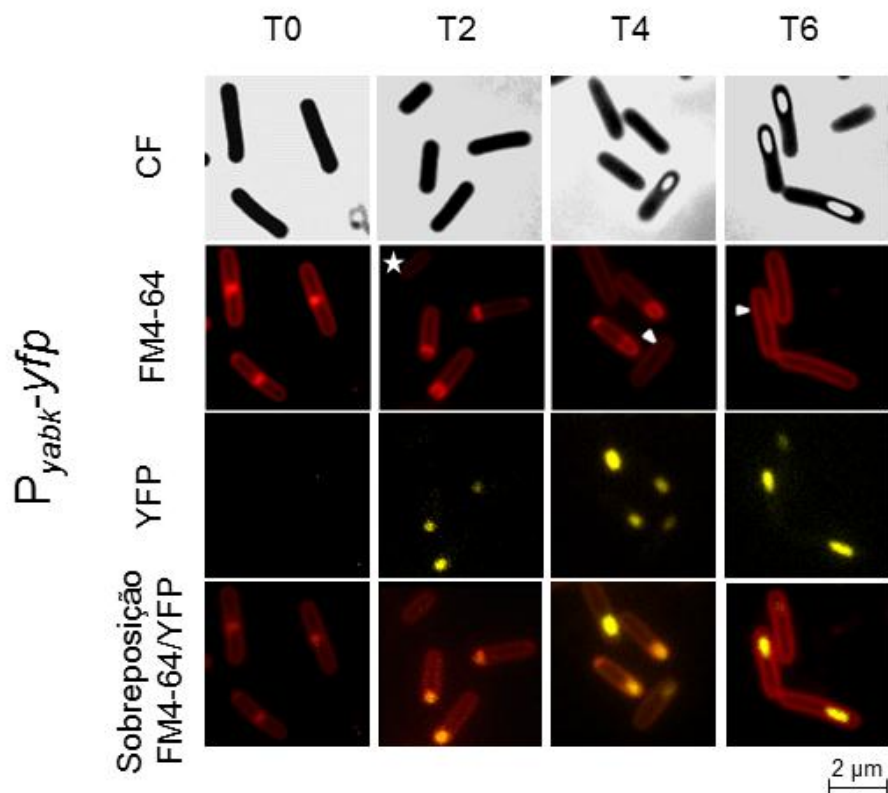


Figura 6 - *yabK* é transcrito sob o comando de σ^F e de σ^G . A figura ilustra o padrão de expressão da fusão $P_{yabK}\text{-}yfp$ em culturas da estirpe AH9509 ($amyE::P_{yabK}\text{-}yfp$) em meio de esporulação (DSM). As amostras foram retiradas nos tempos (T, indicados em horas) a partir do início da esporulação, marcadas com o corante de membrana FM4-64 e visualizadas por microscopia de contraste de fase (CF) e de fluorescência com filtros padrão para a YFP (proteína fluorescente amarela) e o FM4-64.

3.3. A proteína YabK é necessária para a esporulação e regula a expressão genética no pré-esporo

Para a caracterização funcional de *yabK* e *mfd* durante a esporulação foram construídos mutantes de inserção nestes genes. Uma vez que *yabK* e *mfd* pertencem ao mesmo operão foram produzidas mutações de eliminação em fase, de modo a que a mutação do gene *yabK* não interferisse com a expressão do gene a jusante. Os genes foram

amplificados por *Splicing by Overlapping Expression* PCR (*SOE-PCR* (65)) com os oligonucleotídeos iniciadores *yabK*236D, *yabK*717R, *yabK*874D e *yabK*1318R para o gene *yabK* e *mfd*1219D, *mfd*1749R, *mfd*4000D e *mfd*4507R para o gene *mfd*. Esta amplificação, ocorreu em duas fases. Primeiro amplificou-se parte dos genes com dois grupos de iniciadores e posteriormente com a sobreposição dos fragmentos resultantes amplificou-se, com os iniciadores externos, o fragmento final único (65). Deste modo foi eliminada, no caso de *yabK* a região compreendida entre os codões 6 e 58, e no caso de *mfd* foi eliminada a região entre os codões 250 e 1000. Os fragmentos finais foram digeridos com *SalI* e *BglII* e inseridos no plasmídeo pMAD (3) digerido com as mesmas enzimas, desse modo originando os plasmídeos pJB1 (*yabK*) e pJB2 (*mfd*) (fig. 5A). Estes plasmídeos foram utilizados para transformar a estirpe Spo⁺ M24 de *B. subtilis*. pMAD é um vector vai-vém (*shuttle*) construído para inserções/eliminações em bactérias de gram positivas. Este vector permite em placas com X-Gal fazer uma discriminação colorimétrica, azul-branco, para verificar a presença do plasmídeo na célula. O plasmídeo contém uma origem de replicação sensível à temperatura. À temperatura permissiva (<37 °C), comporta-se como um plasmídeo replicativo que é mantido na célula caso haja pressão selectiva, neste caso para resistência ao antibiótico eritromicina (3). À temperatura não permissiva (> 28°C), o plasmídeo pode integrar por *cross-over* simples e recíproco (mecanismo de Campbell) no genoma. A propagação destes transformantes na ausência de selecção permite a identificação de clones onde o plasmídeo foi excisado, deixando a mutação de eliminação em fase para *mfd* e *yabK* no genoma não deixando qualquer marca de resistência ao antibiótico associado. Os transformantes obtidos foram confirmados por PCR e denominados de AH9511 ($\Delta yabK$) e AH9512 (Δmfd). Posteriormente foi introduzida nestas estirpes uma fusão transcricional do gene repórter *lacZ* ao promotor do gene *sspE*, dependente de σ^G (104), e uma fusão transcricional do gene repórter *cfp* também ao promotor do gene *sspE*, dando origem às estirpes AH9517 e AH9522, respectivamente. Os mutantes duplos *csfB yabK* e *csfB mfd* foram obtidos por transformação das estirpes contendo as respectivas mutações de eliminação em fase e as fusões transcricionais ao promotor *sspE*, com DNA cromossomal do mutante $\Delta csfB::km$, originando as estirpes AH9523 e AH9520, respectivamente.

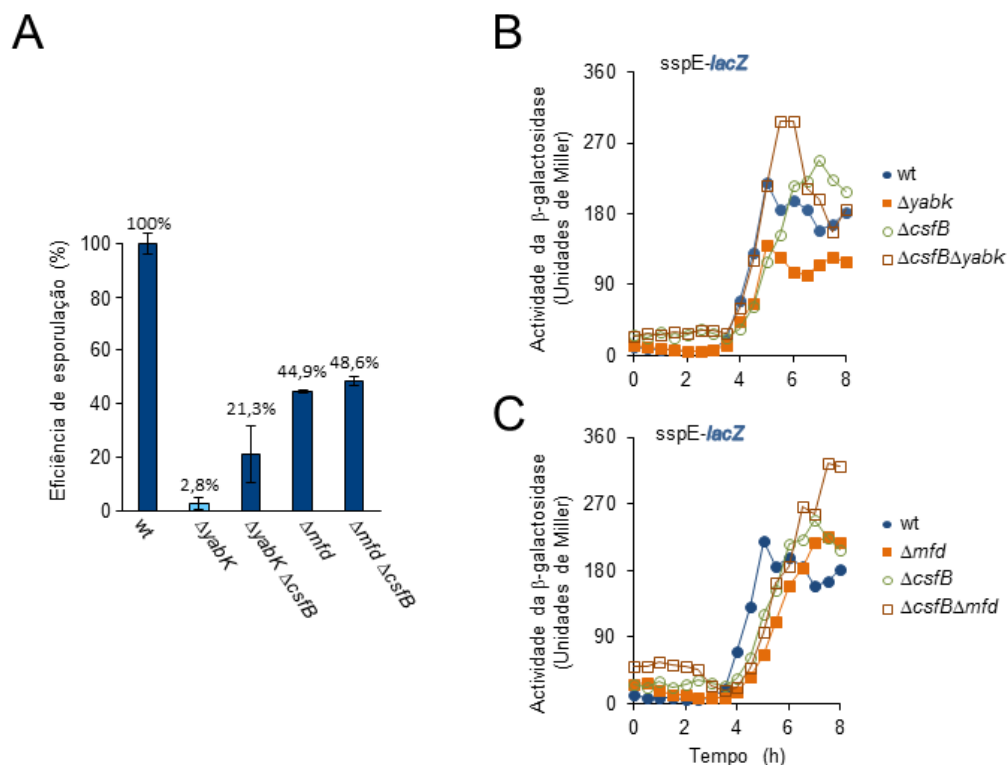


Figura 7 - *yabK* é necessário para a esporulação. (A) A figura representa a eficiência de esporulação das estirpes indicadas, expressa como a percentagem do título de esporos resistentes ao calor após 24 horas de crescimento/esporulação em meio DSM, em função do título obtido para a estirpe selvagem. Foram estudadas as seguintes estirpes: AH6567 (*wt*, $\Delta sspE::sspE-lacZ$ $\Delta yycR::sspE-cfp$), AH9517 ($\Delta yabK$, $\Delta yabK$ $\Delta sspE::sspE-lacZ$ $\Delta yycR::sspE-cfp$), AH9523 ($\Delta yabK$ $\Delta csfB$, $\Delta yabK$ $\Delta sspE::sspE-lacZ$ $\Delta yycR::sspE-cfp$ $\Delta csfB::km$), AH9522 (Δmfd , Δmfd $\Delta sspE::sspE-lacZ$ $\Delta yycR::sspE-cfp$) e AH9520 (Δmfd $\Delta csfB$, Δmfd $\Delta sspE::sspE-lacZ$ $\Delta yycR::sspE-cfp$ $\Delta csfB::km$). (B) A activação dependente de σ^G de $P_{sspE-lacZ}$ foi monitorizada durante a esporulação para as estirpes selvagem AH6567 (círculo cheio, $\Delta sspE::sspE-lacZ$ $\Delta yycR::sspE-cfp$), AH9517 (quadrado cheio, $\Delta yabK$ $\Delta sspE::sspE-lacZ$ $\Delta yycR::sspE-cfp$), AH6568 (círculo vazio, $\Delta sspE::sspE-lacZ$ $\Delta yycR::sspE-cfp$ $\Delta csfB::km$) e AH9523 (quadrado vazio, $\Delta yabK$ $\Delta sspE::sspE-lacZ$ $\Delta yycR::sspE-cfp$ $\Delta csfB::km$). (C) A activação dependente de σ^G de $P_{sspE-lacZ}$ foi monitorizada durante a esporulação para a estirpes selvagem AH9667 (círculo cheio, $\Delta sspE::sspE-lacZ$ $\Delta yycR::sspE-cfp$), para AH9522 (quadrado cheio, Δmfd $\Delta sspE::sspE-lacZ$ $\Delta yycR::sspE-cfp$), AH6568 (círculo vazio, $\Delta sspE::sspE-lacZ$ $\Delta yycR::sspE-cfp$ $\Delta gin::km$) e AH9520 (quadrado vazio, Δmfd $\Delta sspE::sspE-lacZ$ $\Delta yycR::sspE-cfp$ $\Delta csfB::km$). O tempo é indicado em horas após o início da esporulação.

De forma a determinar se *yabK* e/ou *mfd* teriam um papel durante o processo de esporulação as diferentes estirpes contendo as mutações de eliminação em fase foram crescidas em meio líquido de esporulação (DSM), e a eficiência de esporulação foi determinada (ver material e métodos, 2.1.3.). Na ausência de Mfd, quer num fundo

selvagem quer na ausência de CsfB, a eficiência de esporulação é reduzida para metade em relação ao observado para uma estirpe selvagem. Esta diminuição na eficiência de esporulação poderá estar relacionada com a função que esta proteína desempenha na reparação do DNA (fig. 7A). A mutação *csfB* não tem qualquer efeito detectável na eficiência da esporulação (24). No mutante *yabK* a eficiência de esporulação é 2,8% daquela observada para a estirpe selvagem (fig. 7A). Este resultado mostra que *yabK* é necessário para a eficiência da esporulação. Surpreendentemente, o duplo mutante $\Delta yabK \Delta csfB$ produz 10 vezes mais esporos que o mutante simples *yabK* (21.3%; fig. 7A). Este resultado leva a crer que qualquer que seja a função de *yabK* durante a esporulação, a sua necessidade pode ser parcialmente suprimida pela ausência de *csfB*.

Visto que os resultados expostos acima sugerem uma existência de uma interacção funcional entre *yabK* e *csfB*, a actividade de σ^G foi estudada em pormenor nestes mutantes. Para isso a expressão da fusão *spsE-lacZ* foi seguida monitorizando a actividade da enzima β -galactosidase durante o crescimento e a esporulação em DSM. Na estirpe selvagem AH6567 (*spsE::spsE-lacZ*), e de acordo com resultados anteriores (138), a fusão *spsE-lacZ* é activada quatro horas após o início da esporulação, o que coincide com a conclusão do processo de envolvimento do pré-esporo pela célula mãe na maioria da população celular (fig. 7B e C). A expressão da fusão atinge um máximo por volta da hora 6 da esporulação. Também de acordo com resultados anteriores (15, 24, 139), a mutação $\Delta csfB$ causa um padrão de expressão de *spsE-lacZ* bi-modal. O primeiro pico de expressão ocorre por volta da hora 2 de esporulação, após o que decresce para voltar a aumentar na altura da conclusão do envolvimento (fig. 7B e C). O primeiro período de expressão ocorre em células pré-divisionais (139). O segundo pico de expressão da fusão coincide com o período de actividade do factor σ^G na estirpe selvagem. Quando YabK não está presente verifica-se que a expressão da fusão *spsE-lacZ*, embora com um padrão semelhante ao obtido na estirpe selvagem, decresce consideravelmente (fig. 7B). Este resultado indica que *yabK* será necessário para a correcta activação de σ^G durante a esporulação. Esta observação poderá explicar o decréscimo na eficiência de esporulação obtida no mutante para este gene (ver acima). O duplo mutante $\Delta yabK \Delta csfB$ apresenta o mesmo padrão bi-modal de expressão de *spsE-lacZ* observado para o mutante simples $\Delta csfB$, com níveis de actividade de β -

galactosidase muito semelhantes ao deste último (fig. 7A). Ou seja, no mutante duplo os níveis de actividade de σ^G durante a esporulação são restaurados para os níveis selvagens. Esta observação poderá pelo menos em parte explicar o aumento de 10 vezes na eficiência de esporulação observado para o mutante duplo $\Delta yabK \Delta csfB$ (fig. 7A). Como a eliminação de *csfB* restaura totalmente a actividade de σ^G no mutante *yabK* mas não a eficiência de esporulação, concluímos que *yabK* deverá ter uma outra função durante a esporulação. De facto, durante o decorrer deste trabalho foi publicado um estudo onde se identifica YabK como um novo regulador negativo da actividade de σ^F (16). A inibição da actividade de σ^F será necessária para a eficiente activação do factor sigma seguinte do pré-esporo, σ^G . Na ausência de YabK observa-se um aumento da actividade do factor σ^F e uma consequente diminuição na actividade do factor σ^G . Este efeito leva a uma diminuição na eficiência de esporulação.

A mutação *mfd* parece não ter qualquer impacto na expressão da fusão *sspE-lacZ* (fig. 7C) e consequentemente na actividade de σ^G . Este resultado mostra que o fenótipo observado no mutante $\Delta yabK$ não é devido a um efeito polar da mutação nos genes a jusante (ver sequência fig. 5A).

3.4. YabK pode ser substituído pelo anti-sigma CsfB durante a esporulação

YabK como sugerido acima, regula negativamente σ^F permitindo que haja a correcta transição para o factor sigma seguinte, σ^G , no pré-esporo. Resultados publicados recentemente (139) demonstraram que CsfB interage directamente com σ^G e que as semelhanças entre os factores σ^F e σ^G permitem que uma única mutação no factor sigma σ^F (E39N, substituição no resíduo 39 de um ácido glutâmico por uma asparagina) permita o seu reconhecimento por CsfB. O próximo passo foi verificar se CsfB conseguiria substituir YabK no pré-esporo, inibindo uma forma de σ^F contendo a mutação E39N (deste ponto em diante referida simplesmente como E39N), possibilitando assim a correcta transição de σ^F para σ^G (fig. 8A). Para este efeito uma mutação de eliminação para o locus *spoIIA* (codificante para σ^F) e uma cópia do operão *spoIIA* selvagem ou contendo o alelo E39N inserida no locus não essencial *amyE*, foram introduzidas no mutante $\Delta yabK$.

Posteriormente, foi introduzida nestas estirpes uma fusão transcricional do promotor do gene *sspE*, dependente de σ^G (104), ou do promotor do gene *lonB*, dependente de σ^F (137), ao gene repórter *lacZ* (ver tabela 8, Anexos).

Em primeiro lugar as estirpes foram crescidas em meio líquido de esporulação, e a eficiência de esporulação foi determinada (ver material e métodos, 2.1.3.). Tal como esperado (ver acima), no mutante *yabK* a eficiência de esporulação foi 0,2% da observada para a estirpe selvagem (fig. 8B). O duplo mutante $\Delta yabK$ E39N produz cerca de 50 vezes mais esporos que o mutante simples *yabK* (11,4%; fig. 8B). Este resultado é importante: indica que em condições em que CsfB interage com σ^F , a eficiência de esporulação do mutante $\Delta yabK$ é parcialmente restaurada.

Decidimos então investigar a expressão dependente da actividade de σ^F e de σ^G nestas estirpes. Para isso a expressão das fusões *lonB-lacZ* e *sspE-lacZ* foi seguida medindo a actividade da enzima β -galactosidase durante o crescimento e a esporulação em DSM. Na estirpe selvagem AH9559 ($\Delta spoIIA::sp \Delta amyE::spoIIABCwt lonB::lonB-lacZ$), e de acordo com resultados anteriores (137), a fusão *lonB-lacZ* é activada duas horas após o início da esporulação, o que coincide com a formação do septo assimétrico na maioria da população celular (fig. 8C). A expressão da fusão atinge um máximo por volta da hora 5 da esporulação. Também de acordo com resultados anteriores (16), a mutação $\Delta yabK$ aumenta a expressão da fusão *lonB-lacZ* (fig. 8C). Como antecipado, a mutação E39N não tem qualquer efeito na expressão da fusão *lonB-lacZ* num fundo selvagem (139) (fig. 8C). Pelo contrário, o duplo mutante $\Delta yabK$ E39N exhibe uma redução na expressão de *lonB-lacZ* quando comparado com o mutante simples $\Delta yabK$ (fig. 8C). Este resultado indica que na ausência de YabK, CsfB é capaz de inibir parcialmente a forma E39N de σ^F . Esta inibição parece ser suficiente para restaurar a correcta activação de σ^G , já que no duplo mutante a expressão da fusão *sspE-lacZ* ocorre a níveis semelhantes aos observados numa estirpe selvagem (fig. 8D).

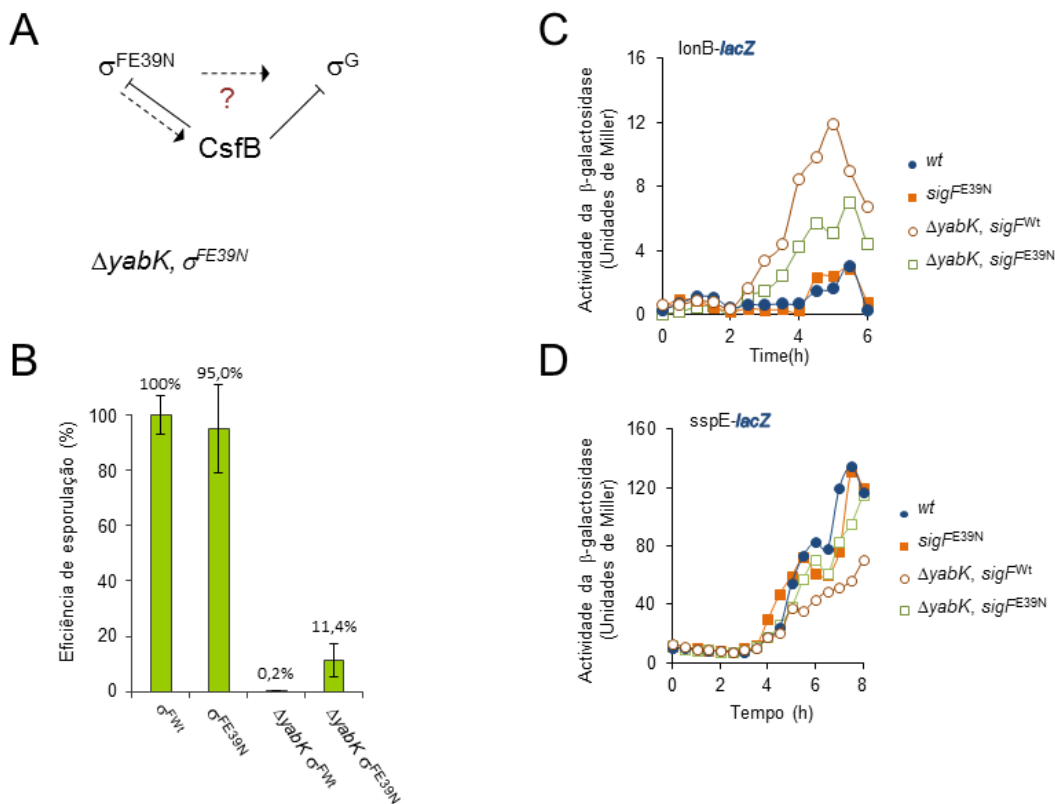


Figura 8 - CsfB consegue substituir YabK durante a esporulação. (A) O esquema ilustra as interações regulatórias entre σ^F , σ^G e CsfB, bem como a possibilidade de CsfB poder substituir YabK. As linhas a tracejado representam regulação transcricional, e as linhas fechadas representam uma interação proteína-proteína. (B) A figura indica a eficiência de esporulação das estirpes indicadas, expressa em percentagem do título de esporos resistentes ao calor observado após 24 horas de crescimento/esporulação em meio DSM (tabela 1, Anexos), em função do valor obtido para a estirpe selvagem. As estirpes estudadas foram as seguintes: AH9559 (wt, $\Delta lonB::lonB-lacZ \Delta spoIIA::sp \Delta amyE::spoIIA$), AH9560 (σ^{FE39N} , $\Delta lonB::lonB-lacZ \Delta spoIIA::sp \Delta amyE::spoIIA^{E39N}$), AH9557 ($\Delta yabK \sigma^{FWt}$, $\Delta yabK \Delta lonB::lonB-lacZ \Delta spoIIA::sp \Delta amyE::spoIIA$) e AH9556 ($\Delta yabK \sigma^{FE39N}$, $\Delta yabK \Delta lonB::lonB-lacZ \Delta spoIIA::sp \Delta amyE::spoIIA^{E39N}$). (C) A activação dependente de σ^F de $P_{lonB-lacZ}$ foi monitorizada durante a esporulação para as estirpes selvagem AH9559 (círculo cheio, $\Delta lonB::lonB-lacZ \Delta spoIIA::sp \Delta amyE::spoIIA$), AH9560 (quadrado cheio, $\Delta lonB::lonB-lacZ \Delta spoIIA::sp \Delta amyE::spoIIA^{E39N}$), AH9557 (círculo vazio, $\Delta yabK \Delta lonB::lonB-lacZ \Delta spoIIA::sp \Delta amyE::spoIIA$) e AH9556 (quadrado vazio, $\Delta yabK \Delta lonB::lonB-lacZ \Delta spoIIA::sp \Delta amyE::spoIIA^{E39N}$). (D) A activação dependente de σ^G de $P_{sspE-lacZ}$ foi monitorizada durante a esporulação para a estirpe selvagem AH6651 (círculo cheio, $\Delta sspE::sspE-lacZ \Delta spoIIA::sp \Delta amyE::spoIIA$), e para as estirpes AH6659 (quadrado cheio, $\Delta sspE::sspE-lacZ \Delta spoIIA::sp \Delta amyE::spoIIA^{E39N}$), AH9535 (círculo vazio, $\Delta yabK \Delta sspE::sspE-lacZ spoIIA::sp \Delta amyE::spoIIA$) e AH9533 (quadrado vazio, $\Delta yabK \Delta sspE::sspE-lacZ spoIIA::sp \Delta amyE::spoIIA^{E39N}$). Nos painéis C e D, o tempo (em horas) refere-se ao início do processo da esporulação (ou T0).

Em conjunto estes resultados demonstram que CsfB tem o potencial de substituir YabK durante a esporulação. O facto de ser observado um efeito parcial parece indicar que as proteínas CsfB e YabK actuam de modo diferente na inibição de σ^F .

3.5. YabK não interage directamente com nenhum dos factores sigma que controlam a esporulação

Trabalhos anteriores mostraram que CsfB interage directamente com σ^G (75, 139). Um dos ensaios utilizados recorreu a um sistema de *Yeast two hybrid* (Y2H) no qual a actividade transcricional do activador GAL4 permite detectar interacções proteína-proteína. Baseia-se na organização estrutural de alguns reguladores transcricionais, entre os quais GAL4, que se compõem por dois domínios, um de ligação ao DNA (BD, *binding domain*) e um outro de activação da transcrição (AD, *activation domain*). Desta forma pela fusão de uma proteína X a um domínio e uma proteína Y a outro domínio, a interacção entre as proteínas X e Y torna possível o encontro dos dois domínios do regulador GAL4, resultando na activação de um gene repórter, *lacZ* (25). Neste estudo usamos a mesma técnica para investigar se YabK interage directamente com σ^F . Em paralelo, os demais factores sigma da esporulação, e o principal sigma vegetativo, σ^A , foram também analisados.

σ^A , σ^F , σ^E , σ^G e σ^K foram fundidos ao C-terminal do domínio de ligação ao DNA de GAL4, e YabK ao C-terminal do domínio de activação de GAL4. O gene *yabK* foi amplificado por PCR usando os iniciadores *yabk693D* e *yabk961R*. O fragmento de 268 pb foi digerido com *NcoI* e *XhoI* e inserido em pACT2 (90) digerido com as mesmas enzimas, criando o plasmídeo pJB9. Os genes que codificam para os factores sigma foram amplificados usando os iniciadores *sigA193D* e *sigA1343R* para o *sigA*, *sigE278D* e *sigE956R* para o *sigE* e *sigK249D*, *sigKR*, *sigKD* e *sigK655R* para *sigK* (SOE PCR). Os fragmentos obtidos de 1150 pb, 678 pb, e 726 pb, respectivamente para *sigA*, *sigE* e *sigK*, foram digeridos com *NcoI* e *EcoRI* e inseridos no vector pAS2-1 (55), dando origem a pJB18, pJB10 e pJB11, respectivamente. As restantes construções utilizadas, não descritas acima já existiam na colecção do laboratório. Estes plasmídeos foram usados para transformar *S. cerevisiae* nas diferentes combinações. A capacidade de interacção entre os

diferentes pares de proteínas for rastreada monitorizando a expressão do gene *lacZ* que cujo promotor contém uma sequência de activação reconhecida por GAL4 (fig. 9; métodos, 2.3.1.2.). Não foi possível detectar qualquer interacção directa entre YabK e σ^F e nem com qualquer outro dos factores σ testados (fig. 9A e C). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Camp *et al.*, (16). A inibição de σ^F por YabK pode ocorrer de uma forma indirecta, ou poderá então necessitar de um ou mais factores presentes durante a esporulação para interagir com σ^F . Alternativamente, YabK não liga a σ^F , mas sim ao complexo formado entre σ^F e a polimerase do RNA.

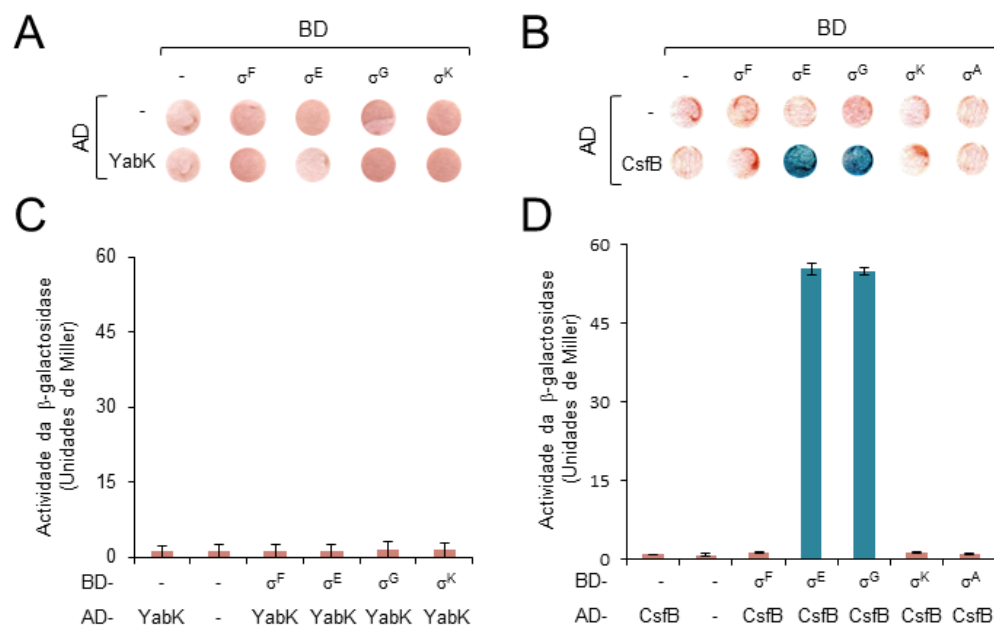


Figura 9 - YabK não regula directamente nenhum factor sigma na esporulação. A interacção dentre YabK (A e C), CsfB (B e D) e os 4 factores sigma que controlam a esporulação foi avaliada em células da levedura *S. cerevisiae*, num sistema de dois híbridos com base no regulador GAL4. O ensaio foi conduzido em meio sólido (A e B) ou em meio líquido (C e D). A interacção é avaliada mediante a capacidade das proteínas testadas de activarem a transcrição do gene repórter *lacZ*, e a actividade da enzima β -galactosidase é avaliada pela hidrólise do substrato cromogénico X-Gal em meio sólido, ou do substrato ONPG em meio líquido. Neste último caso, a actividade da β -galactosidase é expressa em unidades de Miller (ver a secção de Material e Métodos). Os painéis indicam as proteínas produzidas como fusões ao domínio de activação (AD, *activation domain*) ou ao domínio de ligação ao DNA (BD, *binding domain*) do GAL4.

3.6. CsfB interage directamente com σ^E

Um estudo recente revela a importância de CsfB na inibição de baixos níveis de σ^E que possam acumular indevidamente no pré-esporo (23). Decidimos por isso investigar uma possível interacção directa entre σ^E e CsfB recorrendo mais uma vez ao sistema de Y2H (25). Foram utilizados plasmídeos construídos durante este trabalho (ver secção anterior) bem como outros já existentes no laboratório (139). As várias proteínas de fusão foram expressas em diferentes combinações em levedura e avaliada a expressão do gene *lacZ* medindo a actividade da enzima β -galactosidase (fig. 9B e D). De acordo com resultados anteriores (139), é possível detectar a interacção directa de CsfB com σ^G mas não com σ^F (fig. 9B e D). Estas observações foram aqui reproduzidas. Os nossos resultados mostram ainda que CsfB interage directamente com σ^E , mas não com σ^K ou σ^A , todos eles presentes na célula mãe durante o processo de esporulação (fig. 9B e D). Em conclusão, o factor anti-sigma CsfB é capaz de interagir directamente não só com σ^G , mas também com σ^E . Esta interacção leva à inibição destes factores sigma no pré-esporo e também de σ^G em células pré-divisionais (23, 24, 139).

3.7. A expressão de *csfB* é activada na célula-mãe em fases tardias do desenvolvimento

Como já descrito anteriormente *csfB* é transcrito no pré-esporo sob o comando de σ^F (29). De modo a re-investigar os padrões espacial e temporal de expressão de *csfB*, foi utilizada uma estirpe contendo uma fusão traducional de *csfB* ao gene *gfp* (*green fluorescent protein*) inserida no locus não essencial *amyE* (AH6507; ver tabela 9, Anexos). A expressão da fusão *csfB-gfp* foi monitorizada durante o crescimento e a esporulação da estirpe AH6507 em DSM (fig. 10B). Estudos anteriores mostraram que esta fusão é funcional, complementando o fenótipo observado num mutante $\Delta csfB$ (139). Tal como esperado, verificou-se a produção de um sinal de fluorescência no pré-esporo 2 horas após o início da esporulação (T2), coincidente com o fim da formação do septo assimétrico, e a consequente activação de σ^F (fig. 10B). A fluorescência mantém-se confinada ao pré-esporo até a finalização do processo de envolvimento do pré-esporo pela célula mãe (T4),

momento a partir do qual diminui de intensidade neste compartimento (T6) (fig. 10B). No entanto, ao mesmo tempo que a intensidade de GFP diminui no pré-esporo, é possível detectar a acumulação de GFP na célula mãe em células que já finalizaram o processo de envolvimento (fig. 10B). Estes resultados mostram que *csfB* é expresso não só no pré-esporo cedo durante a esporulação, mas também em etapas mais tardias na célula mãe. De facto uma análise da sequência a montante da região codificante de *csfB* (142) mostra não só uma sequência consensual para um promotor dependente de σ^F , mas também uma sequência consensual para um promotor dependente de σ^K (fig. 10A).

De modo a caracterizar esta região promotora foram realizadas mutações pontuais na região -10 de ambos os promotores putativos de modo a eliminar esta sequência. Para tal foram construídas em paralelo fusões transcricionais de *csfB* ao gene repórter *lacZ* e fusões traducionais do gene *csfB* à *gfp*. O plasmídeo pMS261 contendo uma fusão traducional de *csfB* à *gfp*, foi utilizado como molde para inserir as mutações pontuais nas regiões -10 do promotor σ^F e do promotor σ^K . Foi empregue o método de *Quickchange* (Stratagene) utilizando os seguintes pares de oligonucleotídeos iniciadores: P_{sigF}csfBD e R, e P_{sigK}csfBD e R, respectivamente. Os plasmídeos resultantes, pMS419 (mutações no promotor σ^F) e pMS426 (mutações no promotor σ^K) foram utilizados para transformar o mutante $\Delta csfB::km$, de modo a transferir as fusões traducionais para o locus não essencial *amyE* (ver tabela 7, Anexos). Para determinar o padrão espacial determinado pelas regiões promotores em estudo, a acumulação de CsfB-GFP foi seguida durante o crescimento e esporulação em DSM (fig. 10B). Na estirpe contendo a região -10 do promotor σ^F alterada ($\Delta amyE::P_{sigK}csfB-gfp$) não se verifica acumulação de GFP no pré-esporo, ao longo da esporulação. No entanto, 6 horas após o início da esporulação é possível detectar CsfB-GFP na célula mãe em células que completaram o processo de envolvimento (tal como monitorizado pelo padrão de marcação pelo FM4-64; ver acima). Na estirpe contendo a região -10 do promotor σ^K alterada ($\Delta amyE::P_{sigF}csfB-gfp$), CsfB-GFP acumula apenas no pré-esporo, e logo pós a divisão assimétrica. Estes resultados mostram que estas regiões promotoras são as responsáveis pela expressão de *csfB* no pré-esporo e mais tarde na célula mãe. Estes resultados excluem também um cenário no qual o aparecimento da proteína

CsfB na célula mãe poderia decorrer de secreção da proteína do pré-esporo para a célula mãe.

Para a construção da fusão transcricional de *csfB* ao gene repórter *lacZ* a região entre as posições -150 a +62 (tendo como referência a adenina do codão de iniciação) foi primeiro amplificada utilizando os iniciadores *csfB12D* e *csfB578R*. O fragmento de 266 pb foi digerido com *BamHI* e inserido em pSN32 (101) digerido com *SmaI* e *BamHI*, dando origem ao plasmídeo pMS384. O plasmídeo pMS384 foi usado como molde para inserir as mutações pontuais nas regiões -10 do promotor σ^F e do promotor σ^K , pelo método de *Quickchange* (Stratagene), com recurso aos seguintes pares de iniciadores: P*sigF**csfB*BD e R, e P*sigK**csfB*BD e R, respectivamente. Os plasmídeos resultantes, pJB6 (mutações no promotor σ^F) e pJB8 (mutações no promotor σ^K) foram utilizados para transformar *B. subtilis*, de modo a transferir as diferentes fusões transcricionais ao gene *lacZ* para o locus *amyE*. A expressão das diferentes fusões ao gene repórter *lacZ* foi seguida durante o crescimento e a esporulação em DSM, medindo a actividade da enzima β -galactosidase (fig. 10C).

Verificámos que na estirpe contendo o promotor selvagem, a expressão de *lacZ* é activada uma hora após o início da esporulação, e atinge um máximo por volta da hora 6 da esporulação (fig. 10C). Na estirpe contendo a região -10 do promotor σ^F alterada ($\Delta amyE::P_{sigK-csfB-lacZ}$) não se verifica expressão da fusão no início da esporulação, sendo apenas activada 4 horas após o início da esporulação (fig. 10C). Esta actividade é abolida na presença de uma mutação no gene que codifica para o factor σ^K (fig. 10C). Na estirpe contendo a região -10 do promotor σ^K alterada ($\Delta amyE::P_{sigF-csfB-lacZ}$) o padrão de expressão da fusão é muito semelhante ao observado para o promotor selvagem, excepto que o segundo pico de actividade é bastante reduzido (fig. 10C). Este segundo pico sofre uma maior redução quando o gene *sigG* é eliminado (fig 10C).

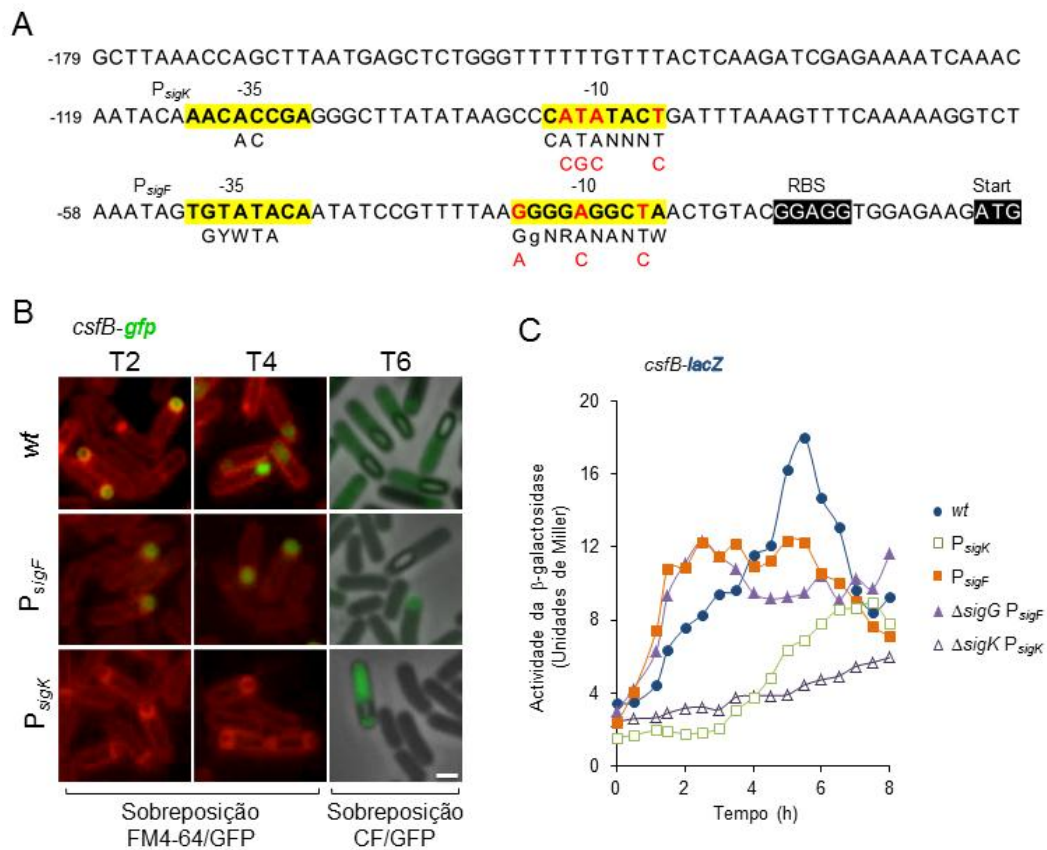


Figura 10 – CsfB é expresso tarde durante a esporulação sob controlo de σ^K . (A) O painel representa a sequência do DNA da região regulatória do gene *csfB* com os elementos -10 e -35 dos promotores dependentes de σ^F (P_{sigF}) e de σ^K (P_{sigK}) indicados. São também representados o codão de iniciação (*Start*) e o local de ligação do ribossoma (RBS, *ribosome binding site*) ambos realçados com uma caixa a negro. As sequências consensuais para reconhecimento por σ^F e por σ^K são indicadas abaixo da sequência. As mutações pontuais efectuadas na região -10 dos promotores indicados estão representadas a vermelho abaixo da sequência de consenso. (B) O painel mostra o perfil de expressão das fusões P_{csfB} -*csfB-gfp* durante a esporulação em DSM das estirpes AH6507 (*amyE::P_{csfB}-csfB-gfp*), AH6779 (*amyE::P_{sigF}-csfB-csfB-gfp*) e AH6728 (*amyE::P_{sigK}-csfB-csfB-gfp*). Foram colhidas amostras das culturas e estas marcadas com o corante de membrana FM4-64 antes de visualização por microscopia de contraste de fase (CF) e de fluorescência utilizando filtros padrão para a GFP (*green fluorescent protein*) e para o FM4-64. A barra de escala equivale a 1 μ m. (C) A activação dependente de σ^F e de σ^K de P_{csfB} -*lacZ* foi monitorizada durante a esporulação medindo a actividade da β -galactosidase, para as estirpes selvagem AH9538 (círculo cheio, $\Delta amyE::P_{csfB}$ -*lacZ*), AH9577 (quadrado vazio, $\Delta amyE::P_{sigK}$ -*csfB-lacZ*), AH9551 (quadrado cheio, $\Delta amyE::P_{sigF}$ -*csfB-lacZ*), AH9593 (triângulo cheio, $\Delta spoIIIIG \Delta amyE::P_{sigF}$ -*csfB-lacZ*) e AH9591 (triângulo vazio, $\Delta sigK::erm \Delta amyE::P_{\Delta sigK}$ -*csfB-lacZ*). Nos painéis B e C, o tempo é indicado em horas após o início da esporulação (ou T0).

Em conjunto estes resultados indicam que o gene *csfB* se encontra sob o controlo de dois promotores. Um destes promotores é activado cedo no pré-esporo e é dependente de σ^F e mais tarde (após a conclusão do processo de envolvimento), por σ^G . Um segundo promotor é activado na célula mãe numa fase tardia do desenvolvimento e é dependente de σ^K . Este resultado leva-nos a propor que o anti-sigma CsfB possa ter também um papel na modulação da expressão genética na célula mãe.

3.8. CsfB modula a actividade de σ^E de uma forma directa em *B. subtilis*

A demonstração que CsfB e σ^E interagem e que numa situação específica, no pré-esporo, a actividade de σ^E pode ser regulada por CsfB (23), levou-nos a testar se CsfB poderia regular negativamente e directamente, a actividade de σ^E *in vivo*. Para tal, construímos dois operões artificiais, contendo o gene *sigE* ou *sigE* e *csfB*, sob o comando do promotor P_{spac} , indutível pelo IPTG. A estratégia delineada passaria pela indução da produção de σ^E ou de σ^E e de CsfB, simultaneamente, em células vegetativas de *B. subtilis*, na ausência de quaisquer outras proteínas específicas da esporulação. Primeiro, o gene *sigE* foi amplificado por PCR com os oligonucleotídeos iniciadores sigE187D e sigE943R, e o produto de PCR de 756 pb, digerido com *Sma*I e *Bgl*II, foi inserido entre os mesmos locais do vector pDH88 (a jusante do promotor P_{spac}) (161), originando o plasmídeo pJB12. De seguida, o gene *csfB* foi amplificado por PCR com os iniciadores csfB476D e csfB780R, e inserido entre os locais *Bgl*II e *Sph*I do plasmídeo pJB12. O plasmídeo resultante designou-se por pJB13. Estes plasmídeos foram utilizados para transformar AH9608 (estirpe de *B. subtilis*), que transporta uma fusão transcricional $P_{spoIIP-lacZ}$ integrado no locus *spoIIP* ($\Delta spoIIP::spoIIP-lacZ$). Este promotor é reconhecido especificamente por *sigE* (47). As estirpes AH9616 e AH9617, respectivamente, resultaram da transformação de AH9608 com pJB12 ou pJB13 (Fig. 11A). Uma vez que *sigE* ou o operão *sigE-csfB* é controlado pelo promotor P_{spac} , a sua expressão requer a adição de IPTG ao meio de cultura. Caso σ^E seja activo, a expressão do gene repórter *lacZ* seria detectada em caixas de meio LB suplementadas com IPTG (1mM) e com o substrato cromogénico X-gal (80 μ g/ml).

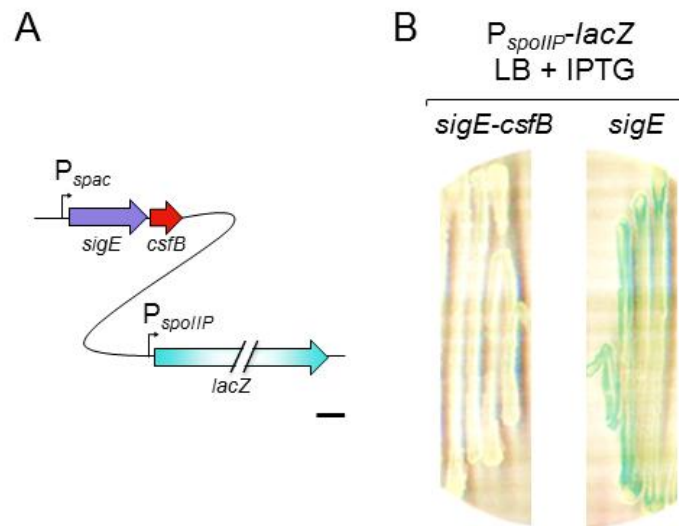


Figura 11 - CsfB é suficiente para inibir a actividade transcripcional dependente de σ^E . (A) O painel ilustra a estrutura do operão artificial *sigE-csfB* sob o comando do promotor indutível pelo IPTG, P_{spac} . Esta construção foi inserida por recombinação de tipo Campbell no genoma, o que deixa uma segunda cópia (não representada) do gene *sigE* sob controlo do promotor nativo próprio. A fusão transcripcional entre o promotor do gene *spoIIP* dependente de σ^E , e o gene repórter *lacZ* está representada. Esta construção foi também introduzida por recombinação de Campbell, existindo uma segunda cópia de *spoIIP* sob o controlo do promotor nativo (não representada na figura). (B) As estirpes AH9616 (*sigE*, *sigE* ΩP_{spac} -*sigE* *spoIIP* Ω *spoIIP-lacZ*) e AH9617 (*sigE-csfB*, *sigE* ΩP_{spac} -*sigE-csfB* *spoIIP* Ω *spoIIP-lacZ*) foram crescidas durante 24 horas em LB agar suplementado com o indutor IPTG, na presença dos antibióticos selectivos e do indicador X-Gal.

Na caixa com a estirpe AH9616 ($\Delta spoIIP::spoIIP-lacZ$ P_{spac} -*sigE*), verificou-se o desenvolvimento de cor azul (fig. 11B), resultando da hidrólise do indicador X-Gal, e indicando a transcrição da fusão P_{spoIIP} -*lacZ*. Já para a estirpe AH9617 ($\Delta spoIIP::spoIIP-lacZ$ P_{spac} -*sigE-csfB*), não se observou o desenvolvimento de cor azul (fig. 11B). A única diferença entre as duas estirpes refere-se à presença ou à ausência de CsfB. Em apoio e extensão dos resultados da análise por Y2H descritos acima (fig. 9B e D), que revelaram uma interacção directa entre CsfB e σ^E , estas novas observações sugerem que CsfB é capaz de inibir σ^E de uma forma directa em *B. subtilis*.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

A esporulação em *B. subtilis* é controlada por uma cascata de factores sigma que são mantidos inactivos, por diversos mecanismos, até ao estágio de desenvolvimento em que é necessária a sua activação. A fase precoce de expressão génica durante o desenvolvimento ocorre desde a formação do pré-esporo, logo após a divisão assimétrica do esporângio, até à conclusão do processo de envolvimento do pré-esporo pela célula mãe. Esta fase é controlada pelo factor σ^F no pré-esporo e pelo factor σ^E na célula mãe. A fase tardia da expressão génica decorre a partir do final do processo de envolvimento até à conclusão da diferenciação do esporo. Esta fase é controlada pelo factor σ^G no pré-esporo e pelo factor σ^K na célula mãe. Este trabalho focou-se no estudo da função de duas proteínas, CsfB e YabK, necessárias para a transição entre as fases precoce e tardia da expressão génica durante o desenvolvimento. CsfB (64 aminoácidos, ou 7.3 kDa) é um novo tipo de factor anti-sigma contendo Zn^{2+} capaz de inibir σ^G na célula vegetativa e no pré-esporo antes da conclusão do envolvimento (24, 75, 139). Inicialmente, CsfB é produzido no pré-esporo sob o comando de σ^F (29). YabK, tal como CsfB, é uma proteína pequena (76 aminoácidos, ou 8.8 kDa) com 4 cisteínas que podem formar um motivo de ligação de Zn^{2+} , (16). Tal como *csfB*, o gene *yabK* é transcrito no pré-esporo sob o comando de σ^F ((16, 143), este trabalho).

Uma fusão transcricional da região promotora de *yabK* ao gene repórter *yfp* mostrou que a expressão de *yabK* se inicia cedo na esporulação e mantêm-se até estágios mais tardios (após a finalização do processo de envolvimento) sempre confinada ao pré-esporo (fig. 6). Este padrão de expressão leva a crer que este gene é transcrito sob o controlo de σ^F mas também sob o controlo de σ^G . Uma análise do efeito de uma mutação de eliminação do gene *yabK* na expressão de genes normalmente expressos no pré-esporo revelou um aumento na expressão de genes sob o controlo de σ^F (*lonB*; fig. 8C), e uma diminuição concomitante na actividade de σ^G (*sspE*, Fig.7B e D). Esta alteração no padrão de expressão dos genes do pré-esporo é acompanhada por uma diminuição de cerca de 100x da eficiência

de esporulação (fig(s). 7A e 8B). A introdução de uma mutação *csfB* na estirpe com a mutação de eliminação do gene *yabK* leva a uma recuperação total da actividade do factor σ^G , mas apenas a uma recuperação parcial da eficiência de esporulação. Estes resultados levam a crer que *yabK* terá uma outra função durante a esporulação. De facto, durante o decorrer deste trabalho foi publicado um estudo onde se identifica YabK como um novo regulador negativo da actividade de σ^F (16). A inibição da actividade de σ^F será necessária para a eficiente activação do factor sigma seguinte do pré-esporo, σ^G . Na ausência de YabK observa-se um aumento da actividade do factor σ^F e uma consequente diminuição na actividade do factor σ^G . Este efeito leva a uma diminuição na eficiência de esporulação (fig. 8C e D). YabK parece assim promover a transição entre as fases precoces (anterior à conclusão do processo de envolvimento) e tardia (com início após a conclusão do processo de envolvimento) da expressão génica no pré-esporo, e esta transição é essencial para a eficiência da esporulação ((16) este trabalho). Como CsfB e YabK funcionam por mecanismos diferentes na esporulação (ver abaixo), a capacidade da mutação *csfB* de suprimir o fenótipo de esporulação observado no mutante *yabK* ilustra de forma veemente a necessidade de manter as actividades de σ^F e de σ^G dentro de limites que possibilitem a correcta transição entre as fase precoce e tardias do desenvolvimento.

Resultados publicados recentemente (139) demonstraram que o elevado grau de semelhança a nível de estrutura primária entre os factores σ^F e σ^G permite que uma única mutação no factor sigma σ^F (E39N) possibilite a interacção directa com CsfB, e a sua consequente inibição. Neste trabalho mostramos que a mesma mutação E39N no factor σ^F é também capaz de restaurar parcialmente o padrão de expressão de genes específicos do pré-esporo e consequentemente a eficiência de esporulação de um mutante *yabK* (fig. 8C e D). Estes resultados demonstram que CsfB tem o potencial de substituir YabK durante a esporulação, mas as proteínas CsfB e YabK, devem actuar de modo diferente na inibição de σ^F . CsfB é capaz de interagir directamente com a forma E39N de σ^F (139). Contudo, não foi possível detectar uma interacção directa entre σ^F e YabK recorrendo ao sistema de dois híbridos (fig. 9A e B). Estas observações estão de acordo com os resultados de Camp e

Losick (2011) (16), que também não detectaram uma interacção directa entre σ^F e YabK (16). Embora as duas proteínas aparentem possuir características estruturais comuns, deverão ter modos de acção diferentes. CsfB deverá funcionar como um factor anti-sigma clássico capaz de interagir com o factor sigma e prevenir a sua associação com o núcleo catalítico da polimerase de RNA. No caso de YabK, a interacção com o factor sigma poderá ser dependente de um ou mais factores presentes durante a esporulação. Uma possibilidade é que YabK interaja com a holoenzima contendo σ^F , inactivando o complexo. Existem factores de transcrição contendo Zn^{2+} capazes de ligar directamente à RNAP modulando o complexo holoenzima-promotor. Um exemplo é DksA que modula a expressão de promotores dependentes do factor σ^{70} em *E. coli* (11, 89, 111, 127). Alternativamente, YabK não liga a σ^F , nem à holoenzima, inibindo a actividade do factor sigma de uma forma indirecta, por exemplo influenciando de alguma maneira a fisiologia do pré-esporo. Em trabalho futuro, o mecanismo de acção de YabK será investigado. Uma das linhas de trabalho envolve a purificação da proteína bem como da polimerase do RNA contendo σ^F , e serão conduzidos estudos de transcrição *in vitro*, para avaliar a capacidade de YabK de ligar e de inibir a holoenzima. YabK pode ainda ligar directamente à região promotora dos genes por si regulados (via σ^F). Uma das abordagens para testar essa ideia envolve estudos de ligação *in vitro* a promotores dependentes de σ^F . Os estudos *in vitro* poderão também elucidar esta questão. Pode acontecer que YabK adicionado a um promotor antes da polimerase, mas não depois, iniba a transcrição a partir desse promotor. Se tal acontecer, a sequência reconhecida por YabK no DNA será definida.

Resultados recentes mostram que CsfB é importante na inibição de baixos níveis de σ^E que possam acumular indevidamente no pré-esporo (23). Neste trabalho, demonstrámos uma interacção directa entre CsfB e σ^E utilizando um sistema de dois híbridos com base no regulador GAL4 da levedura. Deste modo, CsfB interage directamente com os dois factores sigma da esporulação cuja actividade é por si controlada. A inferência é que a interacção é inibitória. No caso de σ^G , esta conclusão é apoiada por resultados de mutagénesis. O resíduo N45 em σ^G é necessário para a interacção, e a substituição deste resíduo por um

ácido glutâmico resulta numa proteína que é funcional em termos de actividade transcricional, mas à qual CsfB não liga, e que é insensível à acção do factor anti-sigma *in vivo* (139). Este tipo de análise mutacional não existe ainda no caso de σ^E , e no contexto deste último, a interacção com CsfB deve envolver aminoácidos diferentes daqueles envolvidos na ligação de CsfB a σ^G . Isto porque em σ^E , e na posição equivalente ao resíduo N45 de σ^G , encontramos um ácido glutâmico (E64). Além disso, resultados não publicados do laboratório mostram ainda que enquanto os primeiros 77 aminoácidos de σ^G são suficientes para a interacção com CsfB, o mesmo não ocorre com σ^E (Serrano *et al*, não publicado). Em trabalho futuro, pretendemos conduzir uma análise de mutagénese aleatória do gene codificante para σ^E , fundido ao gene para GAL4, e rastrear para perda de interacção em células da levedura. Mutações *missense* que resultem em perda de interacção com CsfB na levedura, serão depois introduzidas em *B. subtilis*, para avaliar do seu impacto na esporulação. Em paralelo serão conduzidos estudos de ligação *in vitro*, entre σ^E e formas mutantes da proteína, e CsfB.

Um dos resultados mais importantes deste trabalho diz respeito ao papel de CsfB na inibição da actividade de σ^E na célula mãe. Os nossos resultados mostram que *csfB*, ao contrário de *yabK*, é expresso, após a conclusão do envolvimento, na célula-mãe sob o controlo de σ^K . Mostramos que o gene *csfB* é transcrito a partir de dois promotores, um dependente de σ^F , e outro, mais a montante, dependente de σ^K . A inactivação deste promotor, realizada mediante mutações na região -10 que a afastam da sequência consensual para promotores utilizados por σ^K , eliminam a acumulação de CsfB na célula mãe. Juntamente com a informação de que CsfB liga directamente a σ^E , propomos um modelo no qual a produção de CsfB na célula mãe sob o comando de σ^K , ajuda a reduzir a expressão génica precoce nesta célula (fig. 12). Presumimos que este efeito ajude a reduzir ruído transcricional, i.e., a persistência da transcrição de pelo menos certos genes dependentes de σ^E quando as células iniciam a fase tardia (pós-conclusão do processo de envolvimento) do programa genético. Deste modo, CsfB promove a transição precoce-tardia também na célula mãe. Tanto quanto sabemos, é a primeira vez que se identifica uma

proteína regulatória que actua nos dois tipos celulares, pré-esporo e célula mãe, em estágios diferentes do desenvolvimento.

Sumarizando, podemos então propor um modelo em que CsfB não só é importante para manter σ^G inactivo no pré-esporo até à finalização do envolvimento, mas também tem um papel na regulação de σ^E na célula-mãe em fases tardias da esporulação. Presumimos que este papel duplo de CsfB seja importante para a fidelidade do processo morfogénico (fig. 12). Por exemplo, BofA é uma proteína necessária para o correcto acoplamento entre a activação de σ^K e a expressão génica no pré-esporo. Na sua ausência, σ^K é activado cerca de 30 minutos antes levando a uma pequena alteração na eficiência de esporulação, mas os esporos formados não têm capacidade de germinarem eficientemente (123). Se um fenómeno semelhante ocorrer para o caso de CsfB, então espera-se que o esporo formado em diferentes mutantes *csfB* seja deficiente em alguma propriedade funcional. Em trabalho futuro, que já iniciámos, pretendemos caracterizar funcionalmente o fenótipo associado aos mutantes que expressam *csfB* apenas no pré-esporo e só na célula mãe, em paralelo com o mutante de eliminação *csfB*.

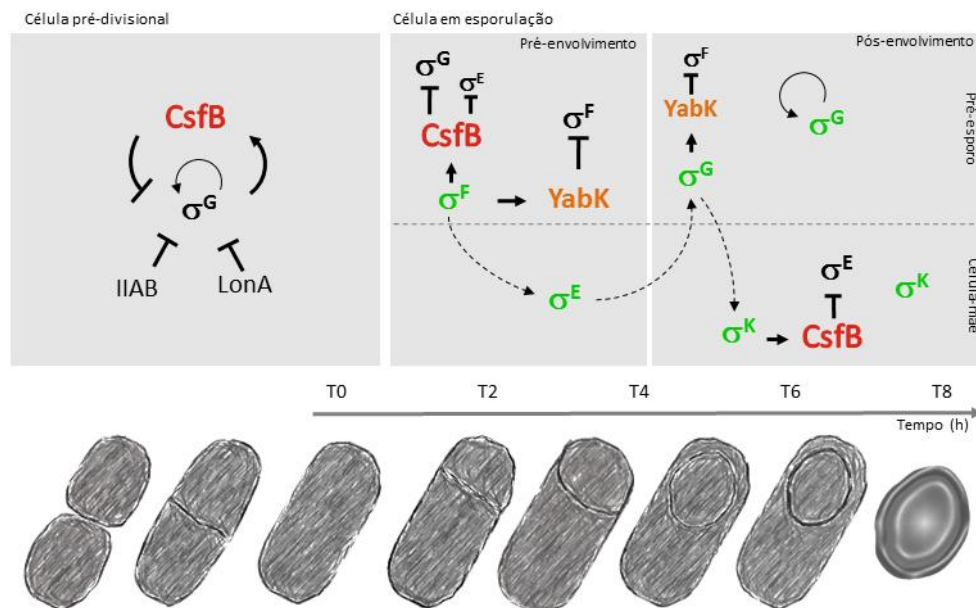


Figura 12 – Modelo esquemático das vias regulatórias que envolvem CsfB e YabK. CsfB está presente na célula pré-divisiva e em células que não entraram em esporulação, e juntamente com SpoIIAB e LonA mantém o factor σ^G inactivo. Quando a célula entra em esporulação σ^F é activado no pré-esporo e transcreve

csfB. Nesta fase, CsfB ajuda à inibição de σ^G até à conclusão do processo de envolvimento. *yabK* é também transcrito por σ^F , e após o envolvimento, por σ^G . YabK limita a actividade de σ^F antes e após a conclusão do envolvimento, promovendo a transição para a fase tardia, dependente de σ^G na linha de expressão genética do pré-esporo. A activação de σ^G coincide com a conclusão do processo de envolvimento. σ^G leva à activação de σ^K na célula mãe. σ^K dirige a produção de CsfB, que interage com σ^E . Esta interacção resultará na inactivação de σ^E evitando a sobreposição entre os regulões σ^E e σ^K . A sequência abaixo do esquema representa as diferentes fases do desenvolvimento do esporo ao longo do tempo (T, em baixo), com correspondência às vias regulatórias que estão representadas na parte de cima do esquema. As linhas contínuas com seta representam regulação transcricional (positiva); as linhas tracejadas com seta, representam regulação indirecta e as linhas contínuas com travessão indicam interacções inibitórias.

Pensa-se que o número de moléculas de factores sigma estará em excesso em relação às moléculas de polimerase de RNA (105). Como a maior parte da polimerase deverá estar ocupada na síntese de RNA a competição de diferentes factores sigma pelo núcleo livre da polimerase deverá ser “feroz”. Neste caso, proteínas como YabK e CsfB poderão fazer a diferença promovendo a ligação de determinados factores sigma ao núcleo da polimerase, e ajudando na troca entre os factores sigma precoces e os tardios em fases importantes do desenvolvimento (fig. 12). O resultado será a maior eficiência e fidelidade do processo de desenvolvimento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Akpan, I., M. O. Bankole, and A. M. Adesemowo.** 1999. A rapid plate culture method for screening of amylase producing micro-organisms. *Biotechnology Techniques* **13**:411-413.
2. **Archambault, J., and J. D. Friesen.** 1993. Genetics of eukaryotic RNA polymerases I, II, and III. *Microbiol Rev* **57**:703-24.
3. **Arnaud, M., A. Chastanet, and M. Debarbouille.** 2004. New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* **70**:6887-91.
4. **Ausubel, F. M.** Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates ; Media, Brooklyn, N. Y.
5. **Bagyan, I., J. Hobot, and S. Cutting.** 1996. A compartmentalized regulator of developmental gene expression in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**:4500-7.
6. **Barne, K. A., J. A. Bown, S. J. Busby, and S. D. Minchin.** 1997. Region 2.5 of the *Escherichia coli* RNA polymerase sigma70 subunit is responsible for the recognition of the 'extended-10' motif at promoters. *EMBO J* **16**:4034-40.
7. **Barrios, H., B. Valderrama, and E. Morett.** 1999. Compilation and analysis of sigma(54)-dependent promoter sequences. *Nucleic Acids Res* **27**:4305-13.
8. **Bath, J., L. J. Wu, J. Errington, and J. C. Wang.** 2000. Role of *Bacillus subtilis* SpoIIIE in DNA transport across the mother cell-prespore division septum. *Science* **290**:995-7.
9. **Becker, D. M., and L. Guarente.** 1991. High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods Enzymol* **194**:182-7.
10. **Ben-Yehuda, S., D. Z. Rudner, and R. Losick.** 2003. RacA, a bacterial protein that anchors chromosomes to the cell poles. *Science* **299**:532-6.
11. **Blankschien, M. D., J. H. Lee, E. D. Grace, C. W. Lennon, J. A. Halliday, W. Ross, R. L. Gourse, and C. Herman.** 2009. Super DksAs: substitutions in DksA enhancing its effects on transcription initiation. *EMBO J* **28**:1720-31.

12. **Borukhov, S., and A. Goldfarb.** 1993. Recombinant *Escherichia coli* RNA polymerase: purification of individually overexpressed subunits and in vitro assembly. *Protein Expr Purif* **4**:503-11.
13. **Bylund, J. E., M. A. Haines, P. J. Piggot, and M. L. Higgins.** 1993. Axial filament formation in *Bacillus subtilis*: induction of nucleoids of increasing length after addition of chloramphenicol to exponential-phase cultures approaching stationary phase. *J Bacteriol* **175**:1886-90.
14. **Camp, A. H., and R. Losick.** 2009. A feeding tube model for activation of a cell-specific transcription factor during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **23**:1014-24.
15. **Camp, A. H., and R. Losick.** 2008. A novel pathway of intercellular signalling in *Bacillus subtilis* involves a protein with similarity to a component of type III secretion channels. *Mol Microbiol* **69**:402-17.
16. **Camp, A. H., A. F. Wang, and R. Losick.** 2011. A small protein required for the switch from sigma F to sigma G during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **193**:116-24.
17. **Campbell, E. A., O. Muzzin, M. Chlenov, J. L. Sun, C. A. Olson, O. Weinman, M. L. Trester-Zedlitz, and S. A. Darst.** 2002. Structure of the bacterial RNA polymerase promoter specificity sigma subunit. *Mol Cell* **9**:527-39.
18. **Campo, N., and D. Z. Rudner.** 2007. SpoIVB and CtpB are both forespore signals in the activation of the sporulation transcription factor sigmaK in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **189**:6021-7.
19. **Cangiano, G., A. Mazzone, L. Baccigalupi, R. Istatico, P. Eichenberger, M. De Felice, and E. Ricca.** 2010. Direct and indirect control of late sporulation genes by GerR of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **192**:3406-13.
20. **Carniol, K., S. Ben-Yehuda, N. King, and R. Losick.** 2005. Genetic Dissection of the Sporulation Protein SpoIIE and Its Role in Asymmetric Division in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **187**:3511-3520.

21. **Charette, M. F., G. W. Henderson, and A. Markovitz.** 1981. ATP hydrolysis-dependent protease activity of the *lon* (*capR*) protein of *Escherichia coli* K-12. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:4728-32.
22. **Chary, V. K., M. Meloni, D. W. Hilbert, and P. J. Piggot.** 2005. Control of the Expression and Compartmentalization of σ^G Activity during Sporulation of *Bacillus subtilis* by Regulators of σ^F and σ^E . *Journal of Bacteriology* **187**:6832-6840.
23. **Chary, V. K., P. Xenopoulos, A. Eldar, and P. J. Piggot.** 2010. Loss of compartmentalization of sigma E activity need not prevent formation of spores by *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **192**:5616-24.
24. **Chary, V. K., P. Xenopoulos, and P. J. Piggot.** 2007. Expression of the σ^F -Directed *csfB* Locus Prevents Premature Appearance of σ^G Activity during Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **189**:8754-8757.
25. **Chien, C. T., P. L. Bartel, R. Sternglanz, and S. Fields.** 1991. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **88**:9578-9582.
26. **Coppolecchia, R., H. DeGrazia, and C. P. Moran, Jr.** 1991. Deletion of *spoIIAB* blocks endospore formation in *Bacillus subtilis* at an early stage. *J Bacteriol* **173**:6678-85.
27. **Cutting, S., A. Driks, R. Schmidt, B. Kunkel, and R. Losick.** 1991. Forespore-specific transcription of a gene in the signal transduction pathway that governs Pro-sigma K processing in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **5**:456-66.
28. **Cutting, S. M., and P. B. Vander Horn.** 1990. Genetic Analysis, p. 27-74. *In* C. R. Harwood and S. M. Cutting (ed.), *Molecular Biological Methods for Bacillus*. John Wiley & Sons, Chischester, England, West Sussex.
29. **Decatur, A., and R. Losick.** 1996. Identification of additional genes under the control of the transcription factor sigma F of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**:5039-41.
30. **Dhawale, M. R., J. J. Wilson, G. G. Khachatourians, and W. M. Ingledew.** 1982. Improved method for detection of starch hydrolysis. *Appl Environ Microbiol* **44**:747-50.

31. **Diederich, B., J. F. Wilkinson, T. Magnin, M. Najafi, J. Errington, and M. D. Yudkin.** 1994. Role of interactions between SpoIIAA and SpoIIAB in regulating cell-specific transcription factor sigma F of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **8**:2653-63.
32. **Doan, T., C. Morlot, J. Meisner, M. Serrano, A. O. Henriques, C. P. Moran, Jr., and D. Z. Rudner.** 2009. Novel Secretion Apparatus Maintains Spore Integrity and Developmental Gene Expression in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet* **5**:e1000566.
33. **Dombroski, A. J., W. A. Walter, and C. A. Gross.** 1993. Amino-terminal amino acids modulate sigma-factor DNA-binding activity. *Genes Dev* **7**:2446-55.
34. **Dombroski, A. J., W. A. Walter, M. T. Record, Jr., D. A. Siegele, and C. A. Gross.** 1992. Polypeptides containing highly conserved regions of transcription initiation factor sigma 70 exhibit specificity of binding to promoter DNA. *Cell* **70**:501-12.
35. **Dong, T. C., and S. M. Cutting.** 2003. SpoIVB-mediated cleavage of SpoIVFA could provide the intercellular signal to activate processing of Pro- σ^K in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **49**:1425-1434.
36. **Eichenberger, P., M. Fujita, S. T. Jensen, E. M. Conlon, D. Z. Rudner, S. T. Wang, C. Ferguson, K. Haga, T. Sato, J. S. Liu, and R. Losick.** 2004. The program of gene transcription for a single differentiating cell type during sporulation in *Bacillus subtilis*. *PLoS Biol* **2**:e328.
37. **Errington, J.** 2010. From spores to antibiotics via the cell cycle. *Microbiology* **156**:1-13.
38. **Errington, J.** 2003. Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol* **1**:117-26.
39. **Errington, J., L. Appleby, R. A. Daniel, H. Goodfellow, S. R. Partridge, and M. D. Yudkin.** 1992. Structure and function of the *spoIIIJ* gene of *Bacillus subtilis*: a vegetatively expressed gene that is essential for sigma G activity at an intermediate stage of sporulation. *J Gen Microbiol* **138**:2609-18.
40. **Errington, J., and J. Mandelstam.** 1984. Genetic and phenotypic characterization of a cluster of mutations in the *spoVA* locus of *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* **130**:2115-21.

41. **Evans, L., J. Clarkson, M. D. Yudkin, J. Errington, and A. Feucht.** 2003. Analysis of the Interaction between the Transcription Factor σ^G and the Anti-Sigma Factor SpoIIAB of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **185**:4615-4619.
42. **Fajardo-Cavazos, P., and W. L. Nicholson.** 2000. The TRAP-like SplA protein is a trans-acting negative regulator of spore photoproduct lyase synthesis during *Bacillus subtilis* sporulation. *J Bacteriol* **182**:555-60.
43. **Fawcett, P., A. Melnikov, and P. Youngman.** 1998. The Bacillus SpoIIGA protein is targeted to sites of spore septum formation in a SpoIIE-independent manner. *Mol Microbiol* **28**:931-43.
44. **Feucht, A., L. Abbotts, and J. Errington.** 2002. The cell differentiation protein SpoIIE contains a regulatory site that controls its phosphatase activity in response to asymmetric septation. *Mol Microbiol* **45**:1119-30.
45. **Flick, J. S., and M. Johnston.** 1990. Two systems of glucose repression of the GAL1 promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **10**:4757-4769.
46. **Francesconi, S. C., T. J. MacAlister, B. Setlow, and P. Setlow.** 1988. Immunoelectron microscopic localization of small, acid-soluble spore proteins in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **170**:5963-7.
47. **Frandsen, N., and P. Stragier.** 1995. Identification and characterization of the *Bacillus subtilis spoIIP* locus. *J Bacteriol* **177**:716-22.
48. **Fujita, M., and R. Losick.** 2003. The master regulator for entry into sporulation in *Bacillus subtilis* becomes a cell-specific transcription factor after asymmetric division. *Genes Dev* **17**:1166-74.
49. **Fukushima, T., H. Yamamoto, A. Atrih, S. J. Foster, and J. Sekiguchi.** 2002. A polysaccharide deacetylase gene (*pdaA*) is required for germination and for production of muramic delta-lactam residues in the spore cortex of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**:6007-15.
50. **Gao, H., and A. I. Aronson.** 2004. The delta subunit of RNA polymerase functions in sporulation. *Curr Microbiol* **48**:401-4.

51. **Gholamhoseinian, A., and P. J. Piggot.** 1989. Timing of *spoII* gene expression relative to septum formation during sporulation of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **171**:5747-9.
52. **Gomez, M., and S. M. Cutting.** 1996. Expression of the *Bacillus subtilis spoIVB* gene is under dual sigma F/sigma G control. *Microbiology* **142 (Pt 12)**:3453-7.
53. **Green, D. H., and S. M. Cutting.** 2000. Membrane Topology of the *Bacillus subtilis* Pro- σ^K Processing Complex. *Journal of Bacteriology* **182**:278-285.
54. **Halberg, R., and L. Kroos.** 1994. Sporulation regulatory protein SpoIID from *Bacillus subtilis* activates and represses transcription by both mother-cell-specific forms of RNA polymerase. *J Mol Biol* **243**:425-36.
55. **Harper, J. W., G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, and S. J. Elledge.** 1993. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**:805-16.
56. **Harwood, C. R., and I. Moszer.** 2002. From Gene Regulation to Gene Function: Regulatory Networks in *Bacillus subtilis*. *Comparative and Functional Genomics* **3**:37-41.
57. **Haugen, S. P., M. B. Berkmen, W. Ross, T. Gaal, C. Ward, and R. L. Gourse.** 2006. rRNA promoter regulation by nonoptimal binding of sigma region 1.2: an additional recognition element for RNA polymerase. *Cell* **125**:1069-82.
58. **Haugen, S. P., W. Ross, M. Manrique, and R. L. Gourse.** 2008. Fine structure of the promoter-sigma region 1.2 interaction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:3292-7.
59. **Helmann, J. D., and C. P. Moran, Jr.** 2001. RNA Polymerase and Sigma Factors, p. 289-312. *In* A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and Its closest Relatives, From Genes to Cells. ASM Press, Washington, DC.
60. **Henriques, A. O., and C. P. Moran, Jr.** 2000. Structure and assembly of the bacterial endospore coat. *Methods* **20**:95-110.
61. **Hilbert, D. W., and P. J. Piggot.** 2004. Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:234-62.
62. **Hinton, D. M., R. March-Amegadzie, J. S. Gerber, and M. Sharma.** 1996. Characterization of pre-transcription complexes made at a bacteriophage T4 middle

- promoter: involvement of the T4 MotA activator and the T4 AsiA protein, a sigma 70 binding protein, in the formation of the open complex. *J Mol Biol* **256**:235-48.
63. **Hofmeister, A. E. M., A. Londono-Vallejo, E. Harry, P. Stragier, and R. Losick.** 1995. Extracellular signal protein triggering the proteolytic activation of a developmental transcription factor in *B. subtilis*. *Cell* **83**:219-226.
64. **Hook-Barnard, I. G., and D. M. Hinton.** 2009. The promoter spacer influences transcription initiation via sigma 70 region 1.1 of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:737-42.
65. **Horton, R. M., H. D. Hunt, S. N. Ho, J. K. Pullen, and L. R. Pease.** 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**:61-8.
66. **Hughes, K. T., and K. Mathee.** 1998. The anti-sigma factors. *Annu Rev Microbiol* **52**:231-86.
67. **Igoshin, O. A., C. W. Price, and M. A. Savageau.** 2006. Signalling network with a bistable hysteretic switch controls developmental activation of the sigma transcription factor in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **61**:165-84.
68. **Illing, N., and J. Errington.** 1991. The *spoIIIA* operon of *Bacillus subtilis* defines a new temporal class of mother-cell-specific sporulation genes under the control of the σ^E form of RNA polymerase. *Molecular Microbiology* **5**:1927-1940.
69. **Jonas, R. M., E. A. Weaver, T. J. Kenney, C. P. Moran, Jr., and W. G. Haldenwang.** 1988. The *Bacillus subtilis spoIIG* operon encodes both sigma E and a gene necessary for sigma E activation. *J Bacteriol* **170**:507-11.
70. **Jones, S. K., Jr., and R. J. Bennett.** 2011. Fungal mating pheromones: choreographing the dating game. *Fungal Genet Biol* **48**:668-76.
71. **Ju, J., and W. G. Haldenwang.** 1999. The "Pro" Sequence of the Sporulation-Specific σ Transcription Factor σ^E Directs It to the Mother Cell Side of the Sporulation Septum. *Journal of Bacteriology* **181**:6171-6175.
72. **Ju, J., T. Luo, and W. G. Haldenwang.** 1997. *Bacillus subtilis* Pro-sigma E fusion protein localizes to the forespore septum and fails to be processed when synthesized in the forespore. *J Bacteriol* **179**:4888-93.

73. **Juan Wu, L., and J. Errington.** 2000. Identification and characterization of a new prespore-specific regulatory gene, *rsfA*, of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **182**:418-24.
74. **Karmazyn-Campelli, C., C. Bonamy, B. Savelli, and P. Stragier.** 1989. Tandem genes encoding sigma-factors for consecutive steps of development in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **3**:150-7.
75. **Karmazyn-Campelli, C., L. Rhayat, R. Carballido-Lopez, S. Duperrier, N. Frandsen, and P. Stragier.** 2008. How the early sporulation sigma factor sigma F delays the switch to late development in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **67**:1169-80.
76. **Karow, M. L., P. Glaser, and P. J. Piggot.** 1995. Identification of a gene, *spoIIR*, that links the activation of sigma E to the transcriptional activity of sigma F during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:2012-6.
77. **Karow, M. L., and P. J. Piggot.** 1995. Construction of *gusA* transcriptional fusion vectors for *Bacillus subtilis* and their utilization for studies of spore formation. *Gene* **163**:69-74.
78. **Kellner, E. M., A. Decatur, and C. P. Moran, Jr.** 1996. Two-stage regulation of an anti-sigma factor determines developmental fate during bacterial endospore formation. *Mol Microbiol* **21**:913-24.
79. **Kenney, T. J., and C. P. Moran, Jr.** 1987. Organization and regulation of an operon that encodes a sporulation-essential sigma factor in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **169**:3329-39.
80. **King, N., O. Dreesen, P. Stragier, K. Pogliano, and R. Losick.** 1999. Septation, dephosphorylation, and the activation of sigma F during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **13**:1156-67.
81. **Kirchman, P. A., H. DeGrazia, E. M. Kellner, and C. P. Moran, Jr.** 1993. Forespore-specific disappearance of the sigma-factor antagonist *spoIIAB*: implications for its role in determination of cell fate in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **8**:663-71.

82. **Kroos, L., B. Kunkel, and R. Losick.** 1989. Switch protein alters specificity of RNA polymerase containing a compartment-specific sigma factor. *Science* **243**:526-9.
83. **Kulbachinskiy, A., and A. Mustaev.** 2006. Region 3.2 of the sigma subunit contributes to the binding of the 3'-initiating nucleotide in the RNA polymerase active center and facilitates promoter clearance during initiation. *J Biol Chem* **281**:18273-6.
84. **Kunkel, B., R. Losick, and P. Stragier.** 1990. The *Bacillus subtilis* gene for the development transcription factor sigma K is generated by excision of a dispensable DNA element containing a sporulation recombinase gene. *Genes Dev* **4**:525-35.
85. **Kunkel, B., K. Sandman, S. Panzer, P. Youngman, and R. Losick.** 1988. The promoter for a sporulation gene in the *spoIVC* locus of *Bacillus subtilis* and its use in studies of temporal and spatial control of gene expression. *J Bacteriol* **170**:3513-22.
86. **Kunst, F., N. Ogasawara, I. Moszer, A. M. Albertini, G. Alloni, V. Azevedo, M. G. Bertero, P. Bessieres, A. Bolotin, S. Borchert, R. Borriss, L. Boursier, A. Brans, M. Braun, S. C. Brignell, S. Bron, S. Brouillet, C. V. Bruschi, B. Caldwell, V. Capuano, N. M. Carter, S. K. Choi, J. J. Codani, I. F. Connerton, N. J. Cummings, R. A. Daniel, F. Denizot, K. M. Devine, A. Dusterhoft, S. D. Ehrlich, P. T. Emmerson, K. D. Entian, J. Errington, C. Fabret, E. Ferrari, D. Foulger, C. Fritz, M. Fujita, Y. Fujita, S. Fuma, A. Galizzi, N. Galleron, S. Y. Ghim, P. Glaser, A. Goffeau, E. J. Golightly, G. Grandi, G. Guiseppi, B. J. Guy, K. Haga, J. Haiech, C. R. Harwood, A. Henaut, H. Hilbert, S. Holsappel, S. Hosono, M. F. Hullo, M. Itaya, L. Jones, B. Joris, D. Karamata, Y. Kasahara, M. Klaerr-Blanchard, C. Klein, Y. Kobayashi, P. Koetter, G. Koningstein, S. Krogh, M. Kumano, K. Kurita, A. Lapidus, S. Lardinois, J. Lauber, V. Lazarevic, S. M. Lee, A. Levine, H. Liu, S. Masuda, C. Mauel, C. Medigue, N. Medina, R. P. Mellado, M. Mizuno, D. Moestl, S. Nakai, M. Noback, D. Noone, M. O'Reilly, K. Ogawa, A. Ogiwara, B. Oudega, S. H. Park, V. Parro, T. M. Pohl, D. Portetelle, S. Porwollik, A. M. Prescott, E. Presecan,**

- P. Pujic, B. Purnelle, et al.** 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* **390**:249-256.
87. **Kutsukake, K., and T. Iino.** 1994. Role of the FliA-FlgM regulatory system on the transcriptional control of the flagellar regulon and flagellar formation in *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **176**:3598-605.
88. **Lemon, K. P., and A. D. Grossman.** 1998. Localization of bacterial DNA polymerase: evidence for a factory model of replication. *Science* **282**:1516-9.
89. **Lennon, C. W., T. Gaal, W. Ross, and R. L. Gourse.** 2009. *Escherichia coli* DksA binds to Free RNA polymerase with higher affinity than to RNA polymerase in an open complex. *J Bacteriol* **191**:5854-8.
90. **Li, L., S. J. Elledge, C. A. Peterson, E. S. Bales, and R. J. Legerski.** 1994. Specific association between the human DNA repair proteins XPA and ERCC1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:5012-6.
91. **Londono-Vallejo, J. A., C. Frehel, and P. Stragier.** 1997. SpoIIQ, a forespore-expressed gene required for engulfment in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **24**:29-39.
92. **Londono-Vallejo, J. A., and P. Stragier.** 1995. Cell-cell signaling pathway activating a developmental transcription factor in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **9**:503-8.
93. **Margolis, P., A. Driks, and R. Losick.** 1991. Establishment of cell type by compartmentalized activation of a transcription factor. *Science* **254**:562-565.
94. **Masuda, E. S., H. Anaguchi, K. Yamada, and Y. Kobayashi.** 1988. Two developmental genes encoding sigma factor homologs are arranged in tandem in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:7637-41.
95. **Meisner, J., X. Wang, M. Serrano, A. O. Henriques, and C. P. Moran.** 2008. A channel connecting the mother cell and forespore during bacterial endospore formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**:15100-15105.
96. **Menez, J., R. H. Buckingham, M. de Zamaroczy, and C. K. Campelli.** 2002. Peptidyl-tRNA hydrolase in *Bacillus subtilis*, encoded by *spoVC*, is essential to

- vegetative growth, whereas the homologous enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* is dispensable. *Mol Microbiol* **45**:123-9.
97. **Miller, J. H.** Experiments in molecular genetics [by] Jeffrey H. Miller. [Cold Spring Harbor.
 98. **Moir, A., E. Lafferty, and D. A. Smith.** 1979. Genetic Analysis of Spore Germination Mutants of *Bacillus subtilis* 168: the Correlation of Phenotype with Map Location. *Journal of General Microbiology* **111**:165-180.
 99. **Moldover, B., P. J. Piggot, and M. D. Yudkin.** 1991. Identification of the promoter and the transcriptional start site of the *spoVA* operon of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *J Gen Microbiol* **137**:527-31.
 100. **Molle, V., M. Fujita, S. T. Jensen, P. Eichenberger, J. E. Gonzalez-Pastor, J. S. Liu, and R. Losick.** 2003. The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **50**:1683-701.
 101. **Mota, L. J., P. Tavares, and I. Sa-Nogueira.** 1999. Mode of action of AraR, the key regulator of L-arabinose metabolism in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **33**:476-89.
 102. **Murakami, K. S., S. Masuda, and S. A. Darst.** 2003. Crystallographic analysis of *Thermus aquaticus* RNA polymerase holoenzyme and a holoenzyme/promoter DNA complex. *Methods Enzymol* **370**:42-53.
 103. **Nicholson, W. L., N. Munakata, G. Horneck, H. J. Melosh, and P. Setlow.** 2000. Resistance of *Bacillus* Endospores to Extreme Terrestrial and Extraterrestrial Environments. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **64**:548-572.
 104. **Nicholson, W. L., D. X. Sun, B. Setlow, and P. Setlow.** 1989. Promoter specificity of sigma G-containing RNA polymerase from sporulating cells of *Bacillus subtilis*: identification of a group of forespore-specific promoters. *J Bacteriol* **171**:2708-18.
 105. **Nyström, T.** 2004. MicroReview: Growth versus maintenance: a trade-off dictated by RNA polymerase availability and sigma factor competition? *Molecular Microbiology* **54**:855-862.
 106. **Paget, M. S., and J. D. Helmann.** 2003. The sigma 70 family of sigma factors. *Genome Biol* **4**:203.

107. **Paidhungat, M., and P. Setlow.** 2000. Role of ger proteins in nutrient and nonnutrient triggering of spore germination in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **182**:2513-9.
108. **Paidhungat, M., and P. Setlow.** 2002. Spore germination and outgrowth, p. 537-548. *In* A. L. Sonenshein, J. A. Hoch, and R. Losick (ed.), *Bacillus subtilis* and Its closest relatives: from genes to cells. ASM Press, Washington, DC.
109. **Pan, Q., and R. Losick.** 2003. Unique degradation signal for ClpCP in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **185**:5275-8.
110. **Partridge, S. R., and J. Errington.** 1993. The importance of morphological events and intercellular interactions in the regulation of prespore-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **8**:945-55.
111. **Paul, B. J., M. M. Barker, W. Ross, D. A. Schneider, C. Webb, J. W. Foster, and R. L. Gourse.** 2004. DksA: a critical component of the transcription initiation machinery that potentiates the regulation of rRNA promoters by ppGpp and the initiating NTP. *Cell* **118**:311-22.
112. **Pedraza-Reyes, M., F. Gutierrez-Corona, and W. L. Nicholson.** 1997. Spore photoproduct lyase operon (*splAB*) regulation during *Bacillus subtilis* sporulation: modulation of *splB-lacZ* fusion expression by P1 promoter mutations and by an in-frame deletion of *splA*. *Curr Microbiol* **34**:133-7.
113. **Peters, H. K., 3rd, H. C. Carlson, and W. G. Haldenwang.** 1992. Mutational analysis of the precursor-specific region of *Bacillus subtilis* sigma E. *J Bacteriol* **174**:4629-37.
114. **Piggot, P. J., J. E. Bylund, and M. L. Higgins.** 1994. Morphogenesis and gene regulation during sporulation, p. 113-117. *In* P. J. Piggot, C. P. Moran, Jr. , and P. Youngman (ed.), *Regulation of bacterial differentiation*. American Society for Microbiology Washington, D.C.
115. **Piggot, P. J., and J. G. Coote.** 1976. Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriol Rev* **40**:908-62.

116. **Piggot, P. J., C. A. Curtis, and H. de Lencastre.** 1984. Use of integrational plasmid vectors to demonstrate the polycistronic nature of a transcriptional unit (*spoIIA*) required for sporulation of *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* **130**:2123-36.
117. **Piggot, P. J., and D. W. Hilbert.** 2004. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol* **7**:579-86.
118. **Pogliano, K., A. E. Hofmeister, and R. Losick.** 1997. Disappearance of the sigma E transcription factor from the forespore and the SpoIIE phosphatase from the mother cell contributes to establishment of cell-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **179**:3331-41.
119. **Popham, D. L., and P. Stragier.** 1992. Binding of the *Bacillus subtilis spoIVCA* product to the recombination sites of the element interrupting the sigma K-encoding gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:5991-5.
120. **Potter, H.** 1988. Electroporation in biology: methods, applications, and instrumentation. *Anal Biochem* **174**:361-73.
121. **Rather, P. N., R. Coppolecchia, H. DeGrazia, and C. P. Moran, Jr.** 1990. Negative regulator of sigma G-controlled gene expression in stationary-phase *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **172**:709-15.
122. **Rhayat, L., S. Duperrier, R. Carballido-López, O. Pellegrini, and P. Stragier.** 2009. Genetic Dissection of an Inhibitor of the Sporulation Sigma Factor σ^G . *Journal of Molecular Biology* **390**:835-844.
123. **Ricca, E., S. Cutting, and R. Losick.** 1992. Characterization of *bofA*, a gene involved in intercompartmental regulation of pro-sigma K processing during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **174**:3177-84.
124. **Riethdorf, S., U. Völker, U. Gerth, A. Winkler, S. Engelmann, and M. Hecker.** 1994. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Bacillus subtilis lon* gene. *Journal of Bacteriology* **176**:6518-6527.
125. **Roberts, J., and J. S. Park.** 2004. Mfd, the bacterial transcription repair coupling factor: translocation, repair and termination. *Curr Opin Microbiol* **7**:120-5.

126. **Rudner, D. Z., and R. Losick.** 2002. A sporulation membrane protein tethers the pro- σ^K processing enzyme to its inhibitor and dictates its subcellular localization. *Genes & Development* **16**:1007-1018.
127. **Rutherford, S. T., C. L. Villers, J. H. Lee, W. Ross, and R. L. Gourse.** 2009. Allosteric control of *Escherichia coli* rRNA promoter complexes by DksA. *Genes Dev* **23**:236-48.
128. **Ryan, K. R., and L. Shapiro.** 2003. Temporal and spatial regulation in prokaryotic cell cycle progression and development. *Annu Rev Biochem* **72**:367-94.
129. **Ryter, A.** 1965. [Morphologic Study of the Sporulation of *Bacillus Subtilis*]. *Ann Inst Pasteur (Paris)* **108**:40-60.
130. **Salas-Pacheco, J. M., N. Urtiz-Estrada, G. Martinez-Cadena, R. E. Yasbin, and M. Pedraza-Reyes.** 2003. YqfS from *Bacillus subtilis* is a spore protein and a new functional member of the type IV apurinic/aprimidinic-endonuclease family. *J Bacteriol* **185**:5380-90.
131. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd ed. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
132. **Sato, T., K. Harada, and Y. Kobayashi.** 1996. Analysis of suppressor mutations of *spoIVCA* mutations: occurrence of DNA rearrangement in the absence of site-specific DNA recombinase SpoIVCA in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **178**:3380-3.
133. **Sato, T., K. Harada, Y. Ohta, and Y. Kobayashi.** 1994. Expression of the *Bacillus subtilis spoIVCA* gene, which encodes a site-specific recombinase, depends on the *spoIIGB* product. *J Bacteriol* **176**:935-7.
134. **Schmidt, R., A. L. Decatur, P. N. Rather, C. P. Moran, Jr., and R. Losick.** 1994. *Bacillus subtilis* lon protease prevents inappropriate transcription of genes under the control of the sporulation transcription factor sigma G. *J Bacteriol* **176**:6528-37.
135. **Schmidt, R., P. Margolis, L. Duncan, R. Coppolecchia, C. P. Moran, Jr., and R. Losick.** 1990. Control of developmental transcription factor sigma F by sporulation regulatory proteins SpoIIAA and SpoIIAB in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:9221-5.

136. **Serrano, M., L. Corte, J. Opdyke, C. P. Moran, Jr., and A. O. Henriques.** 2003. Expression of *spoIIIJ* in the prespore is sufficient for activation of sigma G and for sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **185**:3905-17.
137. **Serrano, M., S. Hovel, C. P. Moran, Jr., A. O. Henriques, and U. Volker.** 2001. Forespore-specific transcription of the *lonB* gene during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **183**:2995-3003.
138. **Serrano, M., A. Neves, C. M. Soares, C. P. Moran, Jr., and A. O. Henriques.** 2004. Role of the anti-sigma factor SpoIIAB in regulation of sigma G during *Bacillus subtilis* sporulation. *J Bacteriol* **186**:4000-13.
139. **Serrano, M., G. Real, J. Santos, J. Carneiro, C. P. Moran, Jr., and A. O. Henriques.** 2011. A negative feedback loop that limits the ectopic activation of a cell type-specific sporulation sigma factor of *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet* **7**:e1002220.
140. **Serrano, M., F. Vieira, C. P. Moran, Jr., and A. O. Henriques.** 2008. Processing of a membrane protein required for cell-to-cell signaling during endospore formation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **190**:7786-96.
141. **Sharma, U. K., and D. Chatterji.** 2006. Both regions 4.1 and 4.2 of *E. coli* sigma 70 are together required for binding to bacteriophage T4 AsiA in vivo. *Gene* **376**:133-43.
142. **Sierro, N., Y. Makita, M. de Hoon, and K. Nakai.** 2008. DBTBS: a database of transcriptional regulation in *Bacillus subtilis* containing upstream intergenic conservation information. *Nucleic Acids Research* **36**:D93-D96.
143. **Steil, L., M. Serrano, A. O. Henriques, and U. Volker.** 2005. Genome-wide analysis of temporally regulated and compartment-specific gene expression in sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **151**:399-420.
144. **Stragier, P., B. Kunkel, L. Kroos, and R. Losick.** 1989. Chromosomal rearrangement generating a composite gene for a developmental transcription factor. *Science* **243**:507-12.

145. **Sun, D. X., R. M. Cabrera-Martinez, and P. Setlow.** 1991. Control of transcription of the *Bacillus subtilis spoIIIG* gene, which codes for the forespore-specific transcription factor sigma G. *J Bacteriol* **173**:2977-84.
146. **Sun, D. X., P. Stragier, and P. Setlow.** 1989. Identification of a new sigma-factor involved in compartmentalized gene expression during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Genes Dev* **3**:141-9.
147. **Sun, Y. L., M. D. Sharp, and K. Pogliano.** 2000. A dispensable role for forespore-specific gene expression in engulfment of the forespore during sporulation of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **182**:2919-27.
148. **Takemaru, K.-i., M. Mizuno, T. Sato, M. Takeuchi, and Y. Kobayashi.** 1995. Complete nucleotide sequence of a skin element excised by DNA rearrangement during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology* **141**:323-327.
149. **Tosato, V., and C. V. Bruschi.** 2004. Knowledge of the *Bacillus subtilis* genome: impacts on fundamental science and biotechnology. *Appl Microbiol Biotechnol* **64**:1-6.
150. **Tovar-Rojo, F., M. Chander, B. Setlow, and P. Setlow.** 2002. The products of the *spoVA* operon are involved in dipicolinic acid uptake into developing spores of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **184**:584-7.
151. **Urtiz-Estrada, N., J. M. Salas-Pacheco, R. E. Yasbin, and M. Pedraza-Reyes.** 2003. Forespore-Specific Expression of *Bacillus subtilis yqfS*, Which Encodes Type IV Apurinic/Apyrimidinic Endonuclease, a Component of the Base Excision Repair Pathway. *Journal of Bacteriology* **185**:340-348.
152. **Vuthoori, S., C. W. Bowers, A. McCracken, A. J. Dombroski, and D. M. Hinton.** 2001. 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.
153. **Wakeley, P., N. T. Hoa, and S. Cutting.** 2000. BofC negatively regulates SpoIVB-mediated signalling in the *Bacillus subtilis* σ^K -checkpoint. *Molecular Microbiology* **36**:1415-1424.

154. **Weaver, J. C., G. I. Harrison, J. G. Bliss, J. R. Mourant, and K. T. Powell.** 1988. Electroporation: high frequency of occurrence of a transient high-permeability state in erythrocytes and intact yeast. *FEBS Lett* **229**:30-4.
155. **Wilson, C., and A. J. Dombroski.** 1997. Region 1 of sigma 70 is required for efficient isomerization and initiation of transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Journal of molecular biology* **267**:60-74.
156. **Wu, J. J., M. G. Howard, and P. J. Piggot.** 1989. Regulation of transcription of the *Bacillus subtilis spoIIA* locus. *J Bacteriol* **171**:692-8.
157. **Wu, J. J., P. J. Piggot, K. M. Tatti, and C. P. Moran, Jr.** 1991. Transcription of the *Bacillus subtilis spoIIA* locus. *Gene* **101**:113-6.
158. **Wu, L. J., and J. Errington.** 1994. *Bacillus subtilis* SpoIIIE protein required for DNA segregation during asymmetric cell division. *Science* **264**:572-5.
159. **Wu, L. J., and J. Errington.** 2003. RacA and the Soj-Spo0J system combine to effect polar chromosome segregation in sporulating *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **49**:1463-75.
160. **Wu, L. J., and J. Errington.** 1998. Use of asymmetric cell division and *spoIIIE* mutants to probe chromosome orientation and organization in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* **27**:777-786.
161. **Yansura, D. G., and D. J. Henner.** 1984. Use of the *Escherichia coli lac* repressor and operator to control gene expression in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:439-43.
162. **Yoshimura, M., K. Asai, Y. Sadaie, and H. Yoshikawa.** 2004. Interaction of *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function (ECF) sigma factors with the N-terminal regions of their potential anti-sigma factors. *Microbiology* **150**:591-599.
163. **Yuan, A. H., B. E. Nickels, and A. Hochschild.** 2009. The bacteriophage T4 AsiA protein contacts the β -flap domain of RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**:6597-6602.
164. **Zhang, B., A. Hofmeister, and L. Kroos.** 1998. The Prosequence of Pro- σ^K Promotes Membrane Association and Inhibits RNA Polymerase Core Binding. *Journal of Bacteriology* **180**:2434-2441.

165. **Zhang, G., E. A. Campbell, L. Minakhin, C. Richter, K. Severinov, and S. A. Darst.** 1999. Crystal Structure of *Thermus aquaticus* Core RNA Polymerase at 3.3 Å Resolution. *Cell* **98**:811-824.
166. **Zheng, L., R. Halberg, S. Roels, H. Ichikawa, L. Kroos, and R. Losick.** 1992. Sporulation regulatory protein GerE from *Bacillus subtilis* binds to and can activate or repress transcription from promoters for mother-cell-specific genes. *J Mol Biol* **226**:1037-50.
167. **Zhou, R., and L. Kroos.** 2004. BofA protein inhibits intramembrane proteolysis of pro- σ^K in an intercompartmental signaling pathway during *Bacillus subtilis* sporulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**:6385-6390.
168. **Zhou, R., and L. Kroos.** 2005. Serine proteases from two cell types target different components of a complex that governs regulated intramembrane proteolysis of pro-sigma K during *Bacillus subtilis* development. *Mol Microbiol* **58**:835-46.

ANEXOS

Tabela 1 - Composição dos meios de cultura utilizados (para 1 l)

Luria-Bertani <i>broth</i> (LB)	10 g triptona; 5 g extracto de levedura; 5 g NaCl; 3,2 g agar (versão sólida, LB agar)
<i>Difco Sporulation Media</i> (DSM)	8 g nutriente broth; 1 g KCl; 0,12 g MgSO ₄ ; 3,2 g agar (versão sólida)
<i>Yeast Peptone Dextrose</i> (YPD)	10 g extracto de levedura, 20 g peptona, 20 g glucose mono-hidratada, 20 g agár (versão sólida, YPD <i>plates</i>)
<i>Synthetic Dextrose</i> (SD)	6,7 g base de nitrogenio de levedura sem aminoácidos, 0,6-0,7 g <i>dropout mix</i> , 20 g glucose mono-hidratada, 20 g agár (versão sólida, (SD <i>plates</i>))

Tabela 2 - Antibióticos utilizados para o crescimento selectivo

Antibiótico	Composição/Preparação	Concentração (utilizada em meios de crescimento selectivo)
Ampicilina	100 mg/ml em água bidestilada	100 µg/ml
Canamicina	10 mg/ml em água bidestilada	10/30 µg/ml (<i>B.subtilis/E. coli</i>)
Cloranfenicol	30 mg/ml em etanol	5/10 µg/ml (<i>B.subtilis/E. coli</i>)
Eritromicina	10 mg/ml em etanol	1 µg/ml
Neomicina	10 mg/ml em água bidestilada	1/3 µg/ml (meio líquido/sólido)
Spectinomicina	100 mg/ml em água bidestilada	100 µg/ml

Tabela 3 - soluções utilizadas na electroforese de DNA em géis de agarose

Soluções	Composição/Preparação
Tampão de deposição laranja	0,2% Laranja G; 0,37% EDTA, 50% Glicerol (v/v)
Tampão TAE 1X	0,04 M Tris-Acetato, 0,001 M EDTA pH8,0
Brometo de Etídeo	10 mg/ml em água, filtrada e mantida a 4°C ao abrigo da luz

Tabela 4 - Outras soluções utilizadas durante este trabalho

Corante de iodo	0,5 % I ₂ ; 1% KI
Lisozima	10 mg/ml em ddH ₂ O; filtrar e guardar a -20 °C
PBS 1X	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,47 mM KH ₂ PO ₄ ; ajustar para pH 7,4; autoclavar e manter à TA
Tampão RNase (100 ml)	10 mM Tris-HCl, pH 7,5; 15 mM NaCl; autoclavar e manter à TA
Tampão SET	20 % Sacarose; 20 mM Tris, pH 8,0; 10 mM EDTA; filtrar e manter à TA
Tampão STET	8 % (m/v) sacarose; 0,5 % (v/v) Triton X-100; 50 mM EDTA; 50 mM Tris-Cl, pH 8,0; filtrar e manter à TA
TE 10X	100 mM Tris-Cl; 10 mM EDTA, pH 8,0; autoclavar e manter à TA
RNase A	10 mg em tampão RNase, ferver 10 min. e arrefecer à TA. Guardar a -20 °C

Tabela 5 - soluções utilizadas para a preparação de células competentes de *B. subtilis*

Sais <u>B</u> ott and <u>W</u> ilson (B&W)	1,24% K ₂ HPO ₄ (w/v); 0,76% KH ₂ PO ₄ (w/v); 0,1% citrato tri-sódico (w/v); 0,6 (NH ₄) ₂ SO ₄ (w/v). Ajustar pH a 6,7 com 1N NaOH
5X Aminoácidos B&W	2,5 mg/ml de trp, arg, lys, gly, met, his, val, thr e asp
<u>G</u> rowth <u>M</u> edium 1 (GM1) (100 ml)	96 ml sais B&W; 1 mM MgSO ₄ ; 1 ml 50% glucose (w/v); 1ml 10% extracto de levedura (w/v); 1 ml de 5X aminoácidos B&W. Conservar a 4 °C
<u>G</u> rowth <u>M</u> edium 2 (GM2) (100 ml)	96,5 ml GM1; 0,25 mM CaCl ₂ ; 25 mM MgCl ₂

Tabela 6 - Soluções utilizadas para ensaios de β -galactosidase

<i>B. subtilis</i>	
Tampão Z	60 mM Na ₂ HPO ₄ , 40 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM KCL, 1 mM MgSO ₄ , pH 7,0. Autoclavar. Antes de usar adicionar Ditioneitol (DTT) 20 mM
Tampão A	60 mM K ₂ HPO ₄ , 33 mM KH ₂ PO ₄ , 7,5 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1,7 mM Citrato de sódio, pH 7,0. Autoclavar
Solução ONPG	4mg/ml em tampão A de 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosidase.
<i>S. cerevisiae</i>	
Tampão Z	60 mM Na ₂ HPO ₄ , 40 mM NaH ₂ PO ₄ , 10 mM KCL, 1 mM MgSO ₄ , pH 7,0. Autoclavar.
Tampão Z + β -mercaptoetanol	100 ml tampão Z; 0,27 ml β -mercaptoetanol
Solução Z/X-Gal	100 ml tampão Z, 0,27 ml β -mercaptoetanol, 1,67 ml solução X-Gal
Solução ONPG	4mg/ml em tampão A de 2-nitrofenil- β -D-galactopiranosidase.
Solução X-Gal	100 mg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosidase em N,N-dimetilformamida. Conserve sem luz -20° C

Tabela 7 - Sequências de oligonucleótidos, iniciadores, para a amplificação de regiões de DNA¹

Nome	Sequência nucleotídica 5' – 3'	Enzima de restrição
csfB12D	CGCCGCCAAGCAAGCTTAAACCCAGC	<i>HindIII</i>
csfB476D	GGCTAGATCTACGGAGGTGGAGAAG	<i>BglII</i>
csfB578R	CGTATAAAGATGGATCCTCTATTCTTCTC	<i>BamHI</i>
csfB780R	ATTATTAGCATGCTACTACGTTCAATCC	<i>SphI</i>
mfd4507R	TCAGATCTTTTAAGCCCTTCAGCATGCCC	<i>BglII</i>

¹ Continua na página seguinte

mfd1219D	GAGG <u>TCGACT</u> CTGTCCTTTTGATCCCCG	<i>SalI</i>
mfd1749R	CTCAATGGCCTCCTTCAGCATGCTCGCGGCAAGACCACTA TCG	
mfd4000D	ATGCTGAAGGAGGCCATTGAGGAGCG	
PsigFcsfBD	CCGTTTTAAAGGGCGGCCAACTGTACGGAGG	
PsigFcsfBR	CCTCCGTACAGTTGGCCGCCCTTTAAAACGG	
PsigKcsfBD	GGGCTTATATAGCCCCGCTACCGATTTAAAGTTTCAAAAA GG	
PsigKcsfBR	CCTTTTTGAAACTTTAAATCGGTAGCGGGGCTATATAAGC CC	
sigA193D	GATCCATGGCTGATAAAACAAACCC	<i>NcoI</i>
sigA1343R	GAACGGAATTCAGACCCCTTCC	<i>EcoRI</i>
sigE187D	GAAGGGAGAGGAAGATGGGCGGGAGTGAAGCCCTGCC	
sigE278D	CTATTCCATGGGCGGGAGTGAAGCCCTGCC	<i>NcoI</i>
sigE943R	AGGAGATCTAACCATAAAAATTTTTTACA	<i>BglII</i>
sigE956R	CCCTGTGAATTCAGGGGTTCTAACC	<i>EcoRI</i>
sigK249D	GTCTCCATGGTATCTTACGTGAAAAACAATGCC	<i>NcoI</i>
sigK655R	TAGAGAATTCGGAGTATGAGATCCGGC	
sigKD	GCGAGGTGTATTGAAAATGAGATCCTCATGCATTTGCGCG C	
sigKR	CTCATTTTCAATACACCTCGC	
yabK236D	AAGGGTCGACTTGTTAAACCGCTTAC	<i>SalI</i>
yabK437D	GGAACGTCGACGAGTTTGACCGTATCCGCATCGGAATCGG	<i>SalI</i>
yabK693D	CCCTTCCATGGCTTTGCATTATTATTGTCG	<i>NcoI</i>
yabK698R	CAAGCTTCCTCCTGATGAAAAAGTCATTTTGG	<i>HindIII</i>
yabK717R	GGATTTCCGGTCAAGCGCCTCTTGATAATAATGCAAAGCCA TACAAGGG	
yabK874D	CAAGAGGCGCTTGACCGAAATCCGC	
yabk961R	CGCTCGAGGTCTAGTGTCTACACCAAAGC	<i>XhoI</i>
yabK1318R	TGAGATCTAATCGCTGCGCCCGC	<i>BglII</i>
yfpD	CCCAAGCTTGGGGGATCCGGGAAAAGGTGGTGAACACT ATGAGTAAAGGAGAAGAAGTCTTCACTGGAG	<i>HindIII</i> , <i>BamHI</i>
yfpR	GGAATTCTGGACATTTATTTGTATAGTTCATCCATGCC	<i>EcoRI</i>

Tabela 8 - Lista de plasmídeos

Nome	Descrição
pJB1	Plasmídeo derivado do pMAD, no qual foi introduzido um fragmento da região codificante do gene <i>yabK</i> , sem a região entre os codões 6 e 58
pJB2	Plasmídeo derivado do pMAD, no qual foi introduzido um fragmento da região codificante do gene <i>mfd</i> , sem a região entre os codões 250 e 1000
pJB3	Plasmídeo derivado do pMLK83 no qual foi introduzida a região codificante do gene <i>yfp</i> . Para fusões transcricionais com YFP.
pJB4	Plasmídeo derivado do pJB3 no qual foi introduzida a região promotora do gene <i>yabk</i> , do nucleotídeo -236 até ao -8 relativamente à adenina do codão de iniciação.
pJB6	Plasmídeo derivado do pSN32 no qual foi introduzida a região promotora do gene <i>csfB</i> com mutações pontuais na região -10 da zona dependente do factor sigma F
pJB8	Plasmídeo derivado do pSN32 no qual foi introduzida a região promotora do gene <i>csfB</i> com mutações pontuais na região -10 da zona dependente do factor sigma K
pJB9	Plasmídeo derivado do pACT2 no qual foi introduzida a região codificante do gene <i>yabK</i>
PJB10	Plasmídeo derivado do pAS2-1 no qual foi introduzida a região codificante do gene <i>sigE</i>
pJB11	Plasmídeo derivado do pAS2-1 no qual foi introduzida a região codificante do gene <i>sigK</i>
pJB12	Plasmídeo derivado do pDH88 no qual foi introduzida a região codificante do gene <i>sigE</i>
pJB13	Plasmídeo derivado do pJB12 no qual foi introduzida a região codificante do gene <i>csfB</i>
pJB18	Plasmídeo derivado do pAS2-1 no qual foi introduzida a região codificante do gene <i>sigA</i>
pMS261	Plasmídeo contendo uma fusão traducional entre os genes <i>csfB</i> , incluindo região promotora, e o gene <i>gfp</i> (Serrano, M., não publicado)
pMS356	Plasmídeo derivado do pACT2 no qual foi introduzida a região codificante do gene <i>csfB</i> (139)
pMS357	Plasmídeo derivado do pAS2-1 no qual foi introduzida a região codificante do gene <i>sigF</i> (139)
pMS358	Plasmídeo derivado do pAS2-1 no qual foi introduzida a região codificante do gene <i>sigG</i> (139)
pMS384	Plasmídeo contendo uma fusão do promotor do gene <i>csfB</i> com o gene <i>lacZ</i> . (Serrano, M., não publicado)
pMS419	Plasmídeo derivado do pMS261 no qual foram introduzidas mutações pontuais no promotor dependente de σ^F do gene <i>csfB</i> (Serrano, M., não publicado)
pMS426	Plasmídeo derivado do pMS261 no qual foram introduzidas mutações pontuais no promotor dependente de σ^K do gene <i>csfB</i> (Serrano, M., não publicado)

Tabela 9 - Estirpes de *B. subtilis* utilizadas e construídas durante este trabalho²

Estirpes	Genótipo revelante	Origem/referência
MB24	<i>trpC2 metC3</i>	Colecção do laboratório
AH77	<i>trpC2 metC3 ΔsigK::erm</i>	“
AH3795	<i>trpC2 ΔspoIIIG</i>	“
AH1042	<i>trpC2 metC3 ΔsspE::sspE-lacZ, Erm^R</i>	“
AH6507	<i>trpC2 metC3 ΔcsfB::km ΔamyE::csfB-gfp, Cm^R</i>	“
AH6651	<i>trpC2 metC3 ΔsspE::sspE-lacZ, Erm^R ΔspoIIA::sp ΔamyE::spoIIA, Cm^R</i>	Serrano, M. (139)
AH6659	<i>trpC2 metC3 ΔsspE::sspE-lacZ, Erm^R ΔspoIIA::sp ΔamyE::spoIIA^{E39N}, Cm^R</i>	“
AH6567	<i>trpC2 metC3 ΔsspE::sspE-lacZ, Erm^R ΔyycR::sspE-cfp Cm^R</i>	Colecção do laboratório
AH6568	<i>trpC2 metC3 ΔsspE::sspE-lacZ Erm^R ΔyycR::sspE-cfp Cm^R ΔcsfB::km</i>	“
AH6728	<i>trpC2 metC3 ΔcsfB::km ΔamyE::P_{sigK-csfB}-csfB-gfp, Cm^R</i>	Serrano, M.
AH6779	<i>trpC2 metC3 ΔcsfB::km ΔamyE::P_{sigF-csfB}-csfB-gfp, Cm^R</i>	“
AH9509	<i>trpC2 metC3 amyE::P_{yabK-yfp} Erm^R</i>	Este trabalho
AH9511	<i>trpC2 metC3 ΔyabK</i>	“
AH9512	<i>trpC2 metC3 Δmfd</i>	“
AH9515	<i>trpC2 metC3 ΔyabK ΔsspE::sspE-lacZ Erm^R</i>	“
AH9516	<i>trpC2 metC3 Δmfd ΔsspE::sspE-lacZ Erm^R</i>	“
AH9517	<i>trpC2 metC3 ΔyabK ΔsspE::sspE-lacZ Erm^R ΔyycR::sspE-cfp Cm^R</i>	“
AH9520	<i>trpC2 metC3 Δmfd ΔsspE::sspE-lacZ Erm^R ΔyycR::sspE-cfp Cm^R ΔcsfB::km</i>	“
AH9522	<i>trpC2 metC3 Δmfd ΔsspE::sspE-lacZ Erm^R ΔyycR::sspE-cfp Cm^R</i>	“
AH9523	<i>trpC2 metC3 ΔyabK ΔsspE::sspE-lacZ Erm^R ΔyycR::sspE-cfp Cm^R ΔcsfB::km</i>	“
AH9532	<i>ΔyabK sspE-lacZ@sspE Erm^R spoIIA::sp</i>	“
AH9533	<i>trpC2 metC3 ΔyabK ΔsspE::sspE-lacZ erm^R spoIIA::sp ΔamyE::spoIIA^{E39N} Cm^R</i>	“

² Continua na página seguinte

AH9535	<i>trpC2 metC3 ΔyabK ΔsspE::sspE-lacZ Erm^R spoIIA::sp ΔamyE::spoIIA Cm^R</i>	“
AH9538	<i>trpC2 metC3 ΔamyE::P_{csfB}-lacZ Cm^R</i>	“
AH9551	<i>trpC2 metC3 ΔamyE::P_{sigF-csfB}-lacZ Cm^R</i>	“
AH9552	<i>trpC2 metC3 ΔlonB::lonB-lacZ Erm^R</i>	“
AH9553	<i>trpC2 metC3 ΔyabK ΔlonB::lonB-lacZ Erm^R</i>	“
AH9555	<i>trpC2 metC3 ΔyabK ΔlonB::lonB-lacZ Erm^R ΔspoIIA::sp</i>	“
AH9556	<i>trpC2 metC3 ΔyabK ΔlonB::lonB-lacZ Erm^R ΔspoIIA::sp ΔamyE::spoIIA^{E39N} Cm^R</i>	“
AH9557	<i>trpC2 metC3 ΔyabK ΔlonB::lonB-lacZ erm^R ΔspoIIA::sp ΔamyE::spoIIA Cm^R</i>	“
AH9558	<i>trpC2 metC3 ΔlonB::lonB-lacZ Erm^R ΔspoIIA::sp</i>	“
AH9559	<i>trpC2 metC3 ΔlonB::lonB-lacZ Erm^R ΔspoIIA::sp ΔamyE::spoIIA Cm^R</i>	“
AH9560	<i>trpC2 metC3 ΔlonB::lonB-lacZ Erm^R ΔspoIIA::sp ΔamyE::spoIIA^{E39N} Cm^R</i>	“
AH9577	<i>trpC2 metC3 ΔamyE::P_{sigK-csfB}-lacZ Cm^R</i>	“
AH9591	<i>trpC2 metC3 ΔsigK::erm ΔamyE::P_{ΔsigK-csfB}-lacZ Cm^R</i>	“
AH9593	<i>trpC2 metC3 ΔspoIIIG ΔamyE::P_{sigF-csfB}-lacZ Cm^R</i>	“
AH9608	<i>trpC2 metC3 ΔspoIIP::spoIIP-lacZ, Erm^R</i>	“
AH9614	<i>trpC2 metC3 sigEQP_{spac}-sigE, Cm^R</i>	“
AH9615	<i>trpC2 metC3 sigEQP_{spac}-sigE-csfB, Cm^R</i>	“
AH9616	<i>trpC2 metC3 ΔsigE::P_{spac}-sigE, Cm^R spoIIPΩspoIIP-lacZ, Erm^R</i>	“
AH9617	<i>trpC2 metC3 ΔsigE::P_{spac}-sigE-csfB, Cm^R spoIIPΩspoIIP-lacZ, Erm^R</i>	“

Tabela 10 - Estirpes de *S. cerevisiae* utilizadas e construídas ao longo deste trabalho

Estirpe	Genotipo revelante	Origem/referencia
Y187	<i>MATα ura3-52 his3-200 ade2-101 trp1-901 leu2-3, 112 gal4Δ mef gal80Δ URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>	Harper <i>et al.</i> , 1993 (55)
Y190	<i>MATα ura3-52 his3-200 ade2-101 tys2-801 trp1-901 leu2-3, 112 gal4Δ gal80Δ cyh^r2 LYS2::GAL1_{UAS}HIS3_{TATA}HIS3 URA3::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-lacZ</i>	Harper <i>et al.</i> , 1993; Flick & Johnston, 1990 (45, 55)
AH9561	pMS356(Y190)/pMS358(Y187) (conjugação)	Este trabalho
AH9562	pMS356(Y190)/pJB10(Y187) (conjugação)	“
AH9563	pMS356(Y190)/pJB11(Y187) (conjugação)	“
AH9564	pMS356(Y190)/pMS357(Y187) (conjugação)	“
AH9565	pACT-2(Y190)/pAS2-1(Y187) (conjugação)	“
AH9566	pMS356(Y190)/pAS2-1(Y187) (conjugação)	“
AH9567	pJB9(Y190)/pMS358(Y187) (conjugação)	“
AH9568	pJB9(Y190)/pJB10(Y187) (conjugação)	“
AH9569	pJB9(Y190)/pJB11(Y187) (conjugação)	“
AH9570	pJB9(Y190)/pMS357(Y187) (conjugação)	“
AH9572	pJB9(Y190)/pAS2-1(Y187) (conjugação)	“
AH9586	pACT-2(Y190)/pMS357(Y187) (conjugação)	“
AH9587	pACT-2(Y190)/pJB10(Y187) (conjugação)	“
AH9588	pACT-2(Y190)/pMS358(Y187) (conjugação)	“
AH9589	pACT-2(Y190)/pJB11(Y187) (conjugação)	“
AH9605	pMS356(Y190)/pJB18(Y187) (conjugação)	“
AH9607	pACT-2(Y190)/pJB18(Y187) (conjugação)	“