



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**MECANISMO MOLECULAR DE ACCIÓN DEL SISTEMA
DE QUORUM SENSING NprR-NprRB EN LA
ESPORULACIÓN DE *Bacillus thuringiensis***

Por:

M.C. Rosina Cabrera Ruiz

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

Hermosillo, Sonora

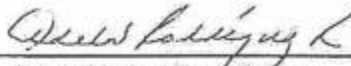
Enero de 2015

APROBACIÓN

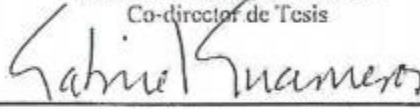
Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Rosina Cabrera Ruiz, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias.



Dra. Mayra de la Torre Martínez
Director de Tesis



Dra. Adela Rodríguez-Romero
Co-director de Tesis



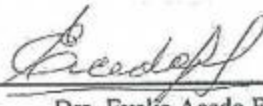
Dr. Gabriel Guarneros Peña
Asesor



Dra. Luz Vázquez Moreno
Asesor



Dra. Jesús Adriana Soto Guzmán
Asesor



Dra. Evelia Acedo Félix
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permite y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para los estudios de doctorado y por la Beca Mixta otorgada para la estancia de investigación nacional. Así mismo, por fomentar en la juventud la importancia de la ciencia para el desarrollo de México.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., por la oportunidad brindada para realizar mis estudios de doctorado.

Al CONACYT por el apoyo recibido para financiar la fase experimental a través del proyecto 180246 a cargo de la Dra. Mayra de la Torre Martínez.

A la Dra. Mayra de la Torre Martínez por permitirme formar parte de su grupo de trabajo y ser partícipe de mi desarrollo académico. Gracias por la confianza depositada en mí persona y su compromiso con mi formación.

A la Dra. Adela Rodríguez Romero por su asesoría durante la etapa experimental del trabajo. Por el apoyo desinteresado en mi desarrollo académico y por transmitirme sus conocimientos sobre el fascinante mundo de las proteínas.

Al Dr. Gabriel Guarneros Peña por enriquecer con sus aportaciones críticas el proyecto de investigación.

Comité de tesis: Dra. Luz Vázquez Moreno, Dra. Jesús Adriana Soto Guzmán y Dra. Evelia Acedo Félix, por las significativas aportaciones realizadas al presente trabajo. Cada una aportó enseñanzas valiosas que fortalecieron mis conocimientos.

Personal de la Coordinación de Programas Académicos de CIAD: Dra. Gloria Yépiz Plascencia (coordinadora), Laura García, Argelia Marín, Verónica Araiza, Aurora Vidal y Héctor Galindo. A Marovi Cortez Guzmán del departamento de cómputo. Agradezco también a Gerardo Reyna y Luis Conde de biblioteca, y a Héctor Cota de copiado.

Personal técnico del Laboratorio de Fisiología Celular y Bioprocesos: M. en C. Ana Lilia López Duarte por su disponibilidad, apoyo técnico, administrativo y propiciar un ambiente de trabajo agradable.

Laboratorio de Bioquímica 3 del Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química-UNAM a cargo de la Dra. Adela Rodríguez Romero y la Dra. Alejandra Hernández Santoyo, por brindarme la confianza de realizar gran parte del trabajo experimental en sus instalaciones.

Dr. Jorge Gustavo Rocha Estrada, Dra. Adriana Soto Guzmán, Dr. Ángel Gabriel Díaz Sánchez, Dr. Gabriel Gutiérrez Magdaleno y M.C. Victor Flores por su participación en el análisis y discusión de los resultados generados en el trabajo experimental.

A mis compañeros de laboratorio de Fisiología Celular y Bioprocesos que en las distintas etapas me compartieron su amistad: Jorge Gustavo Rocha Estrada, Guadalupe Yapur, Alfonso Álvarez, Viridiana Vega y Ernesto Gallardo.

Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Proteínas y Glicanos del CIAD a cargo de la Dra. Luz Vázquez Moreno, por permitirme trabajar en sus instalaciones. Especialmente a la M. en C. Ana María Guzmán Partida, por su asesoría en técnicas de purificación de proteínas.

Compañeros del Laboratorio de Bioquímica 3 (Instituto de Química-UNAM): Joanna, Ángel, Gabriel, Anayetzin, Efrén, Siseth, Christian e Israel, por su hospitalidad durante mi estancia y compartir sus conocimientos conmigo.

A la M. en C. Virginia Gómez Vidales técnico académico de resonancia paramagnética electrónica del Instituto de Química-UNAM, por el apoyo técnico para los experimentos de calorimetría de titulación isotérmica. Así mismo, a la Q.F.B Rocío Patiño-Maya, técnico académico de espectroscopía y polarimetría del Instituto de Química-UNAM.

Investigadores y técnico de los laboratorios del Departamento de Ciencia de los Alimentos de CIAD por apoyarme con su infraestructura en la fase experimental:

- Dra. Luz Vázquez Moreno, Dra. Gabriela Ramos, M. en C. Ana María Guzmán Partida, M. en C. Refugio Robles, Dra. Irlanda Lagarda del Laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de Proteínas y Glicanos.
- Dra. Evelia Acedo Félix responsable del Laboratorio de Aseguramiento de la Calidad Microbiológica de Alimentos y a la Q.B. Rosalba Pérez.

- Dra. Elisa Valenzuela Soto, a la M. en C. Ciria Figueroa y al Dr. Juan Pablo Valenzuela del Laboratorio de Bioquímica de proteínas de estrés.
- Dra. Ana Isabel Valenzuela Quintanar, responsable del Laboratorio de Toxicología de Plaguicidas
- Dra. Marisela Rivera y Q.B. Karen Astorga del Laboratorio de Biotecnología Molecular de Plantas.
- M. en C. Socorro Vallejo del Laboratorio de Ecología Química, a cargo de la Dra. Irasema Vargas.
- Dra. Verónica Mata Haro responsable del laboratorio de Microbiología Molecular y la M. en C. Leticia Félix.
- Investigadores y técnicos académicos de las otras coordinaciones de CIAD:
- Dr. Miguel Ángel Martínez responsable del Laboratorio de Fisiología Vegetal, especialmente al M. en C. Emmanuel Aispuro.
- Dr. Rogerio Sotelo Mundo y M. en C. Karina García del Laboratorio de Proteínas Recombinantes.
- Dra. Carmen Contreras del Laboratorio de Genética y Biología Molecular de Plantas a cargo de la Dra. María Auxiliadora Islas Osuna.
- Dra. Adriana Muhlia y Q. B. Sandra Araujo del Laboratorio de Bioenergética y Genética Molecular.
- Dra. Gloria Yépiz Plascencia y M. en C. Alma Peregrino del Laboratorio de Biología Molecular y Bioquímica.
- Compañeros y coordinadores del curso de Seminario de Investigación por sus sugerencias hacia mi trabajo.

A José Luis por su apoyo moral y cariño.

DEDICATORIA

*A mis papás Luz María y Fidel Ramón,
a mi abuela Rosina
y a José Luis.*

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Fisiología Celular y Bioprocesos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., bajo la dirección de la Dra. Mayra de la Torre Martínez y co-dirección de la Dra. Adela Rodríguez Romero (Departamento de Química de Biomacromoléculas del Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México). Se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) para el proyecto 180246: “Activación y función del regulador transcripcional de *quorum sensing* NprR en *Bacillus thuringiensis*” a cargo de la Dra. Mayra de la Torre Martínez.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	x
RESUMEN.....	xi
ABSTRACT	xiii
SINÓPSIS	1
ANTECEDENTES.....	9
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	16
REFERENCIAS	19
CAPÍTULO I. Over-expression at high cell density of the quorum sensing receptor NprR in <i>Escherichia coli</i> as functional protein.....	24
CAPÍTULO II. Regulation of sporulation initiation by NprR and its signaling peptide NprRB: molecular recognition and conformational change	54
CAPÍTULO III. Biochemical characterization of the response regulator Spo0F from <i>Bacillus thuringiensis</i> and its interaction with the quorum sensing receptor NprR	74

Nota: La numeración dentro de los Capítulos I y III corresponde al formato requerido para la revista correspondiente

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Caset transcripcional <i>nprR-nprRB</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> Bt8741..	3
Figura 2. Representación esquemática del mecanismo del sistema Rap-Phr en <i>Bacillus subtilis</i>	11
Figura 3. Representación esquemática del mecanismo de PrgX y sus péptidos de señalización: cCF10 (péptido activador) e iCF10 (péptido inhibidor).....	12
Figura 4. Representación esquemática del mecanismo de activación de PlcR.	13

RESUMEN

Quorum sensing (QS) es un mecanismo de comunicación bacteriano para regular la expresión génica en respuesta a la densidad celular, a través de moléculas de señalización y proteínas receptoras. En este trabajo se estudió el reconocimiento molecular del receptor de QS NprR con su péptido de señalización NprRB y con el regulador de respuesta Spo0F que participa en la regulación del inicio de la esporulación, todos codificados en el genoma de *Bacillus thuringiensis* (Bt).

Primeramente, se produjo la proteína NprR recombinante utilizando *Escherichia coli* como sistema de expresión heterólogo. Para lograr el plegamiento y funcionalidad de NprR fue necesario co-expresar las chaperonas DnaK-DnaJ-GrpE y GroEL-GroES. Además, se optimizaron las condiciones de proceso para la producción de NprR utilizando un cultivo en lote alimentado, incrementando 98 veces el rendimiento de NprR con respecto al obtenido en matraz agitado.

Se estudió la interacción entre NprR y distintos péptidos de señalización (NprRB) putativos y se encontró que SSKPDIVG, SKPDIVG y SSKPDIV se unieron a NprR con constantes de disociación de 7.19 nM, 28.20 nM y 70.92 nM respectivamente, determinadas por calorimetría de titulación isotérmica; además por espectroscopía de fluorescencia se demostró que la unión del péptido indujo cambios conformacionales en NprR y se observó cooperatividad positiva para la unión del péptido a la proteína.

Nuestros resultados indican que el mecanismo de reconocimiento NprR-NprRB se da a través de un proceso de selección conformacional. Un hallazgo importante del presente trabajo fue que en función de las concentraciones de péptido presentes, diferentes holoformas del complejo proteína-péptido pueden co-existir. Esto sugiere que la concentración de NprRB es un factor importante para las funciones de NprR.

NprR está relacionada filogenéticamente con las proteínas Rap (RapA,-B,-E,-H,-I,-J) de *Bacillus subtilis* que interaccionan y defosforilan el regulador de respuesta Spo0F~P.

Por lo tanto, se caracterizó la interacción de Spo0F con NprR y con el complejo NprR-NprRB. Se produjo a la proteína recombinante Spo0F en *E. coli*. Las constantes de disociación aparentes para la proteína libre y para el complejo, determinadas mediante fluorescencia intrínseca de triptófano fueron 7.12 μM y 25.91 μM respectivamente. Además, mediante dicroísmo circular se descubrió que la unión de Spo0F provoca cambios conformacionales a nivel de estructura terciaria en la región que corresponde al sitio de reconocimiento putativo para Spo0F en NprR. En base a los resultados obtenidos, se propuso que en Bt NprR regula el inicio de la esporulación mediante la modulación del *phosphorelay* a través de su unión con Spo0F.

Palabras clave: receptor bifuncional NprR, péptido de señalización NprRB, *quorum-sensing*, reconocimiento molecular, regulador de respuesta Spo0F, *phosphorelay*.

ABSTRACT

Quorum sensing (QS) is a bacterial communication mechanism for the regulation of gene expression in response to cell density, involving signaling molecules and receptor proteins. In this work we studied the molecular recognition between the NprR QS receptor and its signaling peptide NprRB and the response regulator Spo0F, which participates in the regulation of sporulation initiation, all encoded in the genome of *Bacillus thuringiensis* (Bt).

First, the NprR recombinant protein was produced using *Escherichia coli* as heterologous expression system. The co-expression of DnaK-DnaK-GrpE and GroEL-GroES chaperones was essential for obtaining a folded and functional NprR protein. The operational conditions for recombinant protein production in fed-batch culture were optimized. NprR concentration in fed-batch culture was 98 times than in shaken flasks.

Interaction between NprR and different putative signaling peptides (NprRB) was studied by isothermal titration calorimetry. SSKPDIVG, SKPDIVG and SSKPDIV bound to NprR with dissociation constants of 7.19 nM, 28.20 nM y 70.92 nM respectively. Furthermore, fluorescence spectroscopy assays showed that the peptide binding induced conformational change in the NprR and a positive cooperativity for the protein-peptide interaction was observed.

Our results show that the recognition mechanism of NprRB-NprR involves a conformational selection process and notably different holo-forms of the protein-peptide complex co-exist depending on the peptide concentration. This indicates that the NprRB concentration is important for the functions of NprR.

NprR is phylogenetically related to the Spo0F-binding Rap proteins (RapA,-B,-E,-H,-I,-J) from *Bacillus subtilis* that interact with the response regulator Spo0F and cause its dephosphorylation. For this reason, the interaction between the Spo0F and NprR or the NprR-NprRB complex was characterized. The recombinant protein Spo0F was produced

in *E. coli*. The apparent dissociation constants obtained by intrinsic tryptophan fluorescence for the apo-NprR and NprR-NprRB complex were 7.12 μM and 25.91 μM , respectively. Additionally, circular dichroism assays demonstrated that Spo0F binding induced conformational changes in the putative Spo0F-binding region of NprR. According to these results, we proposed that NprR modulates the phosphorelay and regulates the initiation of sporulation by binding to Spo0F in Bt.

Keywords: NprR bifunctional receptor, signaling peptide NprRB, quorum sensing, molecular recognition, response regulator Spo0F, phosphorelay.

SINÓPSIS

NprR es una proteína que pertenece a la familia de receptores de QS RNPP (**Rap/NprR/PrgX/PlcR**). Al inicio del presente proyecto las proteínas Rap, PrgX, y PlcR eran los miembros más estudiados, de los cuales se conocía la secuencia del péptido de señalización maduro, función, estructura y mecanismo molecular de acción. Sin embargo, a principios de 2011 existían muy pocos reportes sobre NprR y se proponía que era un regulador transcripcional que activaba directamente la expresión de *nprA*, que codifica para la proteasa neutra NprA. Con base en esto se planteó como primera hipótesis del trabajo de tesis que: “La proteína NprR de *Bacillus thuringiensis* (Bt) es capaz de unir a su péptido de señalización (NprRB) formando el complejo NprR-NprRB, el cual se une a regiones específicas en el promotor de los genes que regula”. Para abordar la hipótesis del trabajo se decidió utilizar un enfoque biofísico y realizar los experimentos *in vitro*. Primeramente fue necesario producir a la proteína NprR recombinante, para lo cual se utilizó *Escherichia coli* como sistema de expresión heterólogo. En un inicio la proteína NprR se obtuvo insoluble como cuerpos de inclusión, por lo cual se utilizó la co-expresión de las chaperonas moleculares DnaK-DnaJ-GrpE y GroEL-GroES como estrategia experimental para asistir en el plegamiento de NprR. Con esta estrategia se lograron establecer las condiciones de expresión que permitieron obtener a la proteína soluble. Posteriormente se estableció un protocolo de purificación que consistió en dos pasos cromatográficos, el primero fue cromatografía de afinidad a metales y el segundo fue cromatografía de intercambio aniónico. La integridad y pureza de NprR soluble fue comprobada mediante espectrometría de masas (LC/MS-MS y MALDI-TOF). Así mismo, para evaluar el plegamiento de la proteína se analizó su estructura secundaria por dicroísmo circular en la región del UV-lejano (DC).

Siendo hélices los elementos de estructura secundaria predominantes en la estructura de NprR (63%).

Con la colaboración de la Ingeniera Química Guadalupe Yapur Villaseñor se establecieron condiciones para la producción de NprR en un cultivo de alta densidad celular en lote alimentado, con este sistema se logró incrementar la productividad de proteína recombinante 98 veces con respecto a un cultivo en matraz agitado, que es como convencionalmente se produce en laboratorio. La estrategia consistió en establecer las condiciones de operación que fueron: medio de cultivo a base de glicerol y nitrógeno orgánico, perfil de alimentación constante, minimización de la producción de acetato, inducción primero de las chaperonas y una hora después de NprR, temperatura constante de 30 °C y evitar la limitación por oxígeno. La estrategia de producción de la proteína NprR recombinante corresponde al Capítulo I de esta tesis y constituye el manuscrito de artículo de investigación titulado: “Over-expression at high cell density of the quorum sensing sensor NprR as a functional protein in *Escherichia coli*”, el cual fue enviado a la revista *Microbial Cell Factories*.

Mientras se trabajaba en la primera etapa del proyecto, en nuestro grupo se realizó un estudio filogenético de los genes *nprR-nprRB* utilizando la secuencia de distintas cepas de bacterias pertenecientes al grupo de *B. cereus*, se encontró que ambos genes co-evolucionaron y constituyen 6 grupos, cada uno caracterizado por una secuencia del péptido maduro putativo de señalización NprRB [38]. En este trabajo se sugirió la existencia de comunicación cruzada en el grupo de *B. cereus* a través del sistema NprR-NprRB, lo que es importante de considerar ya que la virulencia en bacterias regularmente es activada por sistemas de QS y dentro del grupo de *B. cereus* se incluyen patógenos para humanos como *B. anthracis* (causante del ántrax) y *B. cereus* (causante de enfermedades transmitida por contaminación de alimentos). También se encontró que el péptido de señalización maduro para Bt podría corresponder a la secuencia SKPDI y no a SKPDT como anteriormente se había propuesto [6, 34]. A partir de la información y tomando en cuenta la secuencia *nprRB* de la cepa Bt8741 se generaron péptidos sintéticos de diferente longitud (5, 6, 7, 8 y 9 aminoácidos) (Figura 1) y se realizaron

ensayos *in vivo* para evaluar el efecto de los péptidos sintéticos generados sobre el fenotipo de esporulación y la expresión de la fusión transcripcional *cryIAa-lac'Z*. Los péptidos de 5 aminoácidos incrementaron ligeramente la expresión de *cryIAa*, mientras que los de 7 y 8 aminoácidos (SKPDIVG y SSKPDIVG) tuvieron un efecto sobre la eficiencia de esporulación de la bacteria e indujeron una aparición temprana de esporas (regulación temporal).

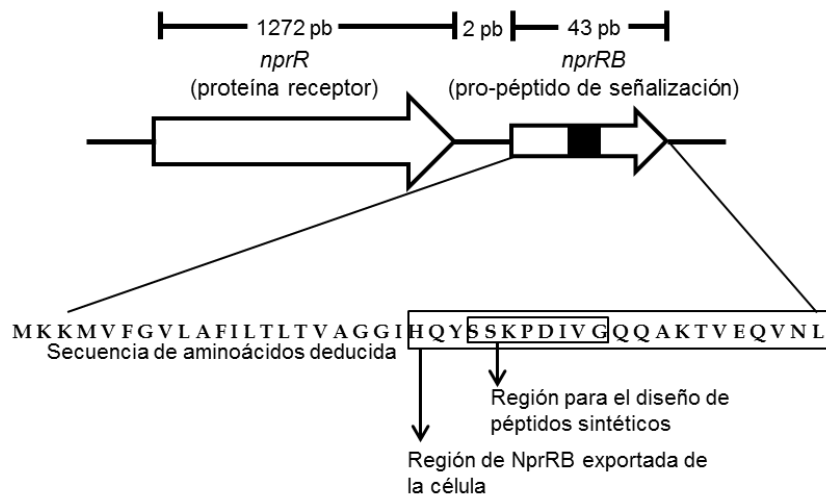


Figura 1. Caset transcripcional *nprR-nprRB* de *Bacillus thuringiensis* Bt8741. Se indica la secuencia de *nprRB* a partir de la cual se diseñaron los péptidos sintéticos utilizados para evaluar la interacción de estos con NprR.

Para conocer si los péptidos que tuvieron efecto *in vivo* podían ser reconocidos e interactuar con NprR *in vitro*, se realizaron experimentos de unión mediante calorimetría de titulación isotérmica. SSKPDIVG presentó la mayor afinidad por la proteína con una $K_d=7.19$ nM, seguido por SKPDIVG con una $K_d=28.20$ nM y SSKPDIV con una $K_d=70.92$ nM. SKPDI y SKPDT no fueron reconocidos por NprR. La unión del péptido a la proteína fue dirigida entálpicamente, lo que indica que las principales interacciones que estabilizan el complejo NprR-NprRB son puentes de hidrógeno y fuerzas de Van der Waals. El cambio entrópico fue desfavorable termodinámicamente, lo que significa que el complejo proteína-péptido es más estable que la forma libre de NprR.

Debido a que SSKPDIVG fue el péptido que tuvo mayor afinidad por NprR, se decidió estudiar el reconocimiento molecular entre ambas especies. Mediante espectroscopía de fluorescencia se demostró que durante la unión del péptido, la proteína experimenta cambios conformacionales y que dicha unión se lleva a cabo a través de un proceso de cooperatividad positiva. La cooperatividad positiva observada en el sistema NprR-NprRB sugirió que la unión del péptido a un sitio de reconocimiento de NprR causa cambios conformacionales que favorecen la existencia de una conformación en la proteína por la cual el péptido presenta mayor afinidad, lo que favorece que otras moléculas de péptido puedan unirse a otros monómeros vecinos con mayor facilidad.

Debido a que los cambios conformacionales y los estados de oligomerización inducidos en la proteína receptora por la unión de su péptido de señalización son aspectos esenciales para la actividad biológica en los sistemas de QS, en esta parte del trabajo se evaluó dicho aspecto mediante ensayos de desplazamiento térmico. La forma apo-NprR mostró tres estados de transición con temperaturas de fusión (T_m) de 44.2, 51.9 y 56.7 °C, respectivamente, que corresponden a estados conformacionales distintos de NprR, mientras que el complejo NprR-NprRB exhibió un desplazamiento del equilibrio hacia uno de los estados conformacionales pre-existentes en la apo-proteína (T_m de 51.9 °C).

Con electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones nativas se demostró que la apo-NprR forma tetrámeros, hexámeros y octámeros, y que la unión del péptido desplaza las diferentes especies hacia el tetrámero. Estos resultados mostraron que el reconocimiento molecular entre NprR y NprRB corresponden a un mecanismo de selección conformacional, el cual postula que en la naturaleza todas las conformaciones de una proteína pre-existen, y que el ligando selecciona preferentemente la conformación por la cual presenta mayor afinidad; después de la unión, se da una redistribución de los diferentes estados conformacionales de la población hacia la conformación activa [39]. De especial interés resultó el hecho de que los conjuntos conformacionales del sistema NprR-NprRB son función de la concentración de NprRB. Cuando las concentraciones de péptido son saturantes o se encuentran arriba de la concentración de saturación, aparece otro estado conformacional más estable (T_m de 56.7 °C) del complejo proteína-péptido. Cuando son menores se observa un

desplazamiento del equilibrio de las formas de NprR libre hacia un estado conformacional pre-existente del complejo proteína-péptido (T_m de 51.9 °C).

Cuando se trabajaba en esta etapa del proyecto, aparecieron varias publicaciones sobre NprR. Primeramente, Perchat et al. [10] demostraron que NprR es un regulador transcripcional que se asocia con su péptido de señalización NprRB y se une al promotor del gen que codifica para la proteasa neutra (*nprA*) y activa su expresión. Se propuso a SKPDIVG como el péptido de señalización del sistema. Yang et al. [36] describieron que la mayoría de las papilas que aparecen sobre el crecimiento masivo de *B. anthracis* en medio LB-agar son mutantes en *nprR* que presentan una actividad de proteasa disminuida y son deficientes en esporulación. En este estudio se especuló que NprR es un sensor temprano involucrado en el inicio de la esporulación. Posteriormente, Dubois et al. [35] reportaron que NprR regulaba diferencialmente 41 genes durante su fase saprófita en insectos infectados. El regulón incluye genes que codifican para enzimas degradativas que son esenciales para la degradación de sustratos y que son expresados por Bt específicamente después de la muerte del insecto. También se encontraron proteínas involucradas en la síntesis de péptidos no ribosomales llamados kurstakin que son requeridos para *swarming* y formación de biopelículas, durante el desarrollo saprófito de la bacteria.

Debido a que otro grupo de investigación demostró la hipótesis planteada al inicio del presente proyecto, la cual consistía en demostrar que el complejo NprR-NprRB activa la expresión del gen *nprA*, se planteó como nueva hipótesis del trabajo la siguiente: “El sistema NprR-NprRB participa regulando el inicio de la esporulación de *Bacillus thuringiensis* a través de la modulación del sistema de transducción de señales *phosphorelay* mediante interacciones proteína-proteína con el regulador de respuesta Spo0F”. Para plantear esta hipótesis se consideraron los siguientes antecedentes: 1) El sistema NprR se relacionó con la regulación del proceso de esporulación en *B. anthracis* y Bt [36, 38], 2) En el regulón de NprR no se reportó ningún gen relacionado con esporulación, pero en este mismo trabajo se encontró que una delección de *nprR-nprRB* provocaba una disminución en el número de esporas viables de Bt, [35], y 3) NprR

posee estructuralmente un plegamiento similar a las proteínas Rap [6, 10], que regulan el inicio de la esporulación en *B. subtilis* (Bs) mediante la modulación del sistema de transducción de señales *phosphorelay*, uniéndose al regulador de respuesta Spo0F~P desfosforilándolo [21].

Con el apoyo del grupo de trabajo del Dr. Gabriel Guarneros Peña se realizó un análisis *in silico* que consistió en un alineamiento y la construcción de un árbol filogenético empleando la secuencia aminoacídica de las 11 proteínas Rap de *B. subtilis* (Bs168), 8 Rap putativas homólogas codificadas en el genoma de Bt407, 4 en el genoma de *B. cereus* (Bc10987) y NprR de Bt8741. Se encontró que NprR está más relacionada con las proteínas Rap de Bs168 que se unen a Spo0F que con las otras proteínas Rap. Así mismo, se encontró un 85% de similitud entre los residuos de la interfase de Rap-Spo0F y los residuos de NprR posiblemente involucrados en su interacción con Spo0F, sugiriendo que NprR y Rap quizás se unan en la misma superficie de Spo0F.

Por otra parte, en el trabajo de tesis doctoral del Dr. Jorge Gustavo Rocha Estrada se generó una cepa mutante de la cepa Bt8741 en la que se eliminaron los genes *nprR-nprRB* (cepa $\Delta nprR-nprRB$), la cual presentó actividad de proteasa disminuida y un retraso en el inicio de la esporulación. Para comprobar que el efecto era a nivel del *phosphorelay*, se evaluó la activación de la transcripción de los genes *spoIIA* y *spoIIIG* (genes que codifican para los factores sigma específicos de esporulación σ^F and σ^G , respectivamente) en la cepa mutante y en la cepa silvestre. La afectación de estos genes está relacionada con una afectación en los niveles de Spo0A~P, el producto final del *phosphorelay* [18, 40]. Los niveles de transcrito fueron evaluados al inicio de la fase de transición (t_0) y 2 h después del inicio de la fase de transición (t_2), encontrándose que del t_0 al t_2 la expresión de *spoIIA* y *spoIIIG* fue 12 y 116 veces mayor en la cepa silvestre con respecto a la mutante. Esto significa que NprR interviene en la modulación del *phosphorelay*. Posteriormente, para demostrar si la participación de NprR en la esporulación es dependiente de su capacidad de unión al ADN se construyó una cepa con el fondo genético de la mutante, que expresa la proteína NprR sin su dominio de unión a DNA (HTH) y tiene el gen *nprRB* que codifica para el pro-péptido de

señalización (NprR Δ H₁TH-NprRB). Se observó que el número de esporas producidas por esta cepa y la que expresa a la proteína completa junto con su pro-péptido de señalización era comparable, indicando que la regulación del inicio de la esporulación por el sistema NprR-NprRB es independiente de la capacidad del receptor para unirse al ADN. Esta evidencia sugería fuertemente que NprR podría interactuar con el regulador de respuesta Spo0F y modular la esporulación mediante una interacción proteína-proteína.

Para probar la nueva hipótesis del trabajo se sobreexpresó y purificó a la proteína recombinante Spo0F utilizando como sistema de expresión heterólogo *E. coli*. Se demostró la interacción entre Spo0F y el complejo NprR-NprRB mediante fluorescencia intrínseca de triptófano, lo cual fue posible debido a que Spo0F no contiene triptófanos en su secuencia aminoacídica, por lo que el cambio en la fluorescencia observado corresponde a los cambios en la conformación de NprR por la unión de Spo0F.

Los resultados generados en la segunda etapa del proyecto de tesis, que corresponden al análisis *in silico* de las secuencias de aminoácidos de NprR y estructura terciaria de las proteínas Rap, los experimentos *in vivo* que sugirieron que el efecto de NprR-NprRB sobre la esporulación es a nivel del *phosphorelay*, el estudio que caracteriza el reconocimiento molecular entre NprR y NprRB *in vitro*, y la interacción entre el complejo NprR-NprRB con el regulador de respuesta Spo0F fueron publicados en el artículo de investigación titulado “Regulation of sporulation initiation by NprR and its signaling peptide NprRB: molecular recognition and conformational changes”, presentados como Capítulo II de esta tesis.

Como tercera parte de este proyecto se caracterizó la interacción entre NprR/NprR-NprRB y Spo0F. Adicionalmente, debido a que no existen reportes donde se haya estudiado bioquímicamente al regulador de respuesta Spo0F de Bt se procedió a analizar la estructura secundaria y las propiedades de plegamiento de esta proteína utilizando dicroísmo circular en la región del UV-lejano. Los resultados mostraron que Spo0F posee un plegamiento típico de α -hélices y hojas- β como principales elementos de estructura secundaria, información que coincide con el plegamiento reportado para la

proteína Spo0F de *B. subtilis* [41]. Un alineamiento de la secuencia aminoacídica de Bt-Spo0F y Bs-Spo0F mostró que todos los residuos importantes para la función de Spo0F se encuentran conservados en ambas proteínas, lo cual sugiere que la función de este regulador de respuesta está conservada en Bt.

Por otra parte, se determinaron las constantes de afinidad aparentes para la interacción entre Spo0F y NprR/NprR-NprRB utilizando fluorescencia intrínseca de triptófano. Siendo la $K_d=7.121 \mu\text{M}$ para la unión de Spo0F a NprR y de $25.91 \mu\text{M}$ para la unión de Spo0F al complejo NprR-NprRB. En este experimento se observó un proceso de cooperatividad positiva para la interacción de Spo0F con NprR-NprRB, mientras que para la unión de Spo0F a NprR este fenómeno no se observó. La información generada sugiere que los mecanismos de reconocimiento entre el regulador de respuesta y la forma libre de la proteína o en complejo con su péptido de señalización son distintos, así como los cambios conformacionales que experimenta NprR durante dicha unión. Las interacciones anteriormente descritas fueron demostradas a través de dicroísmo circular en la región del UV-cercano, donde se analizaron cambios en NprR a nivel de estructura terciaria. En esta parte del trabajo se decidió evaluar la unión de NprR y NprR-NprRB al promotor del gen de la proteasa neutra NprA como control del reconocimiento, debido a que este hecho había sido demostrado anteriormente [10]. Encontrándose que sólo el complejo NprR-NprRB fue capaz de unirse al ADN.

Se preparó el manuscrito titulado “Biochemical characterization of the response regulator Spo0F from *Bacillus thuringiensis* and its interaction with the quorum sensing receptor NprR”, con formato para enviar a la revista *Biochemistry*. Los resultados generados en este trabajo de tesis permiten proponer un modelo molecular para explicar la función de NprR como regulador transcripcional y como modulador del *phosphorelay*. Este manuscrito corresponde al Capítulo III.

ANTECEDENTES

Quorum sensing (QS) es un mecanismo de comunicación célula-célula que se refiere a la habilidad de las bacterias para regular la expresión génica, en respuesta a fluctuaciones en la densidad celular. Las bacterias producen y liberan moléculas químicas de señalización denominadas auto-inductoras, cuya concentración externa aumenta en función del aumento de la densidad celular. Cuando las comunidades llegan a densidades celulares altas, dichas moléculas de señalización alcanzan un umbral de concentración y se unen a sus receptores específicos localizados en la membrana o en el citoplasma. Las bacterias Gram-negativas utilizan *N*-acil homoserina lactonas como moléculas auto-inductoras, mientras que las bacterias Gram-positivas emplean oligopéptidos. Los sistemas de QS controlan procesos vitales para la célula bacteriana como la expresión de factores de virulencia, esporulación y transferencia de genes [1-4].

En bacterias Gram-positivas ha sido descrita una familia de receptores de QS denominada RNPP, formada por las proteínas **Rap**, **NprR**, **PrgX** y **PlcR**. Estas proteínas se encuentran relacionadas filogenéticamente y comparten algunas características, tales como: i) ser proteínas receptoras intracelulares, ii) el péptido de señalización está codificado como precursor (pro-péptido de señalización) en un marco de lectura abierta (ORF) que se localiza directamente después de la secuencia que codifica para la proteína receptora [6], iii) el pro-péptido de señalización es secretado a través de un sistema transportador-ABC (*Sec-dependent*), procesado extracelularmente y reimportado al citoplasma como oligopéptido maduro mediante un sistema de transporte oligopeptido permeasa (Opp) [5-8], iv) estructuralmente poseen un extremo C-terminal formado por múltiples dominios tetratricopéptidos (TPRs) a través de los cuales tienen lugar

interacciones proteína-péptido [9], y v) los receptores NprR, PrgX y PlcR contienen en su extremo N-terminal un dominio hélice-giro-hélice (HTH) para unirse al ADN y regular la expresión de genes [10, 11]. A diferencia de NprR, PrgX y PlcR, el extremo N-terminal de las proteínas Rap consiste de una región formada por un racimo de 3-hélices alfa responsables de su interacción con proteínas reguladoras de respuesta (RR) [12]. Si bien, los receptores miembros de la familia RNPP comparten ciertas características y son activados o desactivados por su péptido de señalización, el mecanismo molecular descrito para Rap, PlcR y PrgX es diferente.

Las proteínas Rap (aspartil fosfato fosfatasas) y sus péptidos de señalización (Phr) han sido ampliamente estudiados en *Bacillus subtilis*, donde participan regulando el inicio de la esporulación, el desarrollo de competencia genética, la formación de biopelículas y canibalismo [13, 14]. También en *Bacillus anthracis* se ha encontrado una proteína Rap que modula el inicio de la esporulación [15]. Este inicio es regulado a través del sistema de transducción de señales conocido como *phosphorelay* en el que se inicia el flujo de grupos fosfato desde cinco histidinas cinasas (HC) (KinA, KinB, KinC, KinD y KinE), siendo el último regulador de respuesta fosforilado, Spo0A. Las HC se autofosforilan en respuesta a condiciones ambientales y señales fisiológicas relacionadas con limitación de nutrientes [16]. Las señales convergen en un intermediario central, el RR Spo0F, que se autofosforila a través de una HC. Spo0F fosforila a Spo0B, el cual a su vez transfiere el grupo fosforilo a Spo0A en la última etapa del *phosphorelay* [17]. Spo0A fosforilado es el regulador maestro del inicio de la esporulación y regula 121 genes [18] (Figura 1). En *B. subtilis* se han descrito 11 proteínas Rap homólogas y 8 péptidos de señalización; RapA,-B,-E, y -H interaccionan y defosforilan el regulador de respuesta Spo0F~P reduciendo los niveles de Spo0A~P en la célula e inhibiendo la esporulación. RapC,-F,-G y -H inhiben a los reguladores transcripcionales ComA y DegU que regulan la transcripción de genes de competencia genética y producción de proteasas, respectivamente [19, 20]. En el sistema Rap-Phr los péptidos de señalización actúan como inhibidores de la actividad de fosfatasa de las proteínas Rap. Es importante señalar que RapH es el único miembro de las proteínas Rap bifuncional, ya que inhibe el inicio de la esporulación defosforilando a Spo0F~P, e inhibe también la capacidad de la

bacteria para internalizar ADN a la célula (desarrollo de competencia genética) al interactuar con el regulador transcripcional ComA [21] (Figura 2).

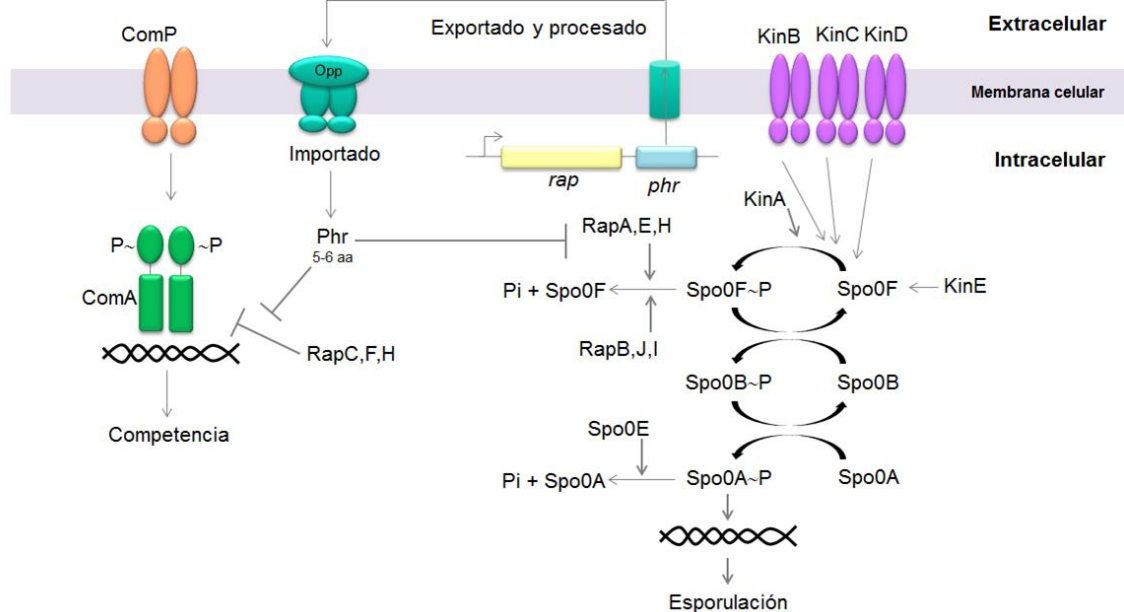


Figura 2. Representación esquemática del mecanismo del sistema Rap-Phr en *Bacillus subtilis*. Los genes *rap* y *phr* son co-transcritos. Los productos de los genes *rap* participan en la defosforilación del regulador de respuesta Spo0F~P del *phosphorelay* para controlar el inicio de la esporulación (RapA,-B,-E,-H,-I,-J; mecanismo representado a la derecha) o inhibiendo la capacidad de unión al ADN del regulador de respuesta ComA involucrado en la transcripción de genes para el control de competencia genética (RapC,-F,-H; mecanismo representado a la izquierda). El *phosphorelay* es activado por cinco histidinas cinasas (KinA y KinE son citoplasmáticas, mientras que KinB, KinC y KinD están unidas a membrana). Spo0F~P transfiere el grupo fosfato a la fosfotransferasa Spo0B, la cual transfiere el fosfato al regulador de respuesta y regulador transcripcional Spo0A. Spo0A~P activa la transcripción de genes requeridos para el inicio de la esporulación. La unión de las proteínas Rap a Spo0F~P impiden la transferencia del grupo fosfato a través del *phosphorelay* y el inicio de la esporulación es bloqueado.

ComA y ComP constituyen el sistema de transducción de señales requerido para el desarrollo de competencia genética. ComP es un sensor histidina cinasa unido a la membrana que fosforila a ComA, mientras que ComA es un regulador de respuesta con dos dominios regulatorios. El dominio N-terminal corresponde al sitio de fosforilación y el C-terminal correspondiente a un dominio de unión a ADN para regular la transcripción de genes. Las proteínas Rap se unen a ComA independientemente de su estado de fosforilación e inhiben la actividad de ComA para unirse al ADN. El producto de los genes *phr*, cuya longitud varía de 39 a 57 aminoácidos, primero es secretado fuera de la célula donde procesado y después es reimportado. Dentro de la célula Phr (de 5 o 6 aminoácidos) se une a su proteína Rap blanco e inhiben su actividad correspondiente, inicio de esporulación o desarrollo competencia [21,22, 23]. En el diagrama las flechas indican activación y las líneas perpendiculares regulación negativa.

La función de PrgX (regulador de la feromona sexual de *Enterococcus faecalis*) es regular la conjugación bacteriana y los genes de virulencia codificados en el plásmido pCF10 en *E. faecalis*. El receptor PrgX regula negativamente la transcripción del operón de conjugación *prgQ* codificado en pCF10. La función de este receptor depende de dos péptidos de señalización diferentes (cCF10 e iCF10) que interactúan en el mismo sitio de reconocimiento de la proteína, pero provocan cambios conformacionales y estados de oligomerización distintos. PrgX (tetrámero conformado por dos homo-dímeros) reconoce dos regiones operadoras (O1 y O2) en el ADN de pCF10. El sitio O2 y el promotor del operón *prgQ* se superponen y la unión de PrgX en dicha región inhibe la transcripción de *prgQ* [22].

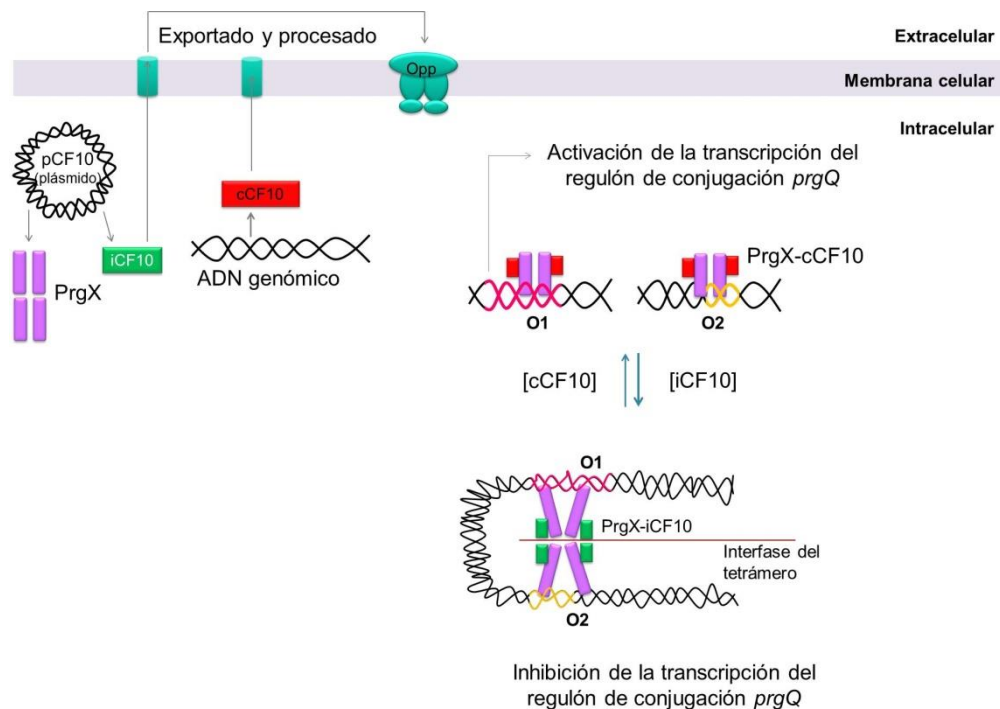


Figura 3. Representación esquemática del mecanismo de PrgX y sus péptidos de señalización: cCF10 (péptido activador) e iCF10 (péptido inhibidor). Las células donadoras contienen el plásmido de conjugación pCF10 donde se localizan los genes que codifican para PrgX e iCF10. Las células donadoras y receptoras sintetizan cCF10 codificado en el cromosoma.

La unión de cCF10 altera el C-terminal de PrgX desestabilizando el tetrámero y disminuyendo la afinidad de PrgX por el operador (O2). La transcripción del operón *prgQ* es activada y se transcriben los genes de conjugación. La unión de iCF10 estabiliza el tetrámero de PrgX e incrementa la afinidad de este por la región operadora (O1 y O2) del operón de conjugación. Lo que induce la formación de un asa en el ADN impidiendo el acceso de la RNA polimerasa para que se transcriban los genes de conjugación, inhibiendo el inicio de conjugación bacteriana [28].

cCF10 es el péptido activador del sistema, se encuentra codificado en el genoma de la bacteria y se une al apo-tetrámero de PrgX. La unión de este péptido provoca cambios conformacionales en la región C-terminal del receptor, lo cual desestabiliza el tetrámero y provoca una disminución en la afinidad del homo-dímeros al O₂. Esto permite que espacialmente la RNA polimerasa tenga acceso a la región promotora y la transcripción de los genes del operón de conjugación *prgQ* es activada. iCF10 es el péptido inhibidor, se encuentra codificado en el plásmido pCF10 y su unión a PrgX estabiliza la interfase del tetrámero. La interacción de PrgX e iCF10 induce la formación de una asa en el ADN, cuya conformación incrementa la afinidad de PrgX por las regiones operadoras impidiendo el acceso de la RNA polimerasa y disminuyendo la expresión del operón de conjugación. Este sistema permite la transferencia del plásmido pCF10 de una célula bacteriana donadora a una célula receptora [22-26] (Figura 3).

Por otra parte, en *Bacillus cereus*, PlcR fue definido como un regulador transcripcional pleiotrópico que es activado por la unión de su péptido de señalización PapR. La unión de PapR al apo-dímero inactivo de PlcR induce un cambio conformacional para formar el dímero activo de PlcR-PapR, este cambio reorienta el dominio HTH sobre su secuencia de reconocimiento en el ADN, denominada caja PlcR [27, 28]. De esta manera, el complejo PlcR-PapR se une al ADN y regula la expresión de un regulón que consta de 45 genes donde se incluyen factores de virulencia como fosfolipasas C, proteasas y hemolisinas [29] (Figura 4). El sistema PlcR-PapR está conservado en el grupo de *B. cereus* donde se pueden clasificar 4 fenotipos [30].

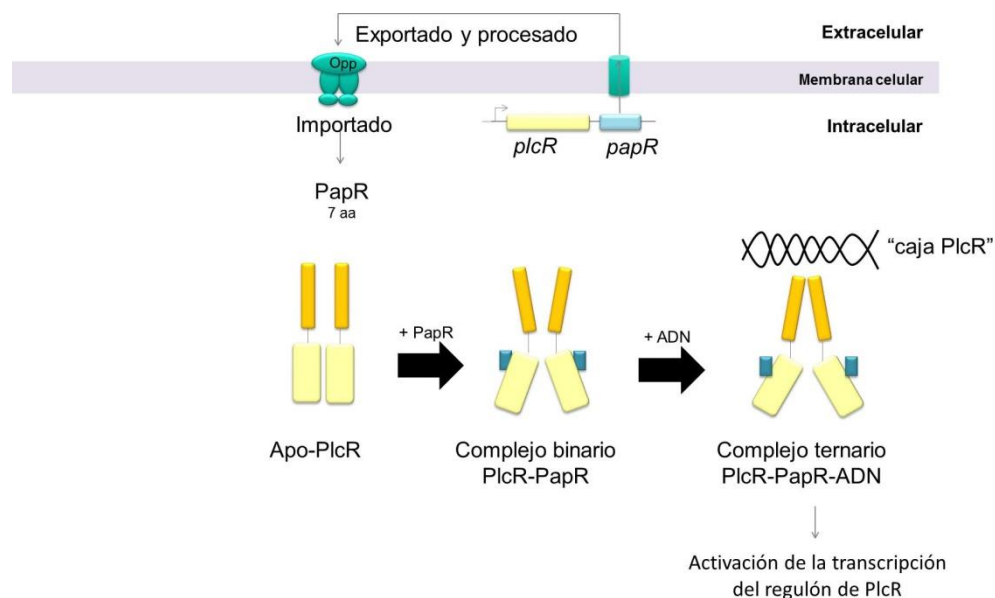


Figura 4. Representación esquemática del mecanismo de activación de PlcR. El receptor PlcR contiene dos dominios separados por una región conectora: el N-terminal correspondiente a un dominio de unión a ADN hélice-giro-hélice (HTH) y el C-terminal que está formado por seis dominios tetratricopéptidos (TPRs). El sitio de reconocimiento del péptido de señalización PapR y el sitio de dimerización de PlcR se localiza en el C-terminal. En la primera etapa, el péptido de señalización (cuadrados azules) induce una pequeña reorientación del C-terminal y reduce el área de interfase entre el dominio HTH y la región conectora. En la segunda etapa, la unión del ADN promueve un drástico pliegue en la hélice conectora del HTH. Este notable cambio conformacional resulta en un cambio significativo en el modo de dimerización de PlcR y permite a la α -hélice 3 del dominio HTH de cada monómero del dímero encajar en los dos sitios medios del ADN activándose la transcripción del regulón PlcR [27].

NprR (regulador de la proteasa neutra) se describió como un elemento genético necesario para la regulación del gen estructural *nprE* que codifica para una proteasa neutra en *B. subtilis* [31,32]. Más tarde, en *Bacillus stearothermophilus* se propuso que NprR (nombrado NprA) era un sistema de regulación producido en la fase logarítmica tardía del crecimiento de la bacteria, que auto-regulaba su expresión uniéndose a una secuencia palindrómica del gen *nprR*, y que activaba en la fase estacionaria de crecimiento la expresión de *nprS* (homólogo de *nprE*) al unirse al promotor de este gen [33]. Pottathil y Lazazzera [6] definieron a NprR de *Bacillus thuringiensis* (Bt) como una proteína de QS tipo Rap porque corriente arriba del gen *nprR* se localizó un ORF que codifica para un pro-péptido de señalización similar a *phr*. Posteriormente, NprR fue incluida dentro de la familia RNPP [5]. Aceves-Diez et al. [34] fueron los primeros en reportar que la adición del péptido SKPDT, descrito como el péptido de señalización putativo de NprR [6], a cultivos de Bt serovar *kurstaki* en fase de transición, estimulaban la esporulación y la transcripción de *cry1Aa*, que codifica para la proteína insecticida Cry1Aa sintetizada durante la esporulación. Otros reportes indicaron que el sistema NprR-NprRB tiene un efecto positivo en la esporulación de *B. cereus* [35] y que mutaciones en *nprR* disminuyen la esporulación de *B. anthracis* [36]. Estos resultados en conjunto sugieren que NprR interviene en la regulación del proceso de esporulación. Es importante mencionar que Bt pertenece al grupo de *B. cereus* (*B. cereus*, Bt, *B. anthracis* y *B. mycoides*) [37].

La comunicación bacteriana mediada por QS ha cobrado gran importancia porque al estudiarla se ha encontrado que las poblaciones bacterianas responden de manera coordinada a estímulos, y que en la población co-existen subpoblaciones diferenciadas fisiológicamente que llevan a cabo distintas funciones lo que permite la sobrevivencia de la especie. Como se mencionó antes, para los sistemas de QS las bacterias utilizan una colección de mecanismos moleculares para monitorear la densidad celular y regular la expresión génica. En este mismo sentido, actualmente ha crecido el interés por el estudio de las interacciones entre las macromoléculas biológicas porque constituyen la base de todos los procesos biológicos de los organismos vivos.

El presente trabajo se centró en estudiar la interacción de NprR con su péptido de señalización maduro NprRB, con el regulador de respuesta Spo0F y con la secuencia de ADN que tiene la caja de unión de esta proteína, *in vitro* utilizando un enfoque biofísico. Para poder estudiar las interacciones moleculares del sistema NprR-NprRB se requería producir una proteína NprR recombinante funcional. Después de más de un año de experimentación se logró obtenerla co-expresando *nprR* con las chaperonas moleculares *dnaK-dnaJ-grpE-groEL-groES*, y estableciendo las condiciones para su producción en cultivos por lote y por lote alimentado, así como el proceso para su purificación. Al inicio del proyecto se desconocía la secuencia aminoacídica de NprRB, pero se sabía que correspondía a una región interna del pro-péptido. Por lo que se mandaron a sintetizar péptidos de diferente longitud contenidos en dicha región y se analizó la unión *in vitro* para identificar cuales péptidos interactuaban con NprR, así mismo se caracterizó dicho reconocimiento.

Por otra parte, existían algunos reportes que sugerían que NprR-NprRB regula el inicio de la esporulación de Bt, pero se desconocía si este proceso era a través de la modulación del *phosphorelay* mediante interacción proteína-proteína con Spo0F, por lo que también se realizaron estudios de unión entre NprR/NprR-NprRB y Spo0F. De esta manera, con la información generada se propuso un mecanismo molecular de acción del sistema NprR-NprRB como regulador del inicio de la esporulación en Bt.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en el presente trabajo aportaron conocimiento respecto al reconocimiento molecular del sistema de QS NprR-NprRB para la regulación del inicio de la esporulación de Bt a través de una modulación del *phosphorelay* mediante la interacción proteína-proteína con el regulador de respuesta Spo0F. La información generada permitió proponer un mecanismo molecular para este sistema. Las conclusiones generales y las correspondientes a cada uno de los temas abordados en los capítulos que conforman esta tesis son descritas enseguida:

1. La estrategia de co-expresión de las chaperonas moleculares DnaK-DnaJ-GrpE y GroEL-GroES permitió obtener a la proteína NprR recombinante soluble, plegada y funcional. Lo cual fue determinante para que la fase experimental de este trabajo se realizara adecuadamente.
2. SSKPDIVG, SKPDIVG y SSKPDIV fueron reconocidos por NprR *in vitro*, los cuales previamente habían mostrado tener un efecto sobre la esporulación en cultivos de Bt *in vivo*. Con base en esto se propuso que más que un péptido de señalización, existen varios péptidos de 7 y 8 residuos capaces de unirse con distintas afinidades y podrían funcionar como péptidos de señalización (NprRB) del receptor NprR. El reconocimiento molecular NprR- SSKPDIVG involucra un mecanismo de selección conformacional donde se incluyen cambios conformacionales en NprR y un proceso de cooperatividad positiva para la interacción.
3. NprR, además de regular la expresión de genes uniéndose al ADN a través de su dominio HTH, interacciona con Spo0F *in vitro* a través de interacción proteína-proteína, por lo que se propuso a esta proteína como un receptor bifuncional de QS en Bt. Los

análisis de desplazamiento térmico indican que dependiendo de la concentración de NprRB, la unión del péptido induce la presencia de uno o dos estados conformacionales distintos del complejo NprR-NprRB, inclusive Spo0F tiene mayor afinidad por NprR libre. Esto sugiere que la concentración de péptido disponible en la célula podría ser un factor importante para que NprR funcione como regulador transcripcional o como modulador del *phosphorelay*.

4. Las proteínas Spo0F de Bt y *B. subtilis* presentan alta similitud en su secuencia aminoacídica (78%) y los espectros de dicroísmo circular sugieren que ambas proteínas contienen los mismos elementos de estructura secundaria: α -hélices y hojas- β . Adicionalmente, los residuos importantes para las funciones Spo0F descritos en *B. subtilis* se encuentran conservados en Bt-Spo0F, lo que sugiere que las funciones de este regulador de respuesta están conservadas en Bt. La interacción de Spo0F y NprR/NprR-NprRB provoca cambios conformacionales en NprR a nivel de estructura terciaria en la región que corresponde al sitio de reconocimiento putativo para Spo0F.

De acuerdo a los resultados obtenidos, se propone que los trabajos para continuar con el proyecto de investigación se enfoquen en demostrar el modelo planteado para la regulación de las funciones de NprR. A continuación se hace una descripción de las recomendaciones propuestas:

1. El análisis *in silico* indica que NprR carece del residuo glutamina catalítico que en proteínas Rap lleva a cabo el ataque electrofílico del grupo fosfato para defosforilar a Spo0F~P. Sin embargo, se debe demostrar si NprR presenta o no actividad de fosfatasa. Es necesario fosforilar a Spo0F para generar Spo0F~P y evaluar si este es defosforilada por NprR o por el complejo NprR-NprRB.

2. Para demostrar si NprR compite con las proteínas Rap por el sitio de reconocimiento en Spo0F/Spo0F~P, se requiere sobreexpresar alguna Rap de Bt homóloga a RapH de *B. subtilis* y realizar experimentos de competencia *in vitro* por calorimetría de titulación isotérmica.

3. Corroborar *in vitro* el mecanismo molecular de acción propuesto para las funciones del receptor NprR mediante resonancia de superficie de plasmones y explicar el orden secuencial de las interacciones moleculares entre NprRB, el ADN o Spo0F. Además, con estos experimentos se puede demostrar si la unión de una especie a NprR desplaza la interacción de otra, por ejemplo: la unión de NprRB al complejo NprR-Spo0F provoca una disociación de Spo0F y se favorece la formación de NprR-NprRB, y si este complejo se une preferentemente al ADN.
4. Demostrar *in vivo* las funciones de NprR: interacción con el ADN y con Spo0F. Para lo cual se plantean dos experimentos. Primero, generar anticuerpos anti-Spo0F y anti-NprR para realizar experimentos de *pulldown* e inmunodetectar el complejo de Spo0F con NprR o NprR-NprRB en cultivos de Bt a diferentes tiempos, en los cuales ambas especies estén presentes. Segundo, realizar experimentos de inmunoprecipitación de cromatina en los mismos tiempos indicados anteriormente para detectar el complejo ternario NprR-NprRB-ADN. Adicionalmente, este experimento permitirá analizar y secuenciar el sitio o sitios de reconocimiento de NprR en el ADN (caja NprR). De esta manera se puede conocer en qué estado fisiológico de Bt, NprR se une a reguladores de respuesta del *phosphorelay* u otros, y cuando regula la expresión de genes.
5. Para evaluar el efecto de la concentración del péptido de señalización sobre las funciones de NprR se propone construir un mini-gen que contenga la región codificadora de SKPDIVG y SSKPDIVG en un plásmido bajo un promotor inducible. Transformar con este mini-gen la cepa mutante en la que se eliminó el gen *nprRB* (BtNprR Δ nprRB), y evaluar los fenotipos de esporulación o transcripción de *spoIIA* y *spoIIIG*, así como actividad de proteasa.
6. Para explicar los cambios conformacionales ocurridos en NprR por la unión de NprRB, el ADN y Spo0F, y explicar estructuralmente el mecanismo molecular de acción de este sistema, es necesario obtener las estructuras tridimensionales de la apo-proteína y de los diferentes complejos que forma con sus ligandos (NprR-NprRB, NprR-NprRB-ADN, y NprR-Spo0F) mediante difracción de rayos-X o por crio-microscopía de fuerza atómica.

REFERENCIAS

1. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of Bacteriology* 176(2):269-275
2. Dunny GM, Leonard BA (1997) Cell-cell communication in gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology* 51:527-564
3. Lazazzera BA (2001) The intracellular function of extracellular signaling peptide. *Peptides* 22:1519-1527
4. Miller MB, Bassler BL (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55:165-199
5. Declerck N, Bouillaut L, Chaix D, Rugani N, Slamti L, Hoh F, Lereclus D, Arold ST (2007) Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 104:18490-18495
6. Pottathil M, Lazazzera BA (2003) The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Bioscience* 8:32-45
7. Gominet M, Slamti L, Gilois N, Rose M, Lereclus D (2001) Oligopeptide permease is required for expression of the *Bacillus thuringiensis plcR* regulon and for virulence. *Molecular Microbiology* 40(4):963-975
8. Thoendel M, Horwill AR (2010) Biosynthesis of peptide signals in Gram-positive bacteria. *Advances in Applied Microbiology* 71:91-112
9. D'Andrea LD, Regan L (2003) TPR proteins: the versatile helix. *Trends in Biochemical Sciences* 28:655-662

10. Perchat S, Dubois T, Zouhir S, Gominet M, Poncet S, Lemy C, Aumont-Nicaise M, Deutscher J, Gohar M, Nessler S, Lereclus D (2011) A cell-cell communication system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Molecular Microbiology* 82:619-633
11. Agaisse H, Gominet M, Okstad OA, Kolsto AB, Lereclus D (1999) PlcR is a pleiotropic regulator of extracellular virulence factor gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Molecular Microbiology* 32:1043-1053.
12. Parashar V, Mirouze N, Dudnau DA, Neiditch MB (2001) Structural basis of response regulator dephosphorylation by Rap phosphatases. *PloS Biology* 9(2):e1000589. doi:10.1371/journal.pbio.1000589
13. Kearns DB, Chu F, Branda SS, Kolter R, Losick R (2005) A master regulator for biofilms formation by *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 55(3):739-749
14. Schultz D, Wolynes PG, Ben Jacob E, Onuchic JN (2009) Deciding fate in adverse times: sporulation and competence in *Bacillus subtilis*. *Proceeding of the National Academy of Sciences USA* 106(60):21027-21034
15. Bongiorno C, Stoessel R, Shoemaker D, Perego M (2006) Rap phosphatase of virulence plasmid pXO1 inhibits *Bacillus anthracis* sporulation. *Journal of Bacteriology* 487-497
16. Jiang M, Shao W, Perego M, Hoch JA (2000) Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 38(3):535-542
17. Hoch JA (1993) Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annual Review of Microbiology* 47:441-465.
18. Molle V, Fujita M, Jensen ST, Eichenberger P, González-Pastor JE, Liu JS, Losick R (2003) The Spo0F regulon of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 50(5):1683-1701
19. Ogura M, Shimane K, Asai K, Ogasawara N, Tanaka T (2003) Binding of response regulator DegU to the aprE promoter is inhibited by RapG, which is counteracted by extracellular PhrG in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 49:1685-1697. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03665.x

20. Bongiorno C, Ishikawa S, Stephenson S, Ogasawara N, Perego M (2005) Synergistic regulation of competence development in *Bacillus subtilis* by two Rap-Phr systems. *Journal of Bacteriology* 187:4353-4361. doi:10.1128/JB.187.13.4353-4361.2005
21. Smits WK, Bongiorno C, Veening JW, Hamoen LW, Kuipers OP, Perego M (2007) Temporal separation of distinct differentiation pathways by a dual specificity Rap-Phr system in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 65(1):103-120
22. Kozłowicz BK, Shi K, Gu Z, Ohlendorf DH, C.A. E, Dunny GM (2006) Molecular basis for control of conjugation by bacterial pheromone and inhibitor peptides. *Molecular Microbiology* 62:958-969.
23. Bae T, Kozłowicz BK, Dunny GM (2004) Characterization of *cis*-acting *prgQ* mutants: evidence for two distinct repression mechanisms by Qa RNA and PrgX protein in pheromone-inducible enterococcal plasmid pCF10. *Molecular Microbiology* 51(1):271-281
24. Nikayama J, Ruhfel RE, Dunny GM, Isogai A, Suzuki A (1994) The *prgQ* gene of the *Enterococcus faecalis* tetracycline resistance plasmid pCF10 encoded a peptide inhibitor, iCF10. *Journal of Bacteriology* 176(23):7405-7408
25. Shi K, Brown CK, Gu ZY, Kozłowicz BK, Dunny GM, Ohlendorf DH, Earhart CA (2005) Structure of peptide sex pheromone receptor PrgX and PrgX/pheromone complexes and regulation of conjugation in *Enterococcus faecalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102(51):18596-18601
26. Bae T, Dunny GM (2001) Dominant-negative mutants of *prgX*: evidence for a role for PrgX dimerization in negative regulation of pheromone-inducible conjugation. *Molecular Microbiology* 39(5):1307-1320.
27. Grenha R, Salmti L, Nicaise M, Refes Y, Lereclus D, Nessler S (2013) Structural basis for the activation mechanism of the PlcR virulence regulator by the quorum-sensing signal peptide PapR. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 110(3):1047-1052
28. Salmti L, Lereclus D (2002) A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *The EMBO Journal* 21(17):4550-4559

29. Gohar M, Faegri K, Perchat S, Ravnum S, Økstad OA, Gominet M, Kolstø AB, Lereclus D (2008) The PlcR Virulence Regulon of *Bacillus cereus*. PLoS ONE 3(7): e2793. doi:10.1371/journal.pone.0002793
30. Slamti L, Lereclus D (2005) Specificity and polymorphism of the PlcR-PapR quorum-sensing system in the *Bacillus cereus* group. Journal of Bacteriology 187(3):1182-1187
31. Uehara H, Yoneda Y, Yamane K, Maruo B (1994) Regulation of neutral protease productivity in *Bacillus subtilis*: transformation of high protease productivity. Journal of Bacteriology 119(1):82-91
32. Uehara H, Yamane K, Maruo B (1979) Thermosensitive, extracellular neutral protease in *Bacillus subtilis*: isolation, characterization, and genetics. Journal of Bacteriology 139(2):583-590
33. Nishiya Y, Imanaka T (1990) Cloning and nucleotide sequences of *Bacillus stearothermophilus* neutral protease gene and its transcriptional activator gene. Journal of Bacteriology 172(9):4861-4869
34. Aceves-Diez AE, Robles-Burgueño R, de la Torre M (2007) SKPDT is a signaling peptide that stimulates sporulation and cry1Aa expression in *Bacillus thuringiensis* but not in *Bacillus subtilis*. Applied Microbiology and Biotechnology 76:203-209
35. Dubois T, Faegri K, Perchat S, Lemy C, Buisson C, Nielsen-LeRoux H, Jacques P, Ramarao N, Kolsto AB, Lereclus D (2012) Necrotrophism is a quorum-sensing-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. PLoS Pathogens 8(4):e1002629. doi:10.1371/journal.ppat.1002629
36. Yang H, Sikavi C, Tran K, McGillivray SM, Nizet V, Yung M, Chang A, Miller JH (2011) Papillation in *Bacillus anthracis* colonies: a tool from finding new mutators. Molecular Microbiology 79:1276-1293
37. Schnepf EI, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62(3):775-806
38. Rocha J, Flores V, Cabrera R, Soto-Guzmán A, Granados G, Juaristi E, Guarneros G, De la Torre M (2012) Evolution and some functions of the NprR-NprRB quorum

- sensing system in the *Bacillus cereus* group. *Applied Microbiology and Biotechnology* 94:1096-1078.
39. Boehr DD, Nussinov R, Wright PE (2009) The role of dynamic conformational ensembles in biomolecular recognition. *Nature Chemical Biology* 5:789-796.
 40. Veening JW, Hamoen LW, Kuipers OP (2005) Phosphatases modulate the bistable sporulation gene expression pattern in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 56(6):1481-1494
 41. Baker MD, Neiditch MB (2011) Structural Basis of Response Regulator Inhibition by a Bacterial Anti-Activator Protein. *PLoS Biology* 9:e1001226

CAPÍTULO I

Over-expression at high cell density of the quorum sensing receptor NprR as a functional protein in *Escherichia coli*

Rosina Cabrera, Guadalupe Yapur, Elvira Ríos Leal, Adela Rodríguez-Romero, Mayra de la Torre

Artículo enviado a la revista Microbial Cell Factories

RESUMEN

El interés por el estudio de las interacciones entre macromoléculas ha aumentado recientemente debido a que este aspecto representa las bases de todos los procesos biológicos en los organismos vivos. En quorum sensing, un conjunto de mecanismos moleculares son utilizados por las bacterias para regular la expresión génica en respuesta a la densidad celular. En bacterias del grupo de *Bacillus cereus*, el receptor NprR es una proteína bifuncional de particular interés porque puede unirse al ADN y también al regulador de respuesta Spo0F. Para estudiar el mecanismo molecular de NprR es esencial la producción de esta proteína recombinante soluble, estable y funcional. La proteína NprR heteróloga formó cuerpos de inclusión en *E. coli* y la co-expresión de las chaperonas DnaK-DnaJ-GrpE/GroEL-GroES permitió obtener a la proteína soluble. El diseño de un cultivo en lote alimentado suplementado con glicerol y un perfil de alimentación constante, mantener una tensión de oxígeno disuelto de $52 \pm 10\%$ e inducir primero las chaperonas y posteriormente NprR, permitió alcanzar una alta densidad celular ($53.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) sin acumulación de acetato. La producción de NprR obtenida en el cultivo en lote alimentado fue 26 veces mayor que la producida en el cultivo en lote y el rendimiento por gramo de célula incrementó 12.5 veces. El péptido de señalización SSKPDIVG se unió a NprR y el complejo NprR-SSKPDIVG interactuó con el ADN, comprobándose de esta manera que la proteína recombinante producida fue funcional.

1 **Title:**

2 Over-expression at high cell density of the quorum sensing sensor NprR in *Escherichia*
3 *coli* as a functional protein

4
5 **Authors:**

6 Rosina Cabrera¹, Guadalupe Yapur¹, Elvira Ríos Leal², Adela Rodríguez-Romero³,
7 Mayra de la Torre^{1*}

8
9 **Affiliation:**

10
11 ¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., Km 0.6 Carretera a La
12 Victoria, 83304 Hermosillo, Sonora, México.

13
14 ²Departamento de Biotecnología y Bioingeniería. Centro de Investigación y de Estudios
15 Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508
16 Col. San Pedro Zacatenco, 07000 México, Distrito Federal, México.

17
18 ³Instituto de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. Circuito exterior,
19 Ciudad Universitaria, 04510 México, Distrito Federal, México.

20
21 *Corresponding author

22 Email: mdelatorre@ciad.mx

23 Telephone: +52 (662) 2892400 ext 384

24
25 Email addresses:

26 RC: cabrera.rosina@gmail.com

27 GY: gpe.yapur@gmail.com

28 ERL: erios@cinvestav.mx

29 ARR: adela@unam.mx

30 MT: mdelatorre@ciad.mx

31

32 **Abstract**

33

34 **Background**

35 Interest for studying interactions between biological macromolecules has risen since
36 these are at the basis of all processes in living organisms. In quorum sensing, a
37 collection of molecular mechanisms are used by bacteria to regulate gene expression in
38 response to cell density. In bacteria from the *Bacillus cereus* group the bifunctional
39 receptor NprR is particularly interesting since it binds to DNA but also to the response
40 regulator Spo0F from the sporulation phosphorelay. The production of this recombinant
41 protein as a soluble, stable and functional sensor in high quantities is essential in order to
42 study both molecular mechanisms. Co-expression of chaperones, culture medium and
43 process conditions were the key to overcome this challenge.

44

45 **Results**

46 Heterologous NprR formed inclusion bodies in *E. coli* but when it was co-expressed
47 with chaperones DnaK-DnaJ-GrpE/GroEL-GroES, it was soluble. The signaling peptide
48 SSKPDIVG bound to the recombinant NprR and the complex interacted with DNA, thus
49 the recombinant NprR was functional. Fed batch culture with a glycerol constant feeding
50 rate, dissolved oxygen tension of $52\pm 10\%$, and inducing the chaperones first and later
51 *nprR* allowed a high cell density of $53.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ without accumulation of acetate. NprR
52 concentration in fed-batch culture was 26 times higher than in batch culture and the
53 yield per gram of cell increased 12.5 times.

54

55 **Conclusion**

56 The co-expressed chaperones assisted the fold of NprR and the resulting soluble protein
57 was functional. Fed batch culture with a constant feeding rate and under no limiting
58 oxygen conditions allowed higher yields of pure NprR than batch operation.

59

60 **Keywords:** Recombinant-functional protein, protein folding, molecular chaperones,
61 NprR, high cell density culture

62

63 **Background**

64

65 Interest for studying interactions between biological macromolecules has risen since
66 these tightly regulated interactions are at the basis of all processes in living organisms.
67 Particularly the research in signal transduction systems in bacterial populations has
68 opened a lot of questions since various subpopulations in different stages co-exist and
69 the regulation depends partly on quorum sensing (QS) i.e. the regulation of gene
70 expression in response to cell density. In QS, diffusible molecules produced by the
71 bacteria accumulate in the environment and when they reach a threshold concentration,
72 serve as signals for cognate membrane-bound or intracellular receptor proteins.
73 Bioluminescence, virulence, biofilm development, conjugation, and sporulation are
74 bacterial processes regulated by this mechanism [1-3]. In order to study the molecular
75 mechanism of quorum sensing systems and biophysical aspects of the interacting
76 molecules involved, the receptor-proteins need to be overproduced as functional
77 proteins.

78

79 In Gram positive bacteria the family of QS proteins named RNPP
80 (**Rap/NprR/PlcR/PrgX**) has been recently studied. This family includes intracellular
81 soluble-receptors activated by specific cognate signaling peptides when cultures reach
82 high cell density [4]. The receptors PlcR and PrgX are transcriptional regulators [4,5]
83 while the Rap proteins regulate the sporulation phosphorelay through protein-protein
84 interactions [6]. Noteworthy, NprR seems to be an evolutionary step between Rap and
85 PlcR and PrgX, since it resembles the structure of Rap but functions as a transcriptional
86 regulator [6]. Very recently our group reported that NprR is able to bind the response
87 regulator Spo0F to regulate the sporulation initiation in *Bacillus thuringiensis* (Bt) [7].
88 Mutants lacking the gene *nprR* lost the wild type sporulation phenotype but it was
89 restored through complementation with an *nprR*(Δ HTH) gene that encodes an NprR
90 protein lacking the DNA binding domain [7]. The NprR seems to have two different
91 molecular mechanism and in order to study them high quantities of the functional
92 protein are needed. However, previous studies showed that overexpression of NprR in *E.*
93 *coli* results in an unstable protein. Perchat et al. [8] found that the NprR recombinant

94 protein precipitated when protein-peptide experiment were performed, thus these authors
95 produced a recombinant NprR protein lacking the helix-turn-helix domain (HTH) to
96 study the function of it receptor [9], but since the DNA domain is located in the N-
97 terminal the protein folding may be affected. Thus overproduction a high yield
98 production of a stable, soluble and functional NprR protein in *Escherichia coli* is a
99 challenge. The selection of the proper vector together with the use of codon-optimized
100 genes is, in many instances, sufficient to enable the accumulation of the target protein at
101 an appreciable level [10]. This optimization strategy, however, does not address
102 problems related to protein misfolding and solubility, and production of recombinant
103 proteins in *E. coli* often results in their rapid degradation or aggregation because of their
104 inability to form native or correct tertiary structures. Fusions of the protein of interest
105 with partners, such as the maltose-binding protein (MBP) or glutathione-S-transferase
106 (GST) [11], as well as co-expression of chaperones proteins that can assist in folding are
107 used routinely to increase soluble protein yields [12]. These strategies together with a
108 high cell density culture and avoid a metabolic-overflow between glucose or glycerol
109 uptake rate and the maximum respiration rate [13] could allow the production of high
110 quantities of functional NprR.

111

112 Here we demonstrated that co-expression of chaperones and NprR from Bt in *E. coli*
113 allowed the production of soluble, property folded and functional protein. In fed batch
114 culture at high cell densities under non-limited dissolved oxygen and a constant feeding
115 rate, a higher specific yield of the soluble quorum sensor ($2.76 \text{ mg}_{\text{NprR protein}} \cdot \text{g}_{\text{cell}}^{-1}$), as
116 well as a higher volumetric yield were obtained compare to the batch culture.

117

118 **Results**

119

120 NprR recombinant protein is soluble when it is co-expressed with DnaK-DnaJ-GrpE and
121 GroEL-GroES in *Escherichia coli*. Analysis of SDS-PAGE of the *E. coli* BL21 (DE3)
122 [pET11a Ω nprR] protein extract showed a band of 51 kDa in the insoluble fraction
123 corresponding to NprR. As this band is not present in the soluble fraction, we concluded
124 that it formed inclusions bodies, probably due to misfolding (Figure 1A).

125 As a strategy to improve NprR folding, chaperones *dnaK-dnaJ-grpE* and *groEL-groES*
126 were co-expressed with *nprR* in *E. coli* BL21 (DE3) [pGKJE6-pET11a Ω *nprR*]. In this
127 strain NprR was found in the soluble fraction (Figure 1B), which suggest that
128 chaperones were able to assist the folding of NprR and that the protein may have
129 acquired its functional conformation, since it was soluble just as it is in Bt. Thus for
130 further experiments chaperones and *nprR* were co-expressed.

131

132 NprR recombinant protein was purified and the final purification step yielded a single
133 band at 51 kDa (Figure 1C). Mass spectrometry (MALDI-TOF) was used to confirm the
134 purity of NprR, a monomeric protein of 51.19 kDa was observed as well as oligomers
135 (dimer and trimer, MH₂⁺⁺ and MH₃⁺⁺⁺ ions respectively) (Figure 1D). The identity of
136 NprR was corroborated by liquid chromatography–mass/mass spectrometry (LC-
137 MS/MS) (data not shown).

138

139 Effect of dissolved oxygen tension on growth of BL21 (DE3) [pGKJE6-pET11a Ω *nprR*]
140 strain in batch cultivation

141

142 To assess the influence of the dissolved oxygen tension (DOT) on the growth of *E. coli*
143 BL21 (DE3) [pGKJE6-pET11a Ω *nprR*] in different batch cultures DOT was kept at least
144 at 17±1% (oxygen limitations) and 58±4% (no-oxygen limitations). In order to maintain
145 the minimal DOT at 17±1%, aeration rate was 2.5 vvm and agitation rate was 300 rpm.
146 Growth data corresponding to 17±1% were adjusted to the logistic model (Figure 2A),
147 although the regression coefficient (r^2) was 0.979, a linear phase of growth after 5h at
148 DOT was clearly observed. Therefore the data were adjusted to an exponential growth
149 phase followed by a linear phase (Figure 2B and Table 1). Acetate accumulated up to
150 0.95 g·L⁻¹ (Table 2).

151

152 To keep the DOT at 58±4%, agitation rate was increased from 600 rpm to 1000 rpm,
153 with 2.5 vvm of air. After 5 h, air was switched to an oxygen flow of 0.1 L·min⁻¹. Under
154 this conditions the cell growth was exponential and the logistic model adjusted quite
155 well to the exponential data ($r^2=0.998$ and $r^2=0.989$, respectively) (Table 1). X_M was 6

156 times fold higher for DOT of 58±4% and the μ was 0.51 h⁻¹ for DOT of 17±1% and 0.78
157 h⁻¹ for 58±4% (Table 1).

158

159 Since our aim was to reach a high biomass concentration for further experiments DOT
160 was kept at least on 58±4%.

161

162 Production of recombinant NprR in batch and fed-batch cultures

163

164 BL21 (DE3) [pGKJE6-pET11a Ω *nprR*] strain was grown in batch culture keeping a
165 minimal DOT of 58±4%. Chaperones were induced at 5 h and the expression of *nprR*
166 was induced at 6 h. Then the cells were incubated for 4 h. Time course is shown in
167 Figure 3, all growth was exponential and the growth kinetics was well represented by the
168 logistic model. At the end of batch culture 5.68 mg of pure NprR per L of culture were
169 obtained, which corresponds to a yield of 0.22 mg_{NprR protein}·g⁻¹_{cell} (Table 2).

170

171 To obtain a high cell density culture, the same strain used in batch culture was grown in
172 fed-batch culture with constant feeding rate of 50 mL·h⁻¹ of the medium with glycerol,
173 yeast extract and tryptone from 7 to 15 hours. Since the beginning of the exponential
174 growth phase of the culture pure oxygen was supplied at 0.1 vvm and it was step-
175 increased up to 0.35 vvm. Cell concentration was 34.5 g·L⁻¹ when the molecular
176 chaperones DnaK-DnaJ-GrpE/GroEL-GroES were induced (11 h), an hour later ($X=38.9$
177 g·L⁻¹) *nprR* was induced. Four hours after the culture was stopped. Bacterial growth was
178 linear during the feeding phase and the cell kept growing at the same rate (5.02 g_{cell}·h⁻¹)
179 after induction of chaperones and *nprR* genes, the final cell concentration was 53.5 g·L⁻¹
180 (Figure 4), this is 2-fold times of that batch culture (Table 1). During the batch culture
181 stage the bacteria barely consumed glycerol (Figure 4), the biomass yield was 5.05
182 g_{cell}·g⁻¹_{glycerol} suggesting that the cell consumed also amino acids from tryptone and yeast
183 extract. During the feeding stage the glycerol consumption increased and the yield was
184 2.75 g_{cell}·g⁻¹_{glycerol} (Table 2), but it was not exhausted. Acetate concentration was very
185 low during all the culture (0.03 g·L⁻¹±0.009) (Table 2).

186

187 As expected the μ of the batch culture at $58\pm 4\%$ and that of the batch stage of the fed
188 batch culture were similar and after feeding the growth was linear with a growth rate of
189 $5.02 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$. This rate was higher than that of the batch culture with DOT $17\pm 1\%$
190 (Table 1). In the fed batch culture X_M was twice compare to batch culture. $Y_{X/S}$ were
191 similar for the batch stage of fed batch mode and batch mode at $58\pm 4\%$. At the end of
192 batch culture 147.5 mg of pure NprR per liter of culture were obtained, which
193 corresponds to a yield of $2.76 \text{ mg}_{\text{NprR}}\cdot\text{g}^{-1}_{\text{cell}}$ (Table 2). The fed-batch culture under the
194 operating conditions established increase the yield of soluble and folded NprR protein
195 per gram of cell was 12.5-times with respect to batch culture.

196

197 Estimation of secondary structure from a circular dichroism spectrum and functionality
198 of NprR recombinant protein

199

200 The secondary structure of NprR was estimated using far-UV circular dichroism (CD).
201 The spectra display a maximum molar ellipticity at 190 nm and two minimums at 210
202 nm and 221 nm, which is characteristic of a helix alpha spectrum (Figure 5A). The
203 analysis in CDSSTR algorithms available in DichroWeb indicated alpha helix as major
204 secondary structure elements with 67%.

205

206 Perchat et al. [8] reported that NprR is a receptor that activates the transcription of the
207 extracellular protease gene *nprA* and identified the minimal region necessary for full
208 activation in *nprA* promoter. Previously was reported that the NprR binds the octa-
209 peptide SSKPDIVG, which was proposed as mature form of the signaling peptide
210 known as NprRB [7]. To prove the functionality of our recombinant protein we
211 performed an experiment of interaction between the complex NprR-NprRB and a DNA
212 fragment containing the minimal region of the *nprA* promoter by intrinsic tryptophan
213 fluorescence. As shown in Figure 5B, the presence of DNA caused a decreased in
214 fluorescence intensity of the complex NprR-NprRB emitted at 355 nm, while no changes
215 were observed when the DNA and NprR were mixed (data no shown). This indicates
216 that only the NprR-NprRB complex could bind the DNA fragment *in vitro*.

217

218 **Discussion**

219

220 Hydrophobicity is a prime determinant of the structure and function of proteins. It is the
221 driving force behind the folding of soluble proteins and when exposed on the surface, it
222 is frequently involved in recognition and binding of ligands and other proteins. NprR has
223 large hydrophobic residues on its surface (PDB ID 4GPK), such as Leu, Arg, Phe and
224 Tyr. Non-productive aggregation of proteins is mediated by exposed hydrophobic
225 residues and unstructured chain segments; therefore NprR may form aggregates when
226 expressed in *E. coli* as our results show (Figure 1A). Molecular chaperones assist the
227 folding of polypeptides, which prevents their aggregation and in some cases, actively
228 helps them to fold through cycles of binding and release [12,13]. The culture conditions
229 used in this work (e.g. medium, temperature, aeration, timing of induction of chaperones
230 and *nprR*, inducer concentration and induction period allowed expression of all the
231 chaperones encoded in pGKJE6, predominantly DnaK, GroEL and DnaJ (Figure 1B).
232 DnaK is an active chaperone that assists the folding of the nascent polypeptide chains
233 and also the folding of newly synthesized polypeptide together with GroEL, thus the
234 overproduction of both chaperones could be a key factor for correct fold of NprR.

235

236 Circular dichroism analysis showed that the recombinant NprR contained secondary
237 structure elements (Figure 5A) being α -helix the major elements (67%). Indeed α -helix
238 is the secondary structure element characteristic of the RNPP family of QS protein
239 receptors (RapH PDB ID 4I9E, RapI PDB ID 4I1A, PlcR PDB ID 4FSC, PrgX PDB ID
240 2AXU). Furthermore, to assess the correct folding of the protein we demonstrated that
241 the NprR-NprRB complex bound to the fragment of *nprR* promoter, therefore
242 concluding that the recombinant protein is functional *in vitro*. In other studies, the
243 GroEL-GroES operon was co-expressed with *plcR* to produce the pleiotropic
244 transcriptional receptor PlcR from *B. cereus* in *E. coli* BL21 (DE3) [14] the complex
245 PlcR-PapR bound to DNA and therefore the QS sensor PlcR was functional as in this
246 work NprR was.

247

248 Sandoval-Basurto et al. [15] studied the effect of DOT gradients on the metabolic
249 response of *E. coli* and production of recombinant pre-proinsulin, they found that even
250 very short exposures to anaerobic conditions can substantially reduce recombinant
251 protein productivity. DOT gradients can be particularly detrimental to *E. coli*, as
252 exposure to transient anaerobic conditions, of even a few seconds are sufficient to
253 induce genes of anaerobic pathways [16], divert essential carbon skeletons to
254 undesirable by-products (acetate and formate) and decreased biomass yield. Therefore
255 our approach was to test the effect on growth of limiting and no-limiting DOT on cell
256 growth. Our results agreed with those of other authors since using the same culture
257 medium and reactor, the biomass production increased 6 fold at DOT of at least $58 \pm 4\%$
258 compare to $17 \pm 1\%$ and acetate was not accumulated, De León et al. [17] studied
259 the effect of DOT on production of recombinant penicillin acylase and found that acetate
260 and formate concentration decreased as DOT increased, similar results were reported for
261 productions of other recombinant proteins [15,18,19].

262

263 For production of the recombinant NprR the strategy was to start feeding at a constant
264 rate during the exponential growth phase, since previous works have indicated that an
265 enhancement of recombinant-proteins productivity is possible when feeding starts during
266 this phase [20]. This profile is the simplest feeding and the constant decrease in μ due to
267 linear growth [21] may result in higher yield of recombinant proteins. A complex
268 medium with glycerol, yeast extract and tryptone was fed. Glycerol unlike glucose leads
269 to lower toxic products formation due to lower uptake rate by the cells and has been
270 recommended for production of recombinant proteins [13,17,22,23,24]. As observed in
271 Figures 4A glycerol was not consumed at end of culture, the $Y_{X/S}$ in batch phase was
272 $5.02 \text{ g}_{\text{cell}} \cdot \text{g}_{\text{glycerol}}^{-1}$ and it decreased in feeding phase to $2.75 \text{ g}_{\text{cell}} \cdot \text{g}_{\text{glycerol}}^{-1}$ suggesting that
273 the cell also consumed amino acids from tryptone and yeast extract. These results
274 indicate that during the feeding phase the bacteria used more glycerol for biomass
275 synthesis than in the batch stage. The biomass yields on glycerol and the X_M obtained in
276 this work are higher than those reported by Sharma et al. [25] for *E. coli* cultured in a
277 similar culture mediums (glycerol and complex nitrogen sources), they obtained a yield

278 between 1-1.1 $\text{g}_{\text{cell}} \cdot \text{g}_{\text{glycerol}}^{-1}$ and 41.9 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ of biomass, but the biomass yield depends on
279 the constructed strain, X_M was also higher in our fed-batch mode (53.5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$).

280

281 Since acetate accumulation was negligible in the fed-batch mode (Table 2), the carbon
282 flow was directed mainly to biomass, chaperones and NprR synthesis. On the other hand
283 both NprR concentration and protein yield on biomass were higher in fed-batch mode
284 compare to batch, therefore we suggest that the constant decrease in μ during feeding
285 modified the cell metabolism since the biomass yield on glycerol was higher and favored
286 the recombinant protein production.

287

288 We were not able to find previous reports on production of recombinant QS proteins in
289 bioreactors either in batch or fed batch mode, these proteins have been produced in
290 shake flasks for research purposes. On the other hand, fed batch culture is widely
291 utilized for production of recombinant proteins in *E. coli* mainly for industrial purposes
292 and on Table 3 we compared our data with those found by other authors. The X_M
293 obtained in this work using a constant feeding profile is similar to those reported for
294 exponential feeding and not to that for step or constant feeding profiles. Nevertheless the
295 NprR recombinant protein production was low compared with the yield reported by
296 others proteins; the additional cellular energetic charge due to overexpression of
297 chaperones together NprR may account for this low concentration. Interestingly, the
298 process conditions were adequate for the cell to overcome the metabolic cost and stress
299 metabolic involved in the production of five-molecular chaperones (DnaK-DnaJ-
300 GrpE/GroEL-GroES) and the NprR protein. Noteworthy, NprR concentration in batch
301 bioreactor (5.68 $\text{mg NprR} \cdot \text{L}^{-1}$) was 3.7 fold times higher than that of shake in flask (1.5
302 $\text{mg NprR} \cdot \text{L}^{-1}$) and the NprR concentration in fed-batch culture (147.5 $\text{mg NprR} \cdot \text{L}^{-1}$) was
303 26 times higher than in batch culture.

304

305 **Conclusion**

306

307 Here we have showed that the production of a functional-recombinant NprR in *E. coli*
308 strain BL21 (DE3)(pET11a Ω nprR) requires co-expression of chaperones DnaK-DnaJ-

309 GrpE and GroEL-GroES. Furthermore for overproduction of this quorum sensing
310 protein in fed batch-culture strain, codon optimization, medium composition, chaperones
311 co-expression, induction time and process conditions (non-oxygen limitation,
312 temperature, constant feeding rate profile, minimization of acetate production), were
313 important factors that ensured a high cell density culture and the production of a
314 functional NprR protein.

315

316 **Methods**

317

318 Plasmids and bacteria strain

319

320 The gene encoding NprR from *Bacillus thuringiensis* strain 8741 (Colección Nacional
321 de Cepas Microbianas y Cultivos Celulares, CINVESTAV, code CDBB-B-1531) [31]
322 was used to design a synthetic gene with six histidine (His) residues added to the N-
323 terminal (His₆-NprR). This gene was cloned into pET11a between the NdeI and BamHI
324 restriction sites (pET11aΩ*nprR*) and to transformed into *Escherichia coli* strain BL21
325 (DE3) (Invitrogen, Carlsbad, CA, US). The expression of His₆-NprR in this *E. coli* BL21
326 (DE3) [pET11aΩ*nprR*] was inducible by the addition of Isopropyl β-D-1-
327 thiogalactopyranoside (IPTG).

328

329 *E. coli* strain BL21 (DE3) [pET11aΩ*nprR*] was co-transformed with plasmid pGKJE6,
330 for expression of *dnaK-dnaJ-grpE* and *groEL-groES* molecular-chaperones gene. The
331 *dnaK-dnaJ-grpE* operon was under control of the *araB* promoter-operator (*araBp*) and
332 *groEL-groES* operon was under control of the Pzt-1, therefore the promoters were
333 inducible with L-arabinose and tetracycline, respectively [12]. *E. coli* strains BL21
334 (DE3) [pET11aΩ*nprR*] and *E. coli* BL21 (DE3) [pGKJE6-pET11aΩ*nprR*] were
335 maintained in 15% glycerol in 2 mL cryo-conservation tubes at -70°C.

336

337 Shake flask cultures

338

339 Fernbach flask with 1 liter of terrific broth were inoculated with 30 ml of pre-inoculum

340 and incubated at $30^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ and 200 rpm when BL21 (DE3) [pET11a Ω *nprR*] strain
341 culture reached $\text{DO}_{660\text{nm}}=0.4$, *nprR* was induced with 1 mM IPTG. When strain BL21
342 (DE3) [pGKJE6-pET11a Ω *nprR*] was used, chaperones were induced at inoculation with
343 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ L-arabinose and $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ tetracycline and when $\text{DO}_{660\text{nm}}=0.4$, *nprR* was
344 induced with 1 mM IPTG.

345

346 Batch and fed batch cultures

347

348 Culture throughout were performed in a 3 liters stirred tank bioreactor with a 1010 Bio
349 Controller (Applikon Biotechnology, Delft, The Netherlands) and an ADI 1025 Bio
350 Console (Applikon Biotechnology). Inoculation was made using 3% (v/v) of the culture
351 volume. Operation conditions were V_{op} of 1 liter, temperature (SLP) $30^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$, pH
352 controlled to 7.6 ± 2 with 4 M H_3PO_4 and 4 M NaOH, aeration rate of 2.5 vvm and
353 variable agitation rate as indicated in each experiment. Dissolved oxygen tension (DOT)
354 was measured using a polarographic oxygen probe AppliSens (Applikon
355 Biotechnology). Foaming was prevented by the addition of Antifoam A (Sigma Aldrich,
356 St. Louis, MO, US) as required.

357

358 Batch cultures were performed using the inoculum-medium plus $25.3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ glycerol. In
359 order to assess the effect of dissolved oxygen tension (DOT) on growth in different
360 experiments the minimal DOT was kept at least at $17\pm 1\%$ or $58\pm 4\%$, with respect to the
361 air saturation by increasing the agitation rate and, finally pure oxygen was supplied
362 instead of air, the switch from air to oxygen and oxygen flow is indicated in each
363 experiment. In the batch culture where the minimal DOT was $58\pm 4\%$, chaperones were
364 induced at 5 h with $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ L-arabinose and $5 \text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ tetracycline. One hour after
365 the expression of *nprR* was induced with 0.5 mM IPTG and the cells were incubated 4 h
366 more.

367

368 Fed-batch cultures started as a batch culture using the same culture medium, aeration
369 rate of 2.5 vvm and initial agitation rate of 1000 rpm, which was increased as needed. At
370 6 h oxygen was supplied instead of air at 0.1 vvm. A medium containing $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$

371 tryptone, 60 g·L⁻¹ yeast extract, 5.5 g·L⁻¹ KH₂PO₄, 23.5 g·L⁻¹ K₂HPO₄, 315 g·L⁻¹
372 ¹glycerol, ampicillin (100 µg·mL⁻¹) and chloramphenicol (25 µg·mL⁻¹) was fed. Feeding
373 started in the early exponential growth phase (7 h) at a rate of 50 mL·h⁻¹ for 8 hours.
374 DOT was kept at least at 52±10% by increasing the oxygen flow. The total volume-
375 increment was least that 10%. In the fed-batch culture the chaperones and *nprR* were
376 induced at 11 h and 12 h respectively using the same concentrations and inducers
377 utilized in the batch culture.

378

379 Analysis of protein aggregation

380

381 Samples of culture expressing the recombinant NprR were harvested, the cell-pellet was
382 resuspended in lysis buffer (100 mM NaH₂PO₄, 100 mM NaCl, 20 mM imidazole, 2 mM
383 Dithiothreitol, 10% glycerol, 1 mg·mL⁻¹ lysozyme, protease inhibitor cocktail and
384 phosphatase inhibitor cocktail, Sigma Aldrich), disrupted by sonication for 1.5 minute
385 on ice, and then the preparation was centrifuged (Q700 ultrasonic liquid processor,
386 Qsonica, LLC, Newtown, Connecticut, US) at 8500 x *g* for 50 min. Soluble and
387 insoluble fractions were recovered. The insoluble fraction was resuspended in lysis
388 buffer. Aliquots from extracts having equivalent protein content were analyzed by 10%
389 SDS-PAGE [32].

390

391 Purification of NprR

392

393 NprR was purified according to Cabrera et al. [7]. After cellular lysis, the supernatant
394 was loaded onto His-Trap FF (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and the protein
395 was eluted with a linear gradient of increasing imidazole concentration. The eluted
396 proteins were loaded onto a Mono-Q exchange (GE Healthcare) and eluted with a linear
397 increasing gradient of 1 M NaCl. Samples of each purification step were analyzed by
398 SDS-PAGE at 10% [32]. Protein purity was analyzed by mass spectrometry using a
399 Microflex LT MALDI-TOF spectrometer (Bruker Corporation, Billerica, Massachusetts,
400 US). Aliquots of pure NprR were stored in store buffer (20 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl
401 and 20% glycerol) at -20°C.

402 Circular dichroism spectral measurements (CD)

403

404 Circular dichroism was used to assess secondary structure and folding properties of
405 NprR. The far-UV spectrums (260-180 nm) were recorded with a 1mm path length on a
406 JASCO J-700 Spectropolarimeter (Jasco Inc. Mary's Ct Easton, MD, US) at 20 °C. For
407 the assay, 1.9 μM of protein in 10 mM sodium phosphate pH 8.0 were used. Each
408 spectrum was performed three times and secondary structure analysis was performed
409 using CDSSTR algorithms available in DichroWeb (dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/).

410

411 Functionality *in vitro* of NprR

412

413 The interaction between NprR or NprR-NprRB complex and a DNA fragment of 26 pb
414 from the *nprA* promoter of *B. thuringiensis* strain 407 [8] was measured by monitoring
415 the intrinsic tryptophan fluorescence change at 355 nm using a FLUOstar Omega Multi-
416 Mode Microplate Reader with CCD-based Spectrometer (BMG Labtech, Ortenberg,
417 Germany). The excitation wavelength was set to 290 nm. The NprR-NprRB complex
418 was formed using 24 μM SSKPDIVG (GenScript, Piscataway, NJ, US) and 10 μM of
419 NprR in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) and 100 mM NaCl buffer [7]. The different amounts
420 of DNA from 0 to 20 μM were added to the protein-peptide complex. The double strand
421 DNA fragment of 26 pb corresponding to the NprR binding site in the extracellular
422 protease gene (*nprA*) promoter was obtained by hybridizing the oligonucleotides BSF: 5'
423 ATTCTACAAAACCTTGAGAAAAAATT 3' and BSR: 5'
424 AATTTTTTCTCAAGTTTTGTAGAAT 3' using a concentration of 600 μM in 20
425 mM Tris-HCl (pH 8) and 100 mM NaCl buffer. For this two complementary strands
426 were mixed at equimolar concentrations, heated at 90°C for 5 min and then slowly
427 cooled at room temperature.

428

429 Analytical methods

430

431 Biomass concentration was determined from optical density reading at 600 nm (OD)
432 using a Beckman spectrophotometer (Beckman Coulter Inc., Pasadena, California, US)

433 data were converted to dry cell weight using a standard curve. One OD_{600nm} unit
434 corresponded to 0.9812 g·L⁻¹ of dry cell weight. Glycerol was determined from culture
435 supernatant by High-performance liquid chromatography (HPLC) on a Phenomenex
436 Rezex Organic Acid column of 300 × 70 mm (Phenomenex, Torrance, US) at 65 °C
437 using a Varian 9002 liquid chromatograph (Varian, Les Ulis, France). A 0.007 N H₂SO₄
438 solution at a constant flow of 0.4 mL·min⁻¹ was used as mobile phase and the analytes
439 were detected in a ProStar refractive index detector (Varian). Acetate was analyzed
440 either by HPLC as described for glycerol or by gas chromatography on a Zebtron ZB-
441 WAX Plus column of 30.0×0.53×1.0 mm (Phenomenex) using a gas chromatograph
442 Varian 3890 with a flame ionization detector (Varian) using Nitrogen as carrier gas at a
443 column flow rate of 0.6 psi. The initial column temperature was set at 80 °C for 5 min
444 and then temperature was increased 8 °C·min⁻¹ up to 120 °C, after temperature was
445 increased 20 °C·min⁻¹ up to 240 °C and held for 5 min. The samples were injected
446 directly and the quantification was performed by external standardization. Protein was
447 analyzed by Bradford method [33] using bovine serum albumin (Sigma Aldrich) as
448 standard.

449

450 Data analysis

451

452 Experimental growth data were adjusted to the logistic model of Verhulst-Pearl
453 (Equation 1) using the NCSS statistical software 2007 [34], to the exponential model
454 (Equation 2) or a linear model (Equation 3) using the GraphPad Prism software as
455 indicate in each experiment.

456
$$X(t) = \frac{X_M}{1 + \left(\frac{X_M}{X_0} - 1\right)e^{(-\mu_M t)}} \quad (1)$$

457
$$X(t) = X_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

458
$$X(t) = r_g + b \quad (3)$$

459

460 Where $X(t)$ is biomass (g·L⁻¹) at any time of fermentation (t), X_M is the maximal
461 biomass at end of fermentation, X_0 is initial biomass (g·L⁻¹), μ_M is maximum specific
462 growth rate (h⁻¹), r_g is the growth rate and b is y intercept.

463 **List of abbreviation**

464

465 QS: quorum sensing

466 r_g : Growth rate

467 $Y_{X/S}$: Biomass yield on glycerol ($g_{\text{cell}} \cdot g_{\text{glycerol}}^{-1}$)

468 $Y_{P/X}$: NprR yield on biomass ($mg_{\text{NprR}} \cdot g_{\text{cell}}^{-1}$)

469 $OD_{600\text{nm}}$: Optical density at 660 nm

470 V_{op} : Operation volume (liters)

471 SLP: Standard conditions of temperature and pressure

472 DOT: Dissolved oxygen tension in the liquid phase with respect to the air saturation (%)

473

474 **Competing Interest**

475

476 The author(s) declare that they have no competing interest.

477

478 **Authors' contributions**

479

480 RC, GY, ER carried out the experiments and participated drafting a document describing
481 the work at hand. MT, RC, GY designed the fed batch experiments. RC transformed the
482 strain. AR, RC designed the CD and fluorescence experiments. MT, RC, AR wrote the
483 manuscript.

484

485 **Acknowledgements**

486

487 The authors thank to Jorge Rocha for discussion and design of oligonucleotides, Ana
488 María Guzmán-Partida for the technical assistant in the purification of NprR. This work
489 was supported by CONACYT (Mexico) grant 180246 to MT. Fellowships from
490 CONACYT was given to RC and GY.

491

492

493

References

494

495

496

- 497 1. Bassler BL, Losick R: Bacterially speaking. *Cell* 2006, 125:237-246.
498 doi:10.1016/j.cell.2006.04.001
- 499 2. Rutherford ST, Bassler BL: Bacterial quorum sensing: its role in virulence and
500 possibilities for its control. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012, 2(11):1-25. doi:
501 10.1101/cshperspect.a012427
- 502 3. Waters CM, Bassler BL: Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria.
503 *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005, 21:319-349
- 504 4. Declerck N, Bouillaut L, Chaix D, Rugani N, Slamti L, Hoh F, Lereclus D, Arold ST:
505 Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing
506 in Gram-positive bacteria. *P Nat Acad Sci USA* 2007, 104:18490-18495
- 507 5. Kozlowicz BK, Shi K, Gu Z, Ohlendorf DH, C.A. E, Dunny GM: Molecular basis for
508 control of conjugation by bacterial pheromone and inhibitor peptides. *Mol Microbiol*
509 2006, 62:958-969.
- 510 6. Parashar V, Mirouze N, Dudnau DA, Neiditch MB: Structural basis of response
511 regulator dephosphorylation by Rap phosphatases. *PloS Biol* 2001, 9(2):e1000589.
512 doi:10.1371/journal.pbio.1000589
- 513 7. Cabrera R, Rocha J, Flores V, Vázquez-Moreno L, Guarneros G, Olmedo G,
514 Rodríguez-Romero A, de la Torre M: Regulation of sporulation initiation by NprR
515 and its signaling peptide NprRB: molecular recognition and conformational changes.
516 *Appl Microbiol Biotechnol* 2014, 98(22):9399-9412. doi: 10.1007/s00253-014-6094-
517 8.
- 518 8. Perchat S, Dubois T, Zouhir S, Gominet M, Poncet S, Lemy C, Aumont-Nicaise M,
519 Deutscher J, Gohar M, Nessler S, Lereclus D: A cell-cell communication system
520 regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus cereus*
521 group. *Mol Microbiol* 2011, 82:619-633. doi:10.1111/j.1365-2958.2011.07839.x
- 522 9. Zouhir S, Perchat S, Nicaise M, Perez J, Guimaraes B, Lereclus D, Nessler S:
523 Peptide-binding dependent conformational changes regulate the transcriptional

- 524 activity of the quorum-sensor NprR. *Nucleic Acids Res* 2013, 41:7920-7933.
525 doi:10.1093/nar/gkt546
- 526 10. Makino T, Skretas G, Georgiou G: Strain engineering for improved expression of
527 recombinant proteins in bacteria. *Microb Cell Fact* 2011, 10:32. doi:10.1186/1475-
528 2859-10-32
- 529 11. Terpe K: Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical
530 fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 2003, 60:523-533
- 531 12. Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, Yanagi H, Yura T: Chaperone
532 coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and
533 GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in
534 *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 1998, 64:1694-1699
- 535 13. González-Montalbán N, García-Fruitós E, Ventura S, Arís A, Villaverde A. The
536 chaperone DnaK controls the fractioning of functional protein between soluble and
537 insoluble cell fractions in inclusion body-forming cells. *Microb Cell Fact* 2006,
538 5(26):1-9. doi:10.1186/1475-2859-5-26
- 539 14. Slamti L, Lereclus D: A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence
540 regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J* 2002, 21(17)4550-4559
- 541 15. Sandoval-Basurto EA, Gosset G, Bolívar F, Ramírez OT: Culture of *Escherichia*
542 *coli* under dissolved oxygen gradients simulated in a two-compartment scale-down
543 system: metabolic response and production of recombinant protein. *Biotechnol*
544 *Bioeng* 2005, 89(4):453-463.
- 545 16. Schweder T, Krüger E, Xu B, Jürger B, Blomsten G, Enfors S-O, Hecker M:
546 Monitoring of gene that respond to process-related stress in large-scale bioprocess.
547 *Biotechnol Bioeng* 1999, 65:151-159
- 548 17. De León A, Hernández V, Galindo E, Ramírez OT: Effect of dissolved oxygen
549 tension on the production of recombinant penicillium acylase in *Escherichia coli*.
550 *Enzyme Microb Tech* 2003, 33:689-697
- 551 18. Losen M, Frölich B, Pohl M, Büchs J: Effect of oxygen limitation and medium
552 composition on *Escherichia coli* fermentation in shake-flask cultures. *Biotechnol*
553 *Prog* 2004, 20(4):1062-1068.

- 554 19. Castan A, Näsman A, Enfors S-O: Oxygen enriched air supply in *Escherichia coli*
555 processes: production of biomass and recombinant human growth hormone. *Enzyme*
556 *Microb Tech* 2001, 30:847-854
- 557 20. Aucoin MG, McMurray-Beaulieu V, Poulin F, Boivin EB, Chen J, Ardelean M,
558 Cloutier M, Choi YJ, Miguez CB, Jolicoeur N: Identifying conditions for inducible
559 protein production in *E. coli*: combining a fed-batch and multiple induction
560 approach. *Microb Cell Fact* 2006, 5:27. doi:10.1186/1475-2859-5-27
- 561 21. Nayak DP, Vyas VV: Improved Stability and Expression of a Recombinant Shuttle
562 Plasmid in *Escherichia coli* during Fedbatch Cultivation. *World J Microb Biot* 1999,
563 (15):65-71.
- 564 22. Li X, Robbins JW, Taylor KB: The production of recombinant beta-galactosidase in
565 *Escherichia coli* in yeast extract enriched medium. *J Ind Microbiol* 1990, 5:85-94
- 566 23. Korz DJ, Rinas U, Hellmuth K, Sanders EA, Deckwer WD: Simple fed-batch
567 technique for high density cultivation of *Escherichia coli*. *J Biotechnol* 1995, 39:59-
568 65
- 569 24. da Silva AJ, Luperni-Horta AC, Velez AM, C lemma MR, Sargo CR, Giordano
570 RLC, Novo MTM, Giordano RC, Zangirolami TC: Non-conventional induction
571 strategies for production of subunit swine erysipelas vaccine antigen in *rE. coli* fed-
572 batch cultures. *SpringerPlus* 2013, 2:322. doi:10.1186/2193-1801-2-322
- 573 25. Sharma AK1, Mahalik S, Ghosh C, Singh AB, Mukherjee KJ: Comparative
574 transcriptomic profile analysis of fed-batch cultures expressing different
575 recombinant proteins in *Escherichia coli*. *AMB Express* 2011,
576 1:33.doi:10.1186/2191-0855-1-33
- 577 26. Tsai LB, Mann M, Morris F, Rotgers C, Fenton D: The effect of organic nitrogen
578 and glucose on the production of recombinant human insulin-like growth factor in
579 high cell density *Escherichia coli* fermentation. *J Ind Microbiol* 1987, 2:181-187
- 580 27. Ruiz J, Fernández-Castané A, de Mas C, González G, López-Santín J: From
581 laboratory to pilot plant *E. coli* fed-batch culture: optimization the cellular. *Ind*
582 *Microbiol Biotechnol* 2013, 40(3-4):335-343.doi: 10.1007/s10295-012-1226-6
- 583 28. Yee L, Blanch HW: Recombinant trypsin production in high cell density fed-batch
584 cultures in *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 1993, 41(8):781-90

585 29. Hellmuth K, Korz DJ, Sanders EA, Deckwer WD: Effect of growth rate on stability
586 and gene expression of recombinant plasmids during continuous and high cell
587 density cultivation. *J Biotechnol* 1994, 32(3):289-98.

588 30. Goyal D, Sahni G, Sahoo DK: Enhanced production of recombinant streptokinase in
589 *Escherichia coli* using fed-batch culture. *Bioresour Technol* 2009, (19):4468-
590 4474.doi: 10.1016/j.biortech.2009.04.008

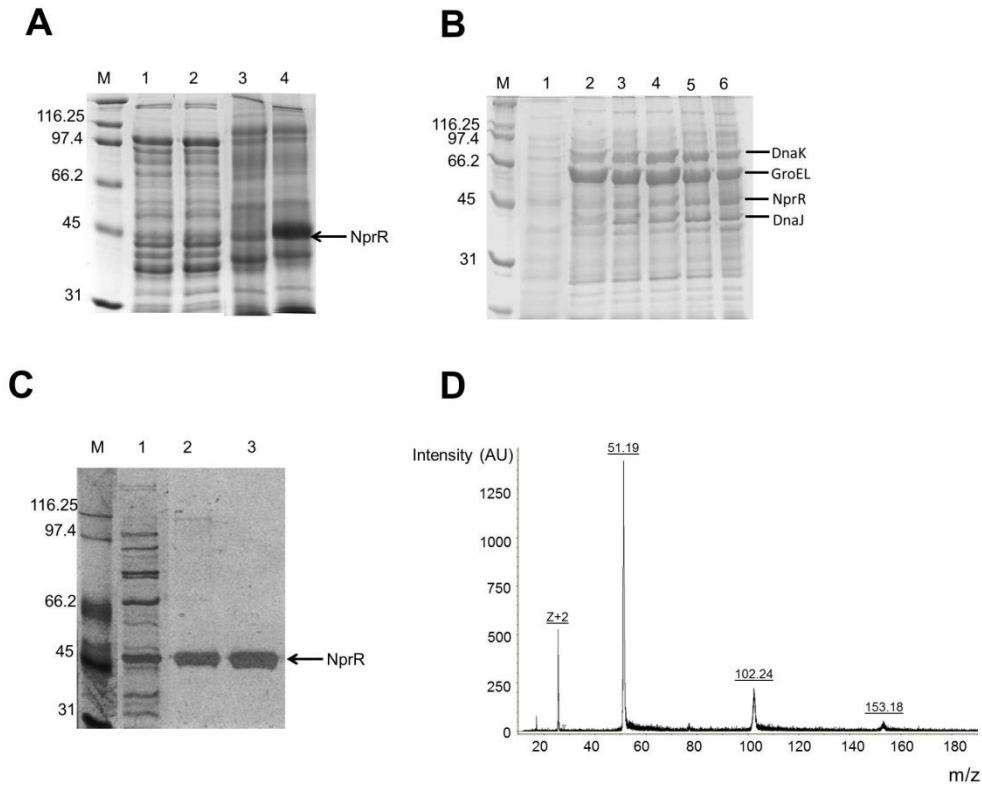
591 31. Rocha J, Flores V, Cabrera R, Soto-Guzmán A, Granados G, Juaristi E, Guarneros
592 G, De la Torre M: Evolution and some functions of the NprR-NprRB quorum
593 sensing system in the *Bacillus cereus* group. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012,
594 94:1096-1078. doi:10.1007/s00253-011-3775-4

595 32. Laemmli UK: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of
596 bacteriophage T4. *Nature* 1970, 227:680-685.doi:10.1038/227680a0

597 33. Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram
598 quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*
599 1976, 72:248-253

600 34. Hintze, J. 2006. NCSS, PASS, and GESS. NCSS. Keyesville, Utah. www.ncss.com
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615

616 Figure 1
617



618
619

620 Figure 1. Expression and purification of NprR recombinant protein (A) SDS-PAGE
621 showing the protein extract when NprR without chaperones. Lane M: molecular-weight
622 size marker (kDa), lane 1 and 2: soluble protein extract before and after the induction
623 with IPTG, lane 3 and 4: insoluble protein extract before and after the induction with
624 IPTG (B) SDS-PAGE of cell lysates from samples collected during an NprR kinetic co-
625 expression together DnaK-DnaJ-GrpE/GroEL-GroES. Lane M: molecular-weight size
626 marker (kDa), lane 1: protein extract before NprR and molecular co-expression, lane 2:
627 protein extract after molecular chaperones expression with L-arabinose and tetracycline,
628 lane 3 to 6: protein extract after NprR induction with IPTG (1, 4, 8 and 24 h of
629 induction, respectively) (C) SDS-PAGE showing the protein extract and purification
630 when NprR was co-expressed together DnaK-DnaJ-GrpE/GroEL-GroES. Lane M:
631 molecular-weight size marker (kDa), lane 1: soluble protein extract after induction with

632 IPTG, lane 2: elute protein in the affinity chromatographic (nickel), lane 3: pure protein
633 after anion exchange chromatographic (D) Chromatogram of mass spectrometry
634 (MALDI-TOF)

635

636

637

638

639

640

641

642

643

644

645

646

647

648

649

650

651

652

653

654

655

656

657

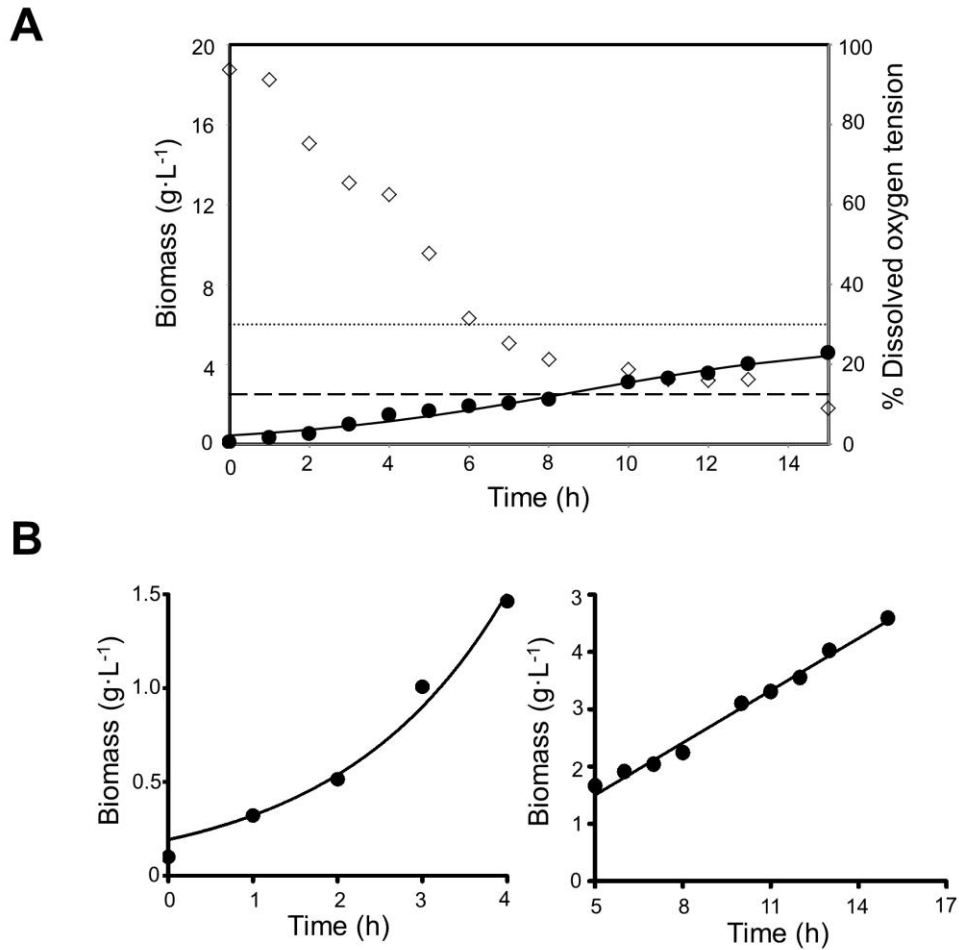
658

659

660

661

662



664

665 Figure 2. Batch culture of BL21 (DE3) [pGKJE6-pET11aΩnprR] strain maintained a
 666 minimal dissolved oxygen tension of 17±1% (A) Operation conditions from cellular
 667 growth and biomass concentration. DOT (%) is represented in open diamonds, aeration
 668 (vvm) in dotted line and agitation (rpm) in dashes (B) Adjustment of biomass
 669 experimental data at exponential model (left) and lineal model (right), the r^2 were 0.9816
 670 and 0.9860 respectively

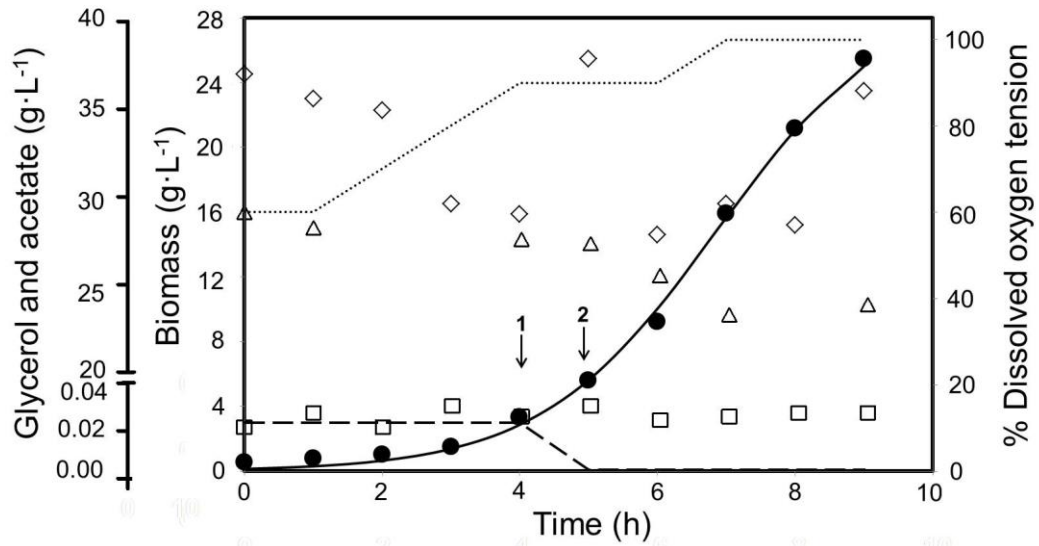
671

672

673

674 Figure 3

675



676

677

678 Figure 3. Batch culture of BL21 (DE3) [pGKJE6-pET11aΩ*nprR*] strain with a minimal
679 dissolved oxygen tension of 58±4%. Operation conditions from cellular growth and
680 biomass concentration: DOT (%) is represented in open diamonds, aeration (vvm) in
681 dashes and agitation (rpm) in dotted line, biomass production in dark circle, glycerol
682 concentration in triangles, acetate concentration in squares, number 1 and 2 indicate the
683 chaperones and *nprR* induction respectively

684

685

686

687

688

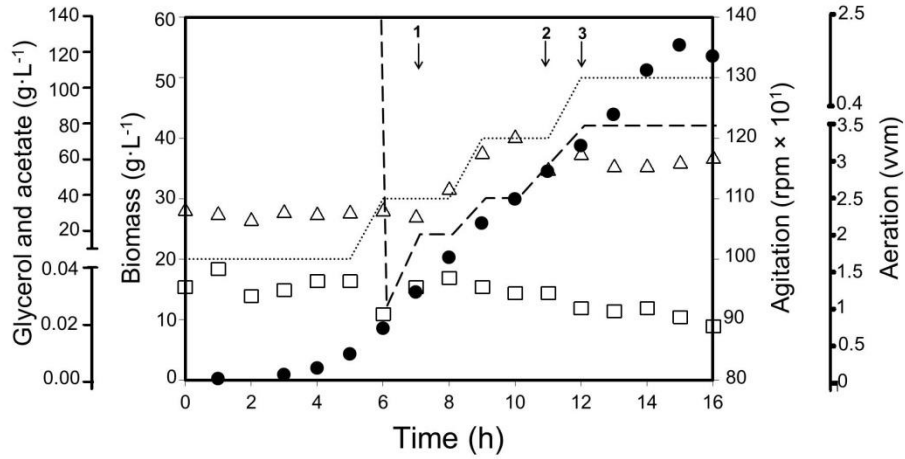
689

690

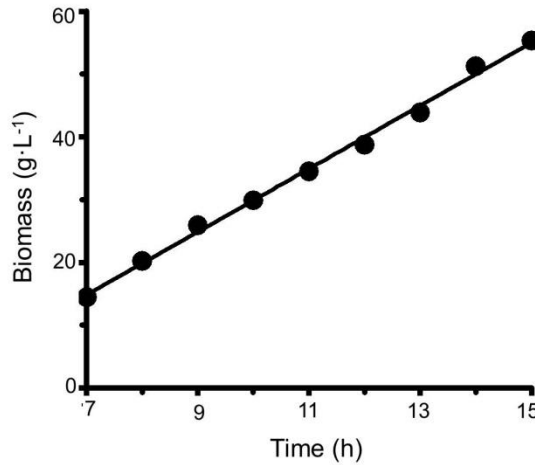
691

692

A



B



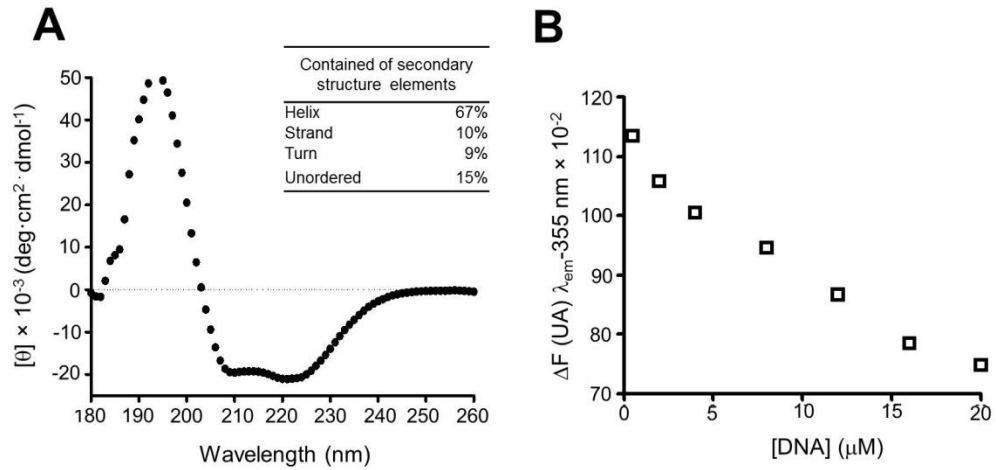
694

695

696 Figure 4. Fed-batch culture of BL21 (DE3) (pGKJE6-pET11a Ω *nprR*) strain with a
 697 minimal dissolved oxygen tension of $52\pm 10\%$ (A) Operation conditions from cellular
 698 growth and biomass concentration. Aeration is represented (vvm) in dashes and agitation
 699 (rpm) in dotted line, biomass in dark circle, glycerol concentration in triangles, acetate
 700 concentration in squares, number 1, 2 and 3 indicates the initiation of feeding phase, the
 701 chaperones and the *nprR* induction respectively (B) Adjustment of biomass experimental
 702 data at lineal model of growth (right), the r^2 was 0.9962

703 Figure 5

704



705

706

707 Figure 5. Secondary structure, folding properties and functionality of NprR recombinant
708 protein (a) CD spectra in the far-UV CD region for NprR recombinant protein and
709 structure secondary contain analysis (insert) (b) NprR-NprRB binding analysis of the
710 DNA using a region of the extracellular protease promoter (*nprA*) by intrinsic
711 tryptophan fluorescence

712

713

714

715

716

717

718

719 Table 1. Parameter of growth to the BL21 (DE3) [pGKJE6-pET11aΩnprR] strain in the batch and fed-batch culture
 720

Culture	Logistic model			Exponential model			Linear model		
	μ (h ⁻¹)	X _M (g·L ⁻¹)	r ²	μ (h ⁻¹)	X _M (g·L ⁻¹)	r ²	Linear growth rate (r _g)	X _M (g·L ⁻¹)	r ²
Batch									
17±1%	0.27	4.5	0.979	0.51	1.46	0.982	0.3	4.6	0.986
58±4%	0.78	26.9	0.998	0.56	NA	0.989	ND	ND	ND
Fed-batch									
Batch stage	ND	ND	ND	0.7262	8.5	0.999	ND	ND	ND
Feeding stage	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5.02	53.5	0.996

721 ND: Not determined.
 722

723

724

725

726

727 Table 2. Yield coefficients ($Y_{X/S}$ and $Y_{P/X}$), acetate accumulation and NprR recombinant
 728 protein production at end of the cultivation of the BL21 (DE3) [pGKJE6-pET11a Ω nprR]
 729 strain in the batch and fed-batch culture
 730

Culture	$Y_{X/S}$ ($\text{g}_{\text{cell}} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{glycerol}}$)	$Y_{P/X}$ ($\text{mg}_{\text{NprR protein}} \cdot \text{g}_{\text{cell}}^{-1}$)	Final acetate concentration ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)	Protein concentration (mg)
Batch				
17±1%	ND	ND	0.95	ND
58±4%	4.7	0.22	0.03	5.68
Fed-batch				
Batch stage	5.05	ND	ND	ND
Feeding stage	2.75	2.76	0.03	147.5

731 ND: Not determined.

732

733

734

735

736

737

738

739

740

741

742

743

744

745

746

747

748 Table 3. Fed-batch culture for production of recombinant proteins in *Escherichia coli*: a
 749 comparison of biomass and protein production between this work and others reports
 750

<i>E. coli</i> strain	Feeding profile	X_M (g·L ⁻¹)	Recombinant protein	Protein concentration (g·L ⁻¹)	Reference
K12	Step	20	Human growth factor Rhamnulose-1- phosphate aldolase (RhuA)	0.6	[26]
K12	Exponential	27		2.7	[27]
X90	Exponential	92	Trypsin	0.056	[28]
TG1	Exponential	55	β-galactosidase	19.2	[29]
BL21(DE3)	Constant	14.4	Streptokinase Swine erysipelas vaccine antigen	1.12	[30]
BL21(DE3)	Exponential	41.9	(SpaA)	6.0	[24]
BL21(DE3)	Constant	53.5	NprR	0.148	This work

751
 752
 753

CAPÍTULO II

Regulation of sporulation initiation by NprR and its signaling peptide NprRB: molecular recognition and conformational changes

Rosina Cabrera, Jorge Rocha, Víctor Flores, Luz Vázquez-Moreno,
Gabriel Guarneros, Gabriela Olmedo, Adela Rodríguez-Romero,
Mayra de la Torre

(2014)

Applied Microbiology and Biotechnology 98(22):9399-9412

RESUMEN

NprR pertenece a la familia de receptores de quorum sensing RNPP, un grupo de reguladores intracelulares activados directamente por oligopéptidos de señalización en bacterias Gram-positivas. En *Bacillus thuringiensis* (Bt), *nprR* está localizado en un casete transcripcional con *nprRB* que codifica para el precursor del péptido de señalización NprRB. NprR es un regulador transcripcional activado mediante la unión de NprRB reimportado; sin embargo, algunos reportes sugieren que NprR también participa en la esporulación pero su mecanismo es desconocido. Nuestros resultados *in silico*, basados en la similitud estructural entre NprR de Bt y las proteínas Rap que unen Spo0F de *Bacillus subtilis*, sugiriendo que NprR pudiera unirse a Spo0F para modular la esporulación a través del *phosphorelay* en Bt. La delección del casete *nprR-nprRB* de Bt causó un retraso en la esporulación y una activación defectuosa de los genes activados por Spo0A~P, *spoIIA* y *spoIIIG*. El dominio de unión a ADN de NprR no fue necesario para esta segunda función, ya que la proteína truncada NprR Δ HTH junto con el gen *nprRB* fue capaz de restaurar el fenotipo de esporulación de la cepa silvestre en la mutante Δ *nprR-nprRB*. Ensayos de fluorescencia mostraron la unión directa entre NprR y Spo0F, confirmando que NprR es una proteína bifuncional. Para entender cómo se lleva a cabo la activación de NprR por NprRB para regular las dos funciones diferentes, nosotros estudiamos el mecanismo del reconocimiento molecular entre el péptido de señalización y el receptor. Utilizando variantes sintéticos de NprRB, nosotros encontramos que SSKPDIVG exhibió la mayor afinidad por NprR recombinante ($K_d=7.19$ nM) y se demostró que el reconocimiento involucra un proceso de selección conformacional. Nosotros proponemos que la concentración del péptido en la célula controla los estados de oligomerización del complejo NprR-NprRB para la activación de sus dos funciones.

CAPÍTULO III

Biochemical characterization of the response regulator SpooF from *Bacillus thuringiensis* and its interaction with the quorum sensing receptor NprR

Rosina Cabrera, Adela Rodríguez-Romero, Gabriel Guarneros,
Mayra de la Torre

Manuscrito con formato para la revista Biochemistry

RESUMEN

NprR pertenece a la familia de receptores de quorum sensing RNPP, un grupo de reguladores intracelulares activados directamente por oligopéptidos de señalización en bacterias Gram-positivas. En *Bacillus thuringiensis* (Bt), *nprR* está localizado en un casete transcripcional con *nprRB* que codifica para el péptido de señalización precursor NprRB. NprR es una proteína bifuncional que modula la esporulación a través del phosphorelay mediante interacciones proteína-proteína con Spo0F, y como regulador transcripcional regula la transcripción de un grupo de genes. En este trabajo, nosotros caracterizamos la proteína Spo0F de Bt y estudiamos la interacción *in vitro* del regulador de respuesta Spo0F con la apo-NprR y con el complejo NprR-NprRB. Un alineamiento de la secuencia aminoacídica mostró que Spo0F de Bt8741 exhibió 78% de identidad con Spo0F de *Bacillus subtilis*. Además, como mostraron los espectros de dicroísmo circular en la región del UV-lejano, ambas proteínas exhiben similar estructura secundaria que consiste en 40% α -hélices y 23% β -hojas. Spo0F reconoció a ambas, NprR y el complejo NprR-NprRB con K_{ds} de 7.12 μ M y 25.91 μ M, respectivamente. Adicionalmente, se demostró que la unión de Spo0F indujo cambios conformacionales en la región putativa para la interacción de Spo0F en NprR. Con base en los resultados se propuso un modelo para explicar el mecanismo molecular de NprR como proteína bifuncional en función de las concentraciones de NprRB.

1 **Title:**

2 Biochemical characterization of the response regulator Spo0F from *Bacillus*
3 *thuringiensis* and its interaction with the quorum sensing receptor NprR

4

5

6 **Authors:**

7 Rosina Cabrera¹, Adela Rodríguez-Romero², Gabriel Guarneros³, Mayra de la Torre^{1*}

8

9

10 **Affiliation:**

11 ¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C., Km 0.6 Carretera a La
12 Victoria, 83304 Hermosillo, Sonora, Mexico

13

14 ²Instituto de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Circuito Exterior,
15 Ciudad Universitaria, 04510 Mexico, Distrito Federal, Mexico

16

17 ³Departamento de Genética y Biología Molecular. Centro de Investigación y de Estudios
18 Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Av. Instituto Politécnico Nacional 2508
19 Col. San Pedro Zacatenco, México, D.F., 07000 México.

20

21

22 *Corresponding author

23 Email: mdelatorre@ciad.mx

24 Telephone: +52 (662) 2892400 ext 384

25

26

27

28

29

30

31

32 **Abstract**

33

34 NprR belongs to the RNPP family of quorum sensing receptors, a group of intracellular
35 regulators activated directly by signaling oligopeptides in Gram-positive bacteria. In
36 *Bacillus thuringiensis* (Bt), *nprR* is located in a transcriptional cassette with *nprRB* that
37 codes for the precursor of the signaling peptide NprRB. NprR is a bifunctional protein,
38 which function as modulator of the sporulation-phosphorelay by protein-protein
39 interactions with Spo0F, and as transcriptional regulator by direct DNA binding. Here,
40 we first characterized the Spo0F recombinant protein from Bt and then we studied its *in*
41 *vitro* interaction with the apo-NprR and the NprR-NprRB complex. Sequence alignment
42 showed that Spo0F from Bt8741 exhibited a 78% sequence identity with the Spo0F from
43 *Bacillus subtilis* and they exhibit similar secondary structure consisting in 40% α -helix
44 and 23% β -sheet. Spo0F recognized both, NprR and the NprR-NprRB complex, with
45 K_{ds} of 7.12 μ M and 25.91 μ M, respectively. Further, we showed that Spo0F binding
46 induced conformational changes in the putative Spo0F-binding region of NprR. Finally,
47 a model is proposed to explain the molecular mechanism of NprR as a bifunctional
48 protein as a function of NprRB concentration.

49

50

51

52

53

54

55

56

57

58

59

60

61

62

63 **Introduction**

64

65 Bacteria communicate with one another using chemical signal molecules as a regulation
66 mechanism to control microbial processes such as growth, movement and biochemical
67 activities for species survival. Quorum sensing (QS) is a bacterial cell-cell
68 communication system, which is referred to the ability of bacteria to respond by altering
69 their gene expression when the signaling molecules reach a critical concentration in an
70 environment [1-4]. In Gram-positive bacteria, RNPP (**R**ap/**N**prR/**P**lcR/**P**rgX) is a family
71 of QS intracellular receptors that bind directly to their signaling peptide and include the
72 aspartyl-phosphate phosphatases (Rap proteins), the neutral protease regulator (NprR),
73 the Phospholipase C regulator (PlcR) and the sex-pheromone receptor (PrgX) [5].
74 Structurally, RNPP proteins contain a C-terminal regulatory domain constituted by
75 tetratricopeptide repeats (TPRs) that are predicted to form a groove-like structure
76 potentially critical for peptide-protein interactions and an N-terminal helix-turn-helix
77 (HTH) DNA binding domain, with the exception of Rap proteins [6]. The N-terminal
78 region of the Rap proteins is formed by a sequence of approximately 100 highly
79 conserved residues, which are responsible for binding to the response regulators, such as
80 Spo0F [7].

81

82 The response regulator Spo0F is a central regulatory element of the Spo0A phosphorelay
83 that regulates the sporulation initiation in *B. subtilis*. The phosphorelay is initiated by
84 auto-phosphorylation of histidine kinases followed by the transfer of the phosphoryl
85 group to the intermediate response regulator Spo0F which transfers the phosphate group
86 to the regulator Spo0A via the Spo0B. Spo0A~P is the master regulator for entry into
87 sporulation and regulates the transcription of 121 genes. In Bs, this process is tightly
88 regulated by QS because the Rap proteins modulate the phosphate flux through
89 dephosphorylation of Spo0F [8,9].

90

91 *Bacillus thuringiensis* (Bt), a member of the *Bacillus cereus* group, is well known for its
92 entomopathogenic properties [10]. The insecticidal activities of Bt are due to the
93 production of crystals consisting of δ -endotoxins (Cry proteins) during sporulation. It is

94 known that NprR is activated after death of the insect and allows Bt cells to survive in
95 the cadaver as vegetative cells. This protein regulates 41 genes, including enzymes and
96 proteins that the bacteria need to degrade several substrates for surviving in the cadaver
97 [11]. In association with the NprX or NprRB signaling peptides, NprR activates the
98 transcription of the extracellular protease gene (*nprA*) [6]. NprR has been related with
99 the regulation of sporulation in *B. cereus* [12,13]. Papillae colonies of *B. anthracis* with
100 mutations in the *nprR* fail to initiate sporulation, thus it was speculated that NprR is one
101 of the early sensors that ultimately affect the decision-making apparatus to initiate
102 sporulation [12]. Furthermore, the addition to Bt cultures of hepta- and octa-peptides
103 (SKPDIVG and SSKPDIVG) derived from the amino acid sequence or the exported
104 region of the *nprRB* product had effect on the sporulation efficiency, caused early
105 detection of spores, and decreased *cry* expression [13]. There are very few works
106 concerning the phosphorelay in the *B. cereus* group. Recently, we reported that a
107 deletion of the *nprR-nprRB* cassette from Bt produced a delay in sporulation and
108 defective trigger of the Spo0A~P-activated genes *spoIIA* and *spoIIIG*. It is worth
109 mentioning that the DNA-binding domain of NprR was not necessary for this function
110 and *in vitro* assays showed that Spo0F binds NprR. Therefore NprR is a bifunctional
111 protein involved in the modulation of the phosphorelay through protein-protein
112 interactions and a transcriptional regulator [14].

113

114 In this work, we characterized the folding of recombinant Spo0F from Bt and its
115 interaction with NprR and the NprR-NprRB complex *in vitro*. Bt-Spo0F and Spo0F from
116 *B. subtilis* exhibited a high sequence identity and similar secondary structure and
117 folding. The affinity of NprR for Spo0F was higher than that between the NprR-NprRB
118 complex for Spo0F. Based on circular dichroism in the near-UV analysis we suggest that
119 the Spo0F binding induced conformational change in the putative Spo0F-binding region
120 of NprR. Finally, we propose a model to explain the molecular mechanism of NprR as a
121 bi-functional protein on function of NprRB concentration.

122

123

124

125 **Materials and Methods**

126

127 Production of the recombinant proteins NprR and Spo0F

128

129 A derivative of *Escherichia coli* strain BL21 (DE3) (Invitrogen, Carlsbad, CA, US)
130 transformed with the plasmids pGKJE6 and pET11a Ω nprR was used in this study. The
131 pET11a Ω nprR plasmid carries a synthetic gene encoding NprR according to the
132 sequence of NprR from *Bacillus thuringiensis* strain 8741 (Bt8741), six histidine (His)
133 codons residues were added to the N-terminal. Plasmid pGKJE6 was used for assisting
134 folding of NprR; in this plasmid the *dnaK-dnaJ-grpE* operon is under control of the
135 *araB* promoter-operator (*araBp*) and the *groEL-groES* operon is under control of the
136 Pzt-1, thus the promoters are inducible with L-arabinose and tetracycline, respectively
137 [15]. The Spo0F protein was overexpressed fused to a C-terminal hexa-histidine tag in
138 the plasmid pET11a. The recombinant plasmid pET11a Ω spo0F was introduced into *E.*
139 *coli* strain Gold (DE3) [14].

140

141 As previously described [14] the NprR protein was purified by a two-step procedure
142 (immobilized-metal affinity and anionic exchange chromatography) and Spo0F was
143 purified using immobilized-metal affinity [14].

144

145 Fluorescence binding assays

146

147 The binding affinities of the Spo0F protein for both, the apo-NprR and the NprR-
148 SSKPDIVG complex were measured by monitoring the intrinsic tryptophan
149 fluorescence change at 355 nm after addition of the Spo0F using a FLUOstar Omega
150 Multi-Mode Microplate Reader with CCD-based Spectrometer (BMG Labtech,
151 Ortenberg, Germany). The excitation wavelength was set to 290 nm. Different
152 concentrations of Spo0F protein from 0 to 60 μ M were added to 10 μ M NprR in 20 mM
153 Tris-HCl (pH 8.0), 50 mM KCl and 5 mM MgCl₂. The change in fluorescence intensities
154 were used to calculate the dissociation constant for the ligands (Spo0F or DNA) by
155 plotting the change in fluorescence intensity at the wavelength of maximum emission

156 (355 nm) against the ligand concentration. The resulting isotherm was fitted to Equation
157 1:

$$\Delta F = \frac{\Delta F_{max}[Ligand]}{K_d + [Ligand]}$$

158

159 Where, ΔF is the difference in fluorescence intensity of the protein with and without
160 Spo0F, ΔF_{max} is this difference when all of the binding sites of the protein are saturated
161 with the ligand and without ligand and K_d is the dissociation constant of the ligand from
162 the protein-ligand complexes. The data represent two independent measurements.

163

164 Circular dichroism spectral measurements (CD)

165

166 CD measurements in the far-UV spectral region (195-260 nm) we obtained at 20°C
167 using a Jasco J-700 spectropolarimeter (Jasco Inc., Mary's Easton, MD, US) equipped
168 with a Peltier temperature control system. NprR, Spo0F and the SSKPDIVG peptide
169 were dialyzed in 10 mM phosphate buffer at pH 8.0 and filter. To characterize the
170 secondary structure of Spo0F the protein concentration was 0.3 $\mu\text{g}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ and spectra
171 were collected from 190 to 260 nm in a 0.1 cm path-length cell. Three scans were
172 averaged to obtain the final spectra. All the spectra were scaled to molar ellipticities θ
173 ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$) and secondary structure analysis was performed using the CDSSTR
174 algorithms available in DichroWeb (dichroweb.cryst.bbk.ac.uk/).

175

176 Interactions between the NprR-Spo0F and NprR-SSKPDIVG-Spo0F were analyzed
177 obtaining CD spectra in the near-UV region. The NprR and Spo0F protein
178 concentrations were close to 2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, while that for SSKPDIVG was 0.019 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.
179 Spectra were collected for each sample and complex from 260 to 340 nm in a 1 cm path-
180 length cell. Three scans were averaged to obtain the final spectra. All the spectra were
181 scaled to molar ellipticities θ ($\text{deg}\cdot\text{cm}^2\cdot\text{dmol}^{-1}$). The baselines were obtained from the
182 CD signal for the buffer and this signal was subtracted from CD spectra of each
183 experiment.

184

185 In silico analyses

186

187 Protein sequences of Spo0F from *Bacillus subtilis* (Bs168) and *B. thuringiensis* (Bt407)
188 were subjected to multiple sequence alignment using the protein Blast tool (National
189 Center for Biotechnology Information). The I-TASSER server [16] was used to produce
190 a three-dimensional structure model for Bt-Spo0F and PyMOL v1.6 (The PyMOL
191 Molecular Graphics System, Version 1.6.0.0 Schrödinger, LLC) for visualization and
192 analysis of the protein structure.

193

194 **Results and discussion**

195

196 Biochemical characterization of the Bt-Spo0F protein

197

198 The far-UV CD spectrum of the recombinant Spo0F from Bt displayed two negative
199 bands centered at 208 nm and 222 nm, indicating that the protein is largely alpha-helical
200 (Figure 1). Deconvolution of this spectrum gave a secondary structure content of 40% α -
201 helix and 23% β -sheet, similar to values from the *B. subtilis* Spo0F crystal structure
202 (44% α -helix and 19% β -sheet; PDB ID 1SRR). Considering this we used the I-
203 TASSER server to model the three-dimensional structure of Bt-Spo0F, since no
204 structure has yet been reported. The predicted model of Bt Spo0F was very similar to the
205 crystal structure of the protein form Bs (PDB ID 1SRR) demonstrating that both have a
206 similar fold and overall conformation (Figure 2A). The overall structure is very similar
207 to the Bs-Spo0F (PDB ID 1SRR), which has been described as a parallel α/β fold,
208 containing a central β -sheet [16].

209

210 Amino acid sequence alignment of Bt-Spo0F displayed an identity of 78% with Bs-
211 Spo0F (Figure 2B) residues important for the function of Bs-Spo0F, are conserved in Bt-
212 Spo0F; these are Asp54 in the phosphorylation-site and Lys104, Asp10 and Asp11 in the
213 active site [17,18]. The residues of the aspartate pocket (Asp11, Asp54 and Lys56)
214 involved in the divalent ions coordination are also conserved. Furthermore, residues
215 implicated in the RapH-Spo0F interface (Y84 and H101) are also present in Bt-Spo0F

216 [7]. Consequently, the highly conserved nature of the interacting residues with Rap
217 proteins and secondary structure between Bt-Spo0F and Bs-Spo0F strongly suggests that
218 the function in the sporulation-phosphorelay of this response regulator may be conserved
219 in Bt.

220

221 Spo0F interacts with NprR and NprR-NprRB complex with different affinity

222

223 Intrinsic fluorescence of tryptophan was used to evaluate Spo0F interaction with NprR
224 and the NprR-NprRB complex, taking advantage of the fact that Spo0F does not contain
225 tryptophan residues (Figure 3). On the other hand, NprR contains two tryptophan
226 residues in the C-terminal regulatory domain formed by nine tetratricopeptide repeats
227 (TPRs) [19], one located in TPR1 (Trp86) and the second in the peptide-binding groove
228 in TPR3 (Trp 174) (Figure 3A). We have previously demonstrated that the peptide
229 SSKPDIVG exhibit the highest affinity for NprR [14]; therefore, this peptide was used
230 here, at saturating concentrations, to form the NprR-NprRB complex. The plots of
231 maximum fluorescence intensity change for NprR and NprR-SSKPDIVG against
232 different concentrations of Spo0F are shown in Figure 3B. The addition of increasing
233 concentrations of Spo0F increased the fluorescence intensity emitted at 355 nm
234 indicating that Spo0F binding induces conformational changes in NprR, with a K_d of
235 7.12 μ M. Spo0F displayed 3.6-times lower affinity by the NprR-SSKPDIVG complex
236 ($K_d = 25.91 \mu$ M). Interestingly, NprR-Spo0F binary complex did not bind the peptide
237 SSKPDIVG, i.e. no fluorescence change was observed in the titration assays (data not
238 shown). These results indicate that both apo-NprR and the NprR-NprRB complex
239 recognize the Spo0F protein, but the NprR-Spo0F complex cannot bind the peptide. In
240 *B. subtilis* has been reported that the expression and levels of Spo0F increased at the end
241 of exponential growth when the sporulation process is initiated [20]. Moreover, the
242 *nprR-nprRB* transcription is activated at the same time in Bt [21]. As the precursor
243 signaling peptide should be processed to generate NprRB [5,22], is possible that the
244 interaction of NprR and Spo0F is favored at the end of exponential growth when the
245 peptide concentrations are low and the sporulation process is triggered in the cell.

246 Furthermore, we found that Spo0F binding to NprR-NprRB complex is a positive
247 cooperative process, as suggested by the sigmoidal binding curves shown in Figure 3B;
248 however, this is not the case for the Spo0F-NprR interaction. These results suggest that
249 the recognition mechanism of Spo0F is different when it interacts with the apo NprR or
250 the NprR-SSKPDIWG complex. Thus, it is possible that the conformational changes
251 caused for Spo0F in apo NprR are different than those induced in the NprR-NprRB
252 complex.

253

254 It has been reported that NprR-NprRB complex binds to the *nprA* promoter and activates
255 transcription of the neutral protease gene (*nprA*) in Bt [6] through its DNA domain. To
256 confirm the specificity of the Spo0F-NprR and Spo0F-NprR-SSKPDIWG interaction, we
257 evaluated the interaction between the apo-NprR and NprR-SSKPDIWG complex and
258 DNA using a region of the neutral protease promoter (*nprA*), used in other reports [6].
259 Binding to DNA produced a decreased or quenching of the NprR-SSKPDIWG complex
260 fluorescence. Plots of the maximum fluorescence intensity change against DNA
261 concentration are shown in Figure 3C. The apparent K_d value for this interaction was
262 estimated as 16.1 μ M. Interesting, apo-NprR did not bind to NprR, i.e. fluorescence
263 change was not observed in the titration assays (data not shown). This result
264 demonstrates that only the protein-peptide complex recognizes the DNA molecule.

265

266 Summarizing, we found that the NprR-NprRB complex bound both Spo0F and DNA,
267 but the affinity of this protein-peptide complex for the DNA was higher than that the
268 affinity for the Spo0F protein. These result suggest that the interaction between the
269 NprR-NprRB complex and DNA is favored when the peptide concentration in the cell
270 are high and strengthen the hypothesis that the peptide concentration in the cell is the
271 factor that determines the function of NprR, as transcriptional regulator or to modulate
272 the *phosphorelay*.

273

274 Spo0F binding induces changes in the tertiary structure of NprR

275

276 Structural changes in proteins caused by molecular interactions are an essential feature
277 of the mechanism of action and regulation of biological systems. We performed near-
278 UV circular dichroism (CD) spectroscopy to evaluate putative structural changes due to
279 Spo0F binding to NprR, or to the NprR-SSKPDI VG complex. NprR contain in its amino
280 acid sequence 36 Tyr, 13 Phe and 2 Trp while Spo0F contain 3 Tyr, 5 Phe and neither
281 Trp which is important because the Trp86 of NprR is located in the putative Spo0F
282 binding region. Figure 4 shows the near-UV CD spectra of free-NprR and free-Spo0F.
283 The NprR spectrum exhibited a positive band centered at 294 nm that derives from Trp
284 residues, and large negative signals with peaks at 276, 278 and 280 nm and troughs at
285 277, 278 and 281 nm, also derive from Trp. The indole chromophore of Trp are
286 composed of two $\pi-\pi^*$ electronic transitions in the near-UV, designed as 1L_a and 1L_b
287 [23]. Near-UV CD spectrum of Trp residues in proteins frequently shows a complex line
288 shape due to 1L_a and 1L_b electronic transition [24,25]. It has been reported that the 1L_a
289 band is about 279 nm for Trp and the superposition of 1L_a and 1L_b is present near 294 nm
290 [25]. Therefore, the signals observed near 280 nm in the NprR CD spectrum may
291 correspond to 1L_a and the band at 294 nm may result from the superposition of both 1L_a
292 and 1L_b bands. On the other hand, the Spo0F spectrum exhibited a negative band at 265
293 nm, which derives from Phe residues, another negative band at 271 nm and a shoulder at
294 283 nm, which are characteristic signals for Tyr. As expected Spo0F spectra did not
295 present the positive signal around 290 nm characteristic of tryptophans [26].

296

297 As observed in Figure 5, the CD spectra of the NprR-Spo0F binary complex exhibited
298 important differences compare to those of the free proteins: i) The signals observed near
299 279 nm were stronger in NprR-Spo0F spectra and all these signals had a slight red shift
300 of 1 nm, ii) a new trough at 273 nm was observed, and iii) the band at 294 nm decreased.
301 Also the spectrum of the NprR-SSKPDI VG binary complex showed differences: i) The
302 intensity of all negative signals near 279 nm decreased, ii) the bands at 276, 278 and 280
303 nm disappeared, while the intensity of the band at 294 nm decreased and an additional
304 shoulder appeared close to 300 nm. The spectrum of NprR-SSKPDI VG-Spo0F exhibited
305 some differences with respect to that of NprR and NprR-SSKPDI VG (Figure 7A), some
306 peaks present in the spectra of NprR, but not in that of NprR-SSKPDI VG appeared

307 again in the ternary complex CD spectra; the negative signal at 276 nm observed in the
308 NprR was shifted 2 nm to the red in the ternary complex; and the positive signal at 294
309 nm as well as the shoulder at 301 nm (Figure 7B) were slightly stronger.

310

311 It is known that the shape and magnitude of the near-UV CD spectra of a protein depend
312 on the number of each type of aromatic amino acids present, their mobility, the nature of
313 their environment and their spatial disposition in the protein [27]. Specifically, near-UV
314 CD spectra of tryptophan in proteins are highly sensitive to interactions between nearby
315 groups. As we described above, during the protein-peptide and protein-protein
316 interaction the Trp signal was the strongest. The decrease of intensity of Trp signals
317 observed during the NprR-NprRB interaction indicates that the surface of NprR contains
318 Trp residues, which may be are less exposed to the solvent in the binary complex than in
319 the free protein. The crystal structure of NprR Δ H₁₇₋₂₀ in complex with NprRB (PDB ID
320 4GPK) show that the two Trp residues contained in the NprR are buried within the
321 interior of the protein. In a previous report [14] we found that the fluorescence intensity
322 due to Trp also decreased in the complex, which corroborates that the Trp residues are
323 less exposed when the NprR-NprRB complex is formed. Even more the entropy of the
324 NprR-NprRB complex is smaller than that of the free protein, thus the complex protein-
325 peptide is more rigid [14]. On the other hand, the increase in the intensity of the Trp
326 signals (near 279 nm and 294 nm) upon Spo0F interaction with free-NprR or NprR-
327 NprRB indicates that the regions where Trp is located are more exposed to the solvent.
328 The shift to the red observed in both NprR-Spo0F and NprR-NprRB-Spo0F spectra
329 confirms this statement [28]. Since the Trp86 is located in the putative Spo0F-binding
330 region of NprR (Figure 2), it is likely that the changes observed in Trp-CD signal are
331 due to bind of Spo0F in this region of NprR.

332

333 The evidence presented in this work strongly indicates that changes in ternary structure
334 occur during the interaction of Spo0F with NprR and the complex NprR-NprRB, but
335 these changes are different and apparently they depend on the signaling peptide
336 concentration. The bacteria may control the intracellular concentration of NprRB by
337 regulating the transcription of the NprRB gene or the internalization of the signaling

338 peptide to the cell. The NprRB gene can be transcribed as a monocistronic mRNA or as
339 part of the *nprR-nprRB* cassette. In the first case the expression of NprRB depends on
340 the sigma factors σ^E and σ^H , and in the second on σ^A [12]. Additionally the NprR
341 regulon includes a family of oligopeptide permease, which could re-import the signaling
342 peptide and control the intracellular concentration of NprRB [10].

343

344 Since our results suggest that the peptide concentration may determinate the function of
345 NprR as a phosphorelay modulator or transcriptional regulator, we suggest a molecular
346 model described in Figure 7. The putative site in NprR for Spo0F binding is located in a
347 region close to the HTH domain (DNA binding site), therefore when the signaling
348 peptide concentration is low, Spo0F and NprR form a complex. When the peptide
349 concentration increases the complex NprR-NprRB is formed and the peptide binding
350 cannot release Spo0F from the complex and favor the binding of NprR-NprRB to DNA.

351

352 Further studies are being undertaken to understand the molecular mechanism of NprR as
353 a phosphorelay-modulator or transcriptional regulator based on the conformational
354 changes during the interaction of NprR with other proteins as Spo0F, ligands
355 (SSKPDIVG, SKPDIVG and SSKPDIV) and DNA, as well as *in vivo* studies.

356

357 **Acknowledgements**

358

359 This work was supported by CONACYT (Mexico) grant 180246 to MT. Fellowships
360 from CONACYT was given to RC. The authors thank to Q.F.B Rocio Patiño-Maya from
361 the Instituto de Química-UNAM and to M.C. Ana María Guzmán-Partida from CIAD
362 for technical assistance.

363

364

365

366

367

368

References

369

370

371

372 1. Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the
373 LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *Journal of*
374 *Bacteriology* 176(2):269-275

375 2. Dunny GM, Leonard BA (1997) Cell-cell communication in gram-positive bacteria.
376 *Annual Review of Microbiology* 51:527-564

377 3. Lazazzera BA (2001) The intracellular function of extracellular signaling peptide.
378 *Peptides* 22:1519-1527

379 4. Miller MB, Bassler BL (2001) Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of*
380 *Microbiology* 55:165-199

381 5. Declerck N, Bouillaut L, Chaix D, Rugani N, Slamti L, Hoh F, Lereclus D, Arold
382 ST (2007) Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of
383 quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proceeding of the National Academy of*
384 *Sciences USA* 104:18490-18495

385 6. Perchat S, Dubois T, Zouhir S, Gominet M, Poncet S, Lemy C, Aumont-Nicaise M,
386 Deutscher J, Gohar M, Nessler S, Lereclus D (2011) A cell-cell communication
387 system regulates protease production during sporulation in bacteria of the *Bacillus*
388 *cereus* group. *Molecular Microbiology* 82:619-633

389 7. Parashar V, Mirouze N, Dudnau DA, Neiditch MB (2001) Structural basis of
390 response regulator dephosphorylation by Rap phosphatases. *PloS Biology*
391 9(2):e1000589. doi:10.1371/journal.pbio.1000589

392 8. Molle V, Fujita M, Jensen ST, Eichenberger P, González-Pastor JE, Liu JS, Losik R
393 (2003) The Spo0F regulon of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 50(5):1683-
394 1701

395 9. Piggot PJ, Hilbert DW (2004) Sporulation in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol*
396 7:579-586. doi:10.1016/j.mib.2004.10.001

397 10. Schnepf E1, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR,
398 Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins.
399 *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(3):775-806

- 400 11. Dubois T, Faegri K, Perchat S, Lemy C, Buisson C, Nielsen-LeRoux H, Jacques P,
401 Ramarao N, Kolsto AB, Lereclus D (2012) Necrotrophism is a quorum-sensing-
402 regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. PLoS Pathogens 8(4):e1002629.
403 doi:10.1371/journal.ppat.1002629
- 404 12. Yang H, Sikavi C, Tran K, McGillivray SM, Nizet V, Yung M, Chang A, Miller JH
405 (2011) Papillation in *Bacillus anthracis* colonies: a tool from finding new mutators.
406 Molecular Microbiology 79:1276-1293
- 407 13. Rocha J, Flores V, Cabrera R, Soto-Guzmán A, Granados G, Juaristi E, Guarneros
408 G, De la Torre M (2012) Evolution and some functions of the NprR-NprRB quorum
409 sensing system in the *Bacillus cereus* group. Applied Microbiology and
410 Biotechnology 94:1096-1078.
- 411 14. Cabrera R, Rocha J, Flores V, Vázquez-Moreno L, Guarneros G, Olmedo G,
412 Rodríguez-Romero A, de la Torre M (2014) Regulation of sporulation initiation by
413 NprR and its signaling peptide NprRB: molecular recognition and conformational
414 changes. Applied Microbiology and Biotechnology 98(22):9399-9412. doi:
415 10.1007/s00253-014-6094-8.
- 416 15. Nishihara K, Kanemori M, Kitagawa M, Yanagi H, Yura T (1998) Chaperone
417 coexpression plasmids: differential and synergistic roles of DnaK-DnaJ-GrpE and
418 GroEL-GroES in assisting folding of an allergen of Japanese cedar pollen, Cryj2, in
419 *Escherichia coli*. Appl Environ Microbiol 64:1694-1699
- 420 16. Roy A, Kucukural A, Zhang Y (2010) I-TASSER: a unified platform for automated
421 protein structure and function prediction. Nature protocols 5:725-738
- 422 17. Mudhusudan JZ, Whiteley JM, Hoch JA, Xuong NH, Varughese J (1996) Crystal
423 structure of a phosphatase-resistant mutant of sporulation response regulator Spo0F
424 from *Bacillus subtilis*. Structure 4(6):679-690
- 425 18. Lewis RJ, Brannigan JA, Muchová K, Barák I, Wilkinson AJ (1999)
426 Phosphorylated aspartate in the structure of a response regulator protein. Journal of
427 Molecular Biology 294:9-15
- 428 19. Zouhir S, Perchat S, Nicaise M, Perez J, Guimaraes B, Lereclus D, Nessler S (2013)
429 Peptide-binding dependent conformational changes regulate the transcriptional

430 activity of the quorum-sensor NprR. *Nucleic Acids Research* 41:7920-7933.
431 doi:10.1093/nar/gkt546

432 20. Bai U, Lewandoski M, Dubnau E, Smith I (1990) Temporal regulation of the
433 *Bacillus subtilis* early sporulation gene *spo0F*. *Journal of Bacteriology* 172(9):5431-
434 5439

435 21. Dubois T, Perchat S, Verplaetse E, Gominet M, Lemy C, Aumont-Nicaise M,
436 Grenha R, Nessler S, Lereclus D (2013) Activity of the *Bacillus thuringiensis*
437 NprR–NprX cell–cell communication system is co-ordinated to the physiological
438 stage through a complex transcriptional regulation. *Molecular Microbiology* 88:48-
439 63

440 22. Rocha-Estrada J, Aceves-Diez AE, Guarneros G, De la Torre M (2010) The RNPP
441 family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria. *Applied Microbiology*
442 *and Biotechnology* 87:913-923. doi:10.1007/s00253-010-2651-y

443 23. Strickland EH (1974) Aromatic contributions to circular dichroism spectra of
444 proteins. *CRC critical reviews in biochemistry* 2(1):113-175

445 24. Gasymov OK, Abduragimov AR, Yusifov TN, Glasgow BJ (2003) Resolving near-
446 ultraviolet circular dichroism spectra of single tpr mutant in tear lipocalin.
447 *Analytical Biochemistry* 318:300-308

448 25. Barth A, Martin SR, Bayley PM (1998) Resolution of Trp near-UV CD spectra of
449 calmodulin-domain peptide complex into the 1L_a and 1L_b component spectra.
450 *Biopolymers* 45:493-501

451 26. Krittanai C, Johnson WC (1997) Correcting the circular dichroism spectra of
452 peptides for contributions of absorbing side chains. *Analytical Biochemistry*
453 253(1):57-64

454 27. Kelly SM, Jess TJ, Price NC (2005) How to study proteins by circular dichroism.
455 *Biochimica et Biophysica Acta* 751(2):119-139.

456 28. Callis PR, Burgess BK (1997) Tryptophan fluorescence shift in protein from hybrid
457 simulations: an electrostatic approach. *The Journal of Physical Chemistry B*
458 101(46):9429–9432

459
460

461

462 29. Bongiorno C1, Stoessel R, Shoemaker D, Perego M (2006) Rap phosphatase of
463 virulence plasmid pXO1 inhibits *Bacillus anthracis* sporulation. Journal of
464 Bacteriology 188(2):487-498

465

466

467

468

469

470

471

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484

485

486

487

488

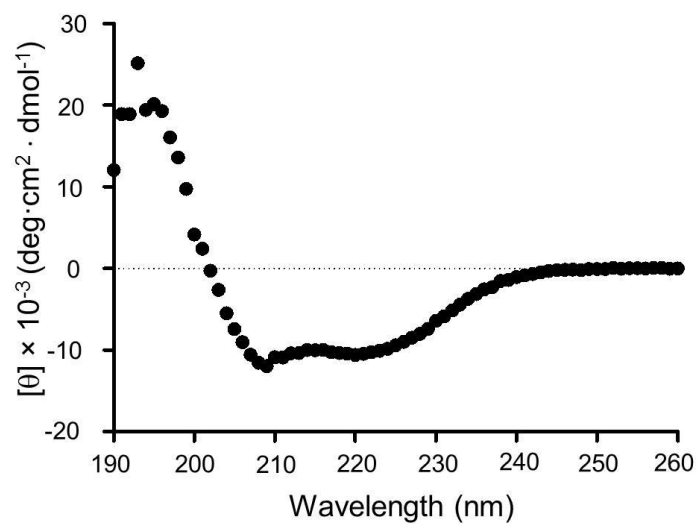
489

490

491

492 Figure 1

493



494

495

496 Figure 1. CD spectra in the far-UV CD region for Spo0F

497

498

499

500

501

502

503

504

505

506

507

508

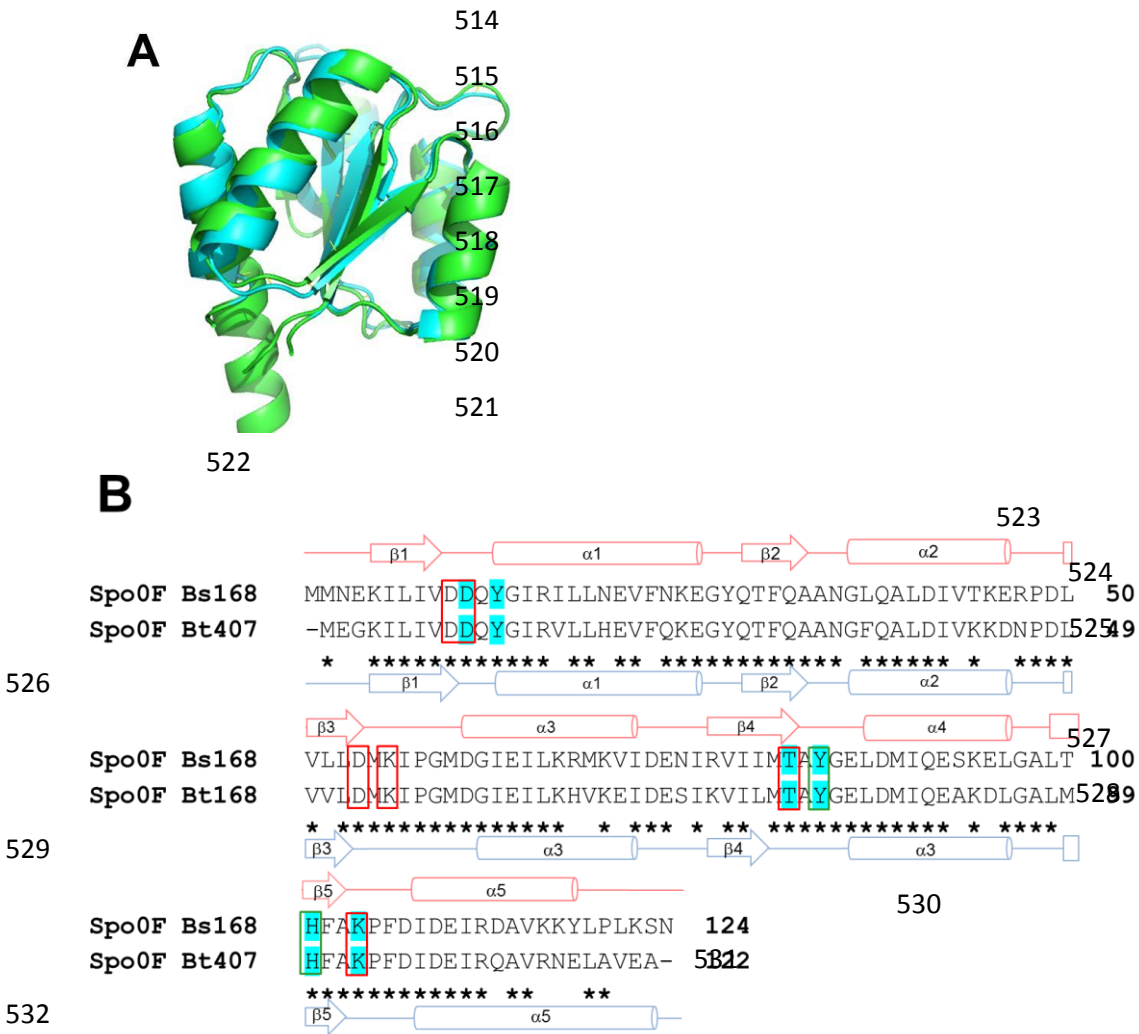
509

510

511

512

513 Figure 2

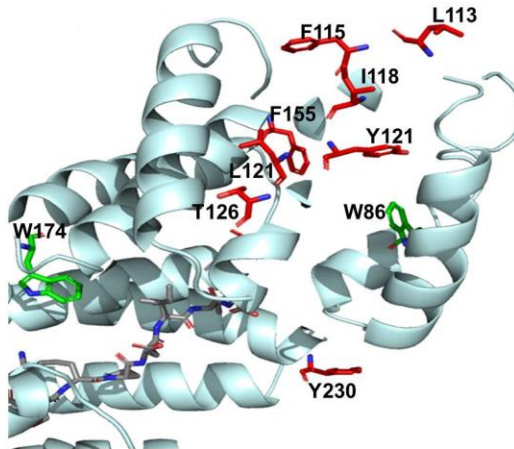


534 Figure 2. Spo0F protein from *Bacillus thuringiensis* resembles Spo0F from *B. subtilis*
 535 (A) Superposition of Spo0F from *B. subtilis* 168 (Bs168) (PDB ID 1SRR) three-
 536 dimensional structure (cyan) and a theoretical model of Spo0F from *Bacillus*
 537 *thuringiensis* Bt407 (Bt407) (green). The protein is rich in alpha-helices with a beta-
 538 sandwich core (B) Sequence alignment of the two Spo0F. The secondary structure
 539 elements, observed in the two proteins, are shown above and below the sequence.
 540 Identical residues are denoted by an asterisk, cyan indicates the residues involved in the
 541 phosphorylation site, red squares show the highly conserved residues in the aspartate
 542 pocket and the green square indicates conserved residues at the RapH-Spo0F interphase
 543 in NprR

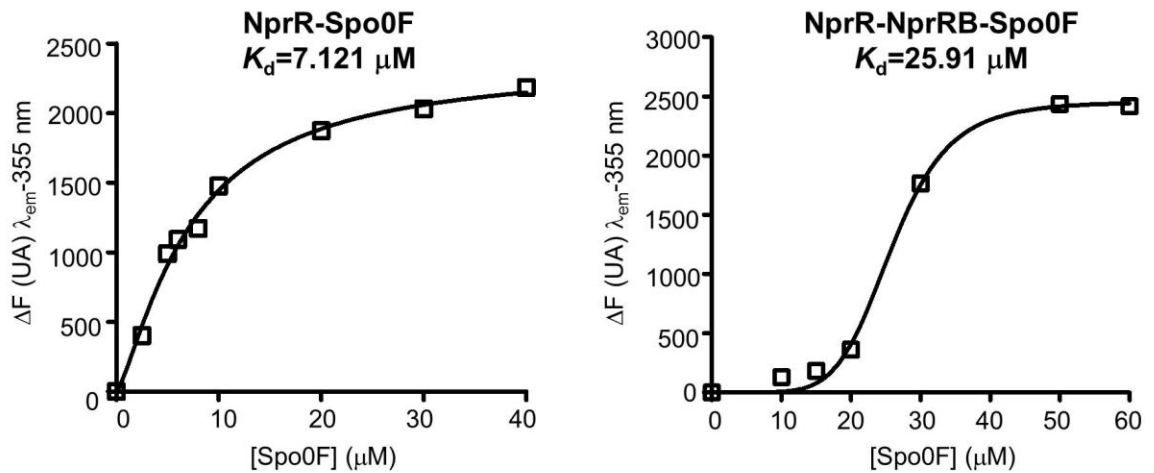
544 Figure 3

545

A



B



546

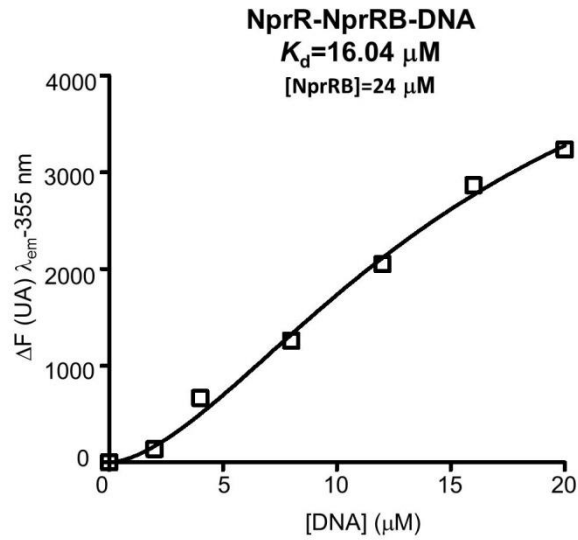
547

548

549 Figure 3. Spo0F-binding analysis of the NprR and NprR-NprRB binary complex by
550 intrinsic fluorescence (A) NprR-NprRB crystal structure (PDB ID 4GPK) showing the
551 putative Spo0F-binding region of NprR where Trp86 is located (B) Non-linear
552 regression analysis of the fluorescence intensity changes of the NprR at the left panel
553 and NprR-NprRB at the right panel in the presence of various concentrations of Spo0F
554 protein. Para las K_d usar solo dos cifras después del punto.

555 Figure 4

556



557

558

559

560 Figure 4. Analysis of the NprR-NprRB interaction with DNA using a region of the
561 neutral protease promotor (*nprA*) by intrinsic fluorescence. Non-linear regression
562 analysis of the relative fluorescence intensity changes of the NprR-NprRB complex, in
563 the presence of various concentrations of DNA

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

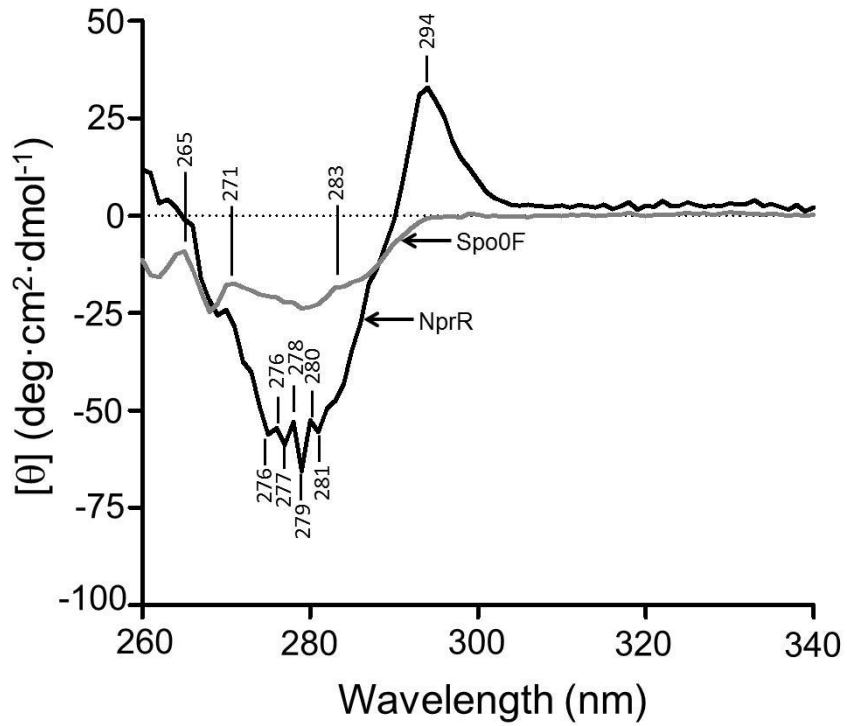
575

576

577 Figure 5

578

579



580

581

582

583

584 Figure 5. CD spectra in the near-UV region of NprR (black line) and Spo0F (gray line)

585 recombinant proteins. The signals identified for each spectrum are indicated with its

586 corresponding wavelength.

587

588

589

590

591

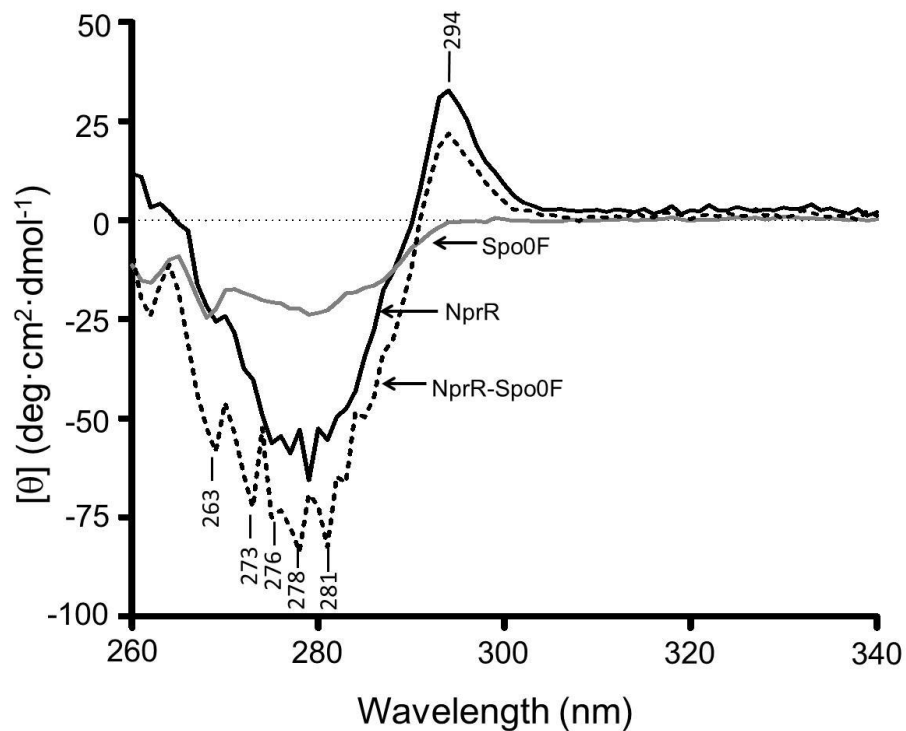
592

593

594 Figure 6

595

596



597

598

599

600 Figure 6. Interaction of NprR with the Spo0F response regulator. Comparison of the
601 NprR-Spo0F near-UV CD spectra with that of NprR and Spo0F. NprR-Spo0F
602 differences spectra are indicate with the wavelength corresponding.

603

604

605

606

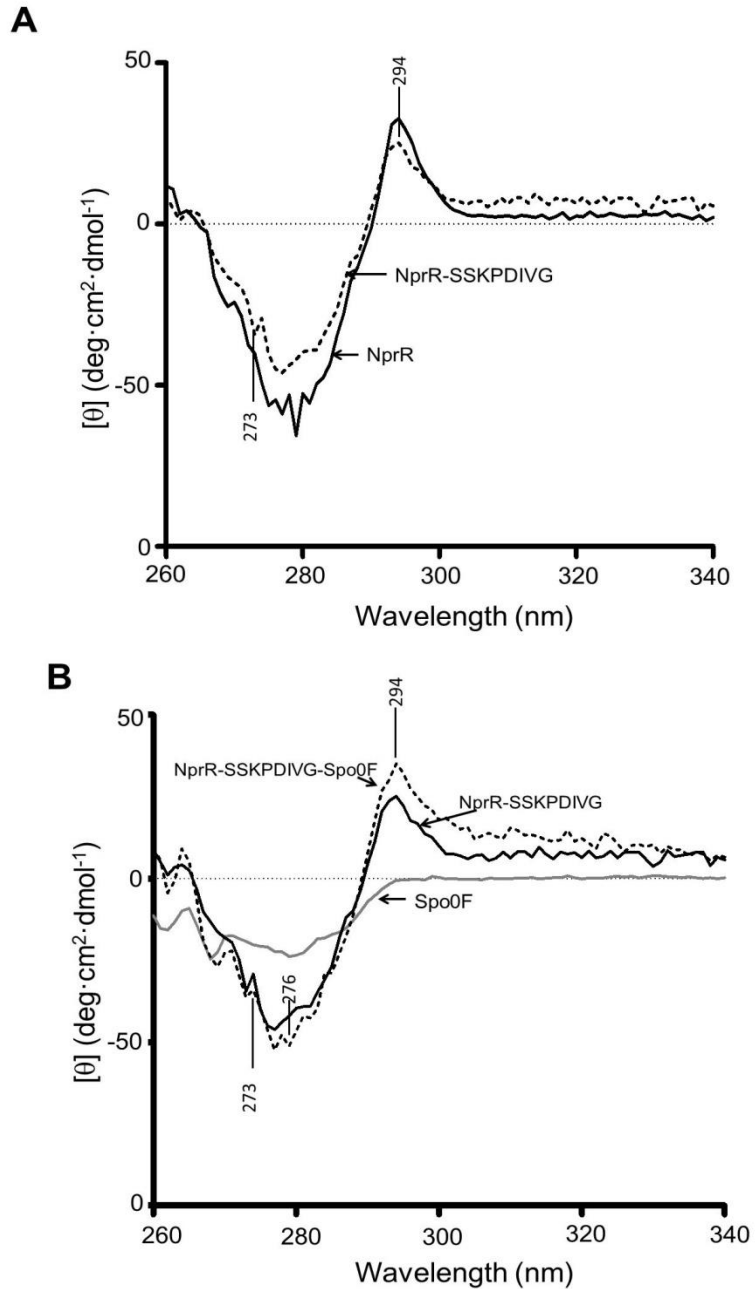
607

608

609

610

611



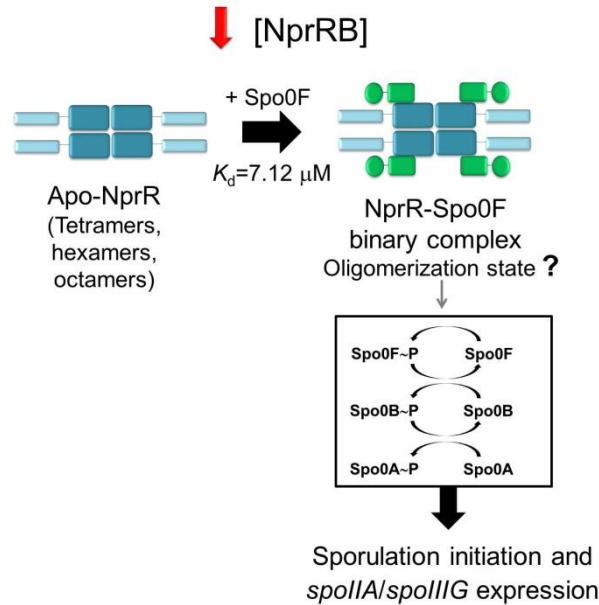
613

614 Figure 7. Interaction of NprR-NprRB binary complex with Spo0F (a) Formation of the
 615 NprR-NprRB binary complex. Comparison between NprR and NprR-NprRB near-UV
 616 CD spectra (b) Formation of the NprR-NprRB-Spo0F ternary complex. Differences
 617 spectra for each complex (NprR-NprRB and NprR-NprRB-Spo0F) are indicated with the
 618 corresponding wavelength.

619

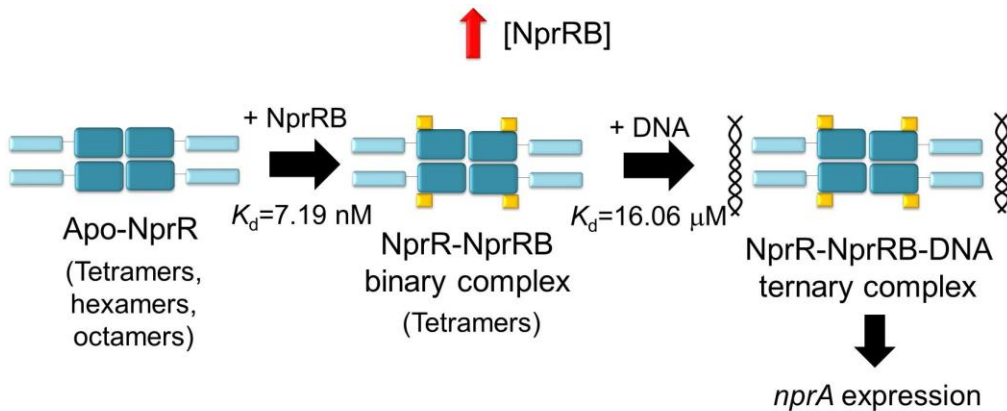
620 Figure 8

621 **A**



622

623 **B**



624

625 Figure 8. Proposed model to explain the molecular mechanism of NprR as a bi-
626 functional protein on function of NprRB concentration (A) At low NprRB concentration
627 Spo0F binds to NprR with a $K_d = 7.12 \mu\text{M}$, allowing the phosphate flux through the
628 phosphorelay. The outcome of the phosphorelay is the normal timing of sporulation
629 initiation and *spoIIA/spoIIIG* expression [14] (B) When the peptide concentration
630 increases, the NprR-NprRB complex formation is favored with $K_d = 7.19 \text{ nM}$. This
631 interaction favors the binding of NprR to DNA in the neutral protease promoter (*nprA*)
632 with $K_d = 16.1 \mu\text{M}$. NprR-NprRB complex activates the *nprA* expression [6].