



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

**FENOTIPOS RELACIONADOS CON EL SISTEMA DE QUORUM
SENSING NprR-NprRB EN *Bacillus thuringiensis***

Por:

Ernesto Gallardo Espinoza

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Ernesto Gallardo Espinoza, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias



Dra. Mayra de la Torre
Director de Tesis



Dra. Gabriela Ramos
Asesor



Dra. Gabriela Olmedo
Asesor

Dra. Evelia Acedo
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten 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

Agradezco a CONACYT por el apoyo prestado durante el posgrado, el cual fue de gran importancia para poder realizarlo.

Gracias al CIAD por darme la oportunidad de realizar este posgrado y formar parte de esta institución, por los conocimientos y experiencias adquiridas.

A CONACYT por el financiamiento del proyecto #180246, el cual otorgo los recursos para que se pudiera llevar al cabo este proyecto.

A la Dra. Mayra de la Torre por permitirme formar parte de su grupo de trabajo a lo largo de estos años, por su ayuda y asesorías tan importantes, por su apoyo en todo momento, muchas gracias Dra.

A la Dra. Gabriela Ramos, por su asesoramiento y consejos a lo largo de este proyecto que ayudaron a aumentar su calidad, a la Dra. Gabriela Olmedo por siempre hacerse de tiempo para atenderme, y apoyarme en la elaboración de esta investigación, a la Dra. Evelia Acedo, por sus consejos y apoyo, así como sus comentarios que ayudaron a mejorar este proyecto.

A mis compañeros del laboratorio de Fisiología y Bioprocesos Celular, Ana Lilia, por su ayuda, apoyo y por hacer el ambiente de trabajo agradable, a Lupita y Alfonso, por los momentos compartidos y su amistad, a Rosina por su ayuda, consejos y apoyo en todo momento que lo necesitaba, muchas gracias por todo, a Jorge Rocha por su gran ayuda, por guiarme a lo largo de este proyecto, por compartir su conocimiento y experiencia, por su gran colaboración en este proyecto, muchas gracias.

A los laboratorios de microbiología de la Dra. Verónica Mata y al de Inmunología del Dr. Jesus Hernandez, por facilitarme su equipo e instalaciones cuando se requirió.

A mis compañeros y amigos que hicieron esta etapa más grande: Tatty, Aaron, Karla, Esme, Majo, Roger, Jonna, Jorge, Martin, Juan, Anna, gracias por todo.

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado a mis padres, los cuales son el ejemplo y el motivo de todo lo que he logrado y mis metas a futuro, gracias por todo el apoyo y siempre respaldar mis decisiones, no tengo palabras para agradecer todo lo que me han dado, gracias por ser los mejores.

A mi hermano Gonzalo, por ser un gran hermano y siempre apoyarme, siempre estar ahí cuando lo necesito, por siempre tener unas palabras de aliento cuando lo necesitaba, por siempre creer en mi, muchas gracias.

A Paty, mi hermana que siempre esta ahí para cuidarme y ayudarme en lo que necesito, gracias por todo, te debo mucho.

A mi gran familia, que siempre ha estado orgullosa de mi, que siempre me ha apoyado en mis decisiones y ha creído en mi, esa gran familia que tanto tiene que ver en lo que me he convertido como persona, muchas gracias.

A mi esposa Nancy, que siempre hemos compartido metas y logros, siempre ha estado a mi lado apoyándome con su amor, por ti siempre he querido ser algo mas, gracias por tu comprensión, apoyo y amor, eres la mejor, te amo.

CONTENIDO

	Página
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tablas.....	ix
Resumen.....	x
Abstract.....	xi
Capítulo I. Introducción.....	1
Capítulo II. Antecedentes.....	4
2.1 <i>Bacillus thuringiensis</i>	4
2.1.1 Proteínas Cry.....	4
2.1.2 Esporulación.....	5
2.2 <i>Quorum Sensing</i>	7
2.2.1 Mecanismo de Acción de Quorum Sensing.....	8
2.2.2 Familia de Receptores RNPP.....	9
2.2.2.1 RAP fosfatasa.....	10
2.2.2.2 PrgX.....	11
2.2.2.3 PlcR.....	11
2.2.2.4 NprR.....	12
2.3 Sistema NprR-NprRB.....	13
Capítulo III. Hipótesis Y Objetivos.....	15
3.1 Hipótesis.....	15
3.2 Objetivos.....	15
3.2.1 Objetivo General.....	15
3.2.2 Objetivos Particulares.....	15
Capítulo IV. Materiales Y Métodos.....	17
4.1 Cepas utilizadas.....	17
4.1.1 Complementación Genética de la Mutante.....	17
4.1.2 Fusiones Transcripcionales <i>cry1Aa'Z</i> y <i>spollA'Z</i> en Cepa Silvestre y Mutante $\Delta nprR-nprRB$	19
4.2 Búsqueda de Fenotipos alterados en la mutante $\Delta nprR-nprRB$	19
4.2.1 Proteasa Neutra.	20
4.2.2 Esporulación.....	20
4.2.3 Transcripción de <i>SpollA</i>	21
4.2.4 "Swarming"	21
4.2.5 "Swimming"	21
4.2.6 Formación de biopelícula.....	22
4.2.7 Transcripción de <i>cry1Aa</i>	22
4.3 Evaluación de la Complementación Genética de la Mutante en los Fenotipos Alterados por la Mutación $\Delta nprR-nprRB$	23
4.4 Ensayos con Péptidos Sintéticos.....	23
Capítulo V. Resultados Y Discusión.....	25

CONTENIDO (continuación)

	Página
5.1 Cepas Transformadas	25
5.2 Efecto de la eliminación de <i>nprR-nprRB</i> en los fenotipos de Bt.	27
5.2.1 Proteasa neutra.....	27
5.2.2 Esporulación.....	28
5.2.3 Transcripción de SpollA	28
5.2.4 “Swarming”	31
5.2.5 “Swimming”	32
5.2.6 Formación de biopelícula.....	33
5.2.7 Expresión de cry1Aa	34
5.3 Complementación Genética de la Mutante $\Delta nprR-nprRB$	36
5.4 Restablecimiento de Fenotipos de Proteasa Neutra NprA en Bt <i>\Delta nprR-nprRB</i> [pNprR] y <i>\Delta nprR-nprRB</i> [pNprR Δ HTH] Añadiendo Péptidos Sintéticos.....	38
Capítulo VI. Conclusiones.....	41
Bibliografía.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Representación esquemática de las proteínas de la familia RNPP.....	9
2	Esquema del cassette NprR-NprRB en el genoma de Bt y región a partir de la cual se diseñaron los péptidos sintéticos.....	24
3	Amplificación de los fragmentos NprR-NprRB y NprR, en las cepas transformadas.....	26
4	Doble digestión del plásmido pHTcry1A2 y amplificación de <i>spolIA</i>	26
5	Actividad de proteasas en cepas de <i>B. thuringiensis</i>	27
6	Evolución del número de esporas con respecto al tiempo de incubación.	29
7	Expresión de <i>spolIA</i> en la cepa Bt8741[<i>SpolIA'Z</i>] y $\Delta nprR$ - <i>nprRB</i> [<i>SpolIA'Z</i>].....	30
8	“Swarming” de las cepas de Bt.....	31
9	“Swimming” de las cepas de	32
10	Capacidad de formación de biopelícula de la cepas silvestre (WT) y mutante $\Delta nprR$ - <i>nprRB</i>	33
11	Expresión de <i>cry1Aa</i> en la cepa Bt8741[<i>Cry1Aa'Z</i>] y $\Delta nprR$ - <i>nprRB</i> [<i>Cry1Aa'Z</i>].....	35
12	Actividad de proteasa neutra de las cepas de Bt. Silvestre (WT), mutante $\Delta nprR$ - <i>nprRB</i> y las cepas complementadas.....	36
13	Porcentaje de esporulación de las cepas transformadas con respecto a la cepa silvestre después de 10 h de la fase de transición.....	38
14	Efecto sobre la actividad de proteasas de la adición de diferentes péptidos sintéticos a las cepas silvestre Bt8741 (WT), mutante $\Delta nprR$ - <i>nprRB</i> (ΔRB) y la cepa $\Delta nprR$ <i>nprRB</i> [pNprR] (pNprR).....	39
15	Efecto sobre la actividad de proteasas de la adición de diferentes péptidos sintéticos a las cepas transformadas.....	40

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Cepas silvestres y transformadas utilizadas	18

RESUMEN

NprR es una proteína de la familia de receptores de quórum sensing RNPP, funciona como un regulador transcripcional y es activado por su péptido de señalización NprRB. El regulón de NprR-NprRB incluye genes involucrados en la resistencia a condiciones de estrés y antibióticos, genes que codifican para el sistema oligopéptido permeasa (Opp) y genes que codifican para enzimas degradativas, y hay además evidencias que indican que NprR participa en la esporulación. En este estudio evaluamos algunos fenotipos que podrían ser afectados en una mutante *BtΔnprR-nprB*. Posteriormente se expresaron los genes *nprR-nprRB* y variantes de este sistema de quórum sensing en dicha mutante para tratar de restablecer los fenotipos alterados. Así mismo se evaluó la adición de péptidos sintéticos en la mutante transformada sólo con el gen silvestre *nprR* o con un gen al que se le deletó la secuencia del dominio de unión a DNA (*nprRΔHTH*), en la complementación de la mutante. Los fenotipos de esporulación, actividad de proteasa neutra, “swarming”, formación de biopelícula y expresión de la proteína CryIAa se vieron afectados por la mutación. Los fenotipos de proteasa neutra y esporulación fueron complementados mediante la expresión de los genes *nprR-nprRB* a partir del plásmido pMAD con la construcción *nprR-nprRB*. La expresión del gen *nprRΔHTH* junto con *nprRB* restableció el fenotipo silvestre de esporulación, evidenciando una función de NprR independiente de su función como regulador transcripcional. Así mismo, los resultados de expresión de Cry1Aa, muestran que NprR probablemente es un represor de Cry1Aa, al observarse en la cepa mutante una mayor expresión de Cry1Aa en comparación con la cepa silvestre.

La restauración del fenotipo de actividad de proteasa neutra con los péptidos sintéticos SKPDIVG y SSKPDIVG en la cepa *ΔnprRnprRB[pNprR]*, indica que ambos péptidos son activos y sugiere que más de un único péptido de señalización codificado en *nprRB* es funcional.

Palabras Clave: Quorum Sensing, NprR, *Bacillus thuringiensis*, Esporulación.

ABSTRACT

NprR is a protein that belongs to the family of quorum sensing receptors RNPP. NprR is a transcriptional regulator activated by its signal peptide NprRB. The NprR-NprRB regulon includes genes involved in resistance to stress conditions and antibiotics, genes encoding the oligopeptide permease system (Opp), and genes encoding degradative enzymes. There is also evidence that NprR is involved in sporulation. In this study we evaluated some phenotypes that could be affected in a mutant *BtΔnprR-nprRB*. We evaluated the phenotypes of different constructions in a mutant background where plasmids with different combinations of *nprR-nprRB* genes were evaluated for their ability to restore the wild type phenotype. Likewise synthetic peptides were added to the mutant strains transformed only with the wild type gene *nprR* or with a gene where the sequence of the DNA binding domain was removed (*nprRΔHTH*) to assessed complementation of the mutant. The mutation affected phenotypes of sporulation, neutral protease activity, "swarming", biofilm formation and expression of CryIAa protein. The phenotypes of neutral protease and sporulation were complemented in the mutant *BtΔnprR-nprRB* mutant by expression of the *nprR-nprRB* genes. Also *nprRΔHTH –nprRB* genes restored the wild type sporulation phenotype, evidencing a second function of NprR, which is independent of its function as a transcriptional regulator.

Likewise, the assay of *cry1Aa* expression shows that NprR may be a repressor of Cry1Aa,

Both, synthetic peptides SSKPDIVG and SKPDIVG restored the neutral protease production phenotype in *ΔnprRnprRB*[pNprR] strain, indicating that both peptides are active and suggesting that more than one signal peptide coded in *nprRB* is functional.

Keywords: Quorum Sensing, NprR, *Bacillus thuringiensis*, Sporulation.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

Los sistemas de quorum sensing (QS) son sistemas de comunicación célula – célula que permiten la regulación de la expresión génica bacteriana en respuesta a la densidad celular. La base del mecanismo es la producción, secreción, y detección de pequeñas moléculas de señalización. La concentración de estas moléculas se correlaciona con la concentración de microorganismos y cuando se alcanza un umbral de densidad celular, y por ende de concentración del elicitor, se presenta el fenómeno de quorum. Entonces los microorganismos responden a las señales a través de un cambio coordinado en sus perfiles de expresión génica. Procesos bacterianos como la secreción de factores de virulencia, formación de biopelículas, esporulación, desarrollo de competencia, bioluminiscencia, conjugación y producción de metabolitos secundarios, están regulados por QS (Bassler & Losick 2006).

Mediante la regulación de la expresión génica de acuerdo a la densidad de población, el QS permite a las bacterias coordinar su comportamiento como una comunidad entera y podría haber sido uno de los primeros pasos en el desarrollo de la multicelularidad (Waters & Bassler, 2005). Las bacterias Gram positivas utilizan como moléculas de señalización oligopéptidos derivados del procesamiento de pequeñas proteínas específicas. A los péptidos de señalización de les denomina también péptidos autoinductores o AIPs (por sus siglas en inglés) (Bassler & Losick 2006; Novick & Geisinger 2008).

En el grupo de bacterias *B. cereus*, que incluye entre otros a *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus cereus*, existe una familia de proteínas sensoras citoplásmicas de QS que se unen directamente a su péptido de señalización, denominada RNPP, por las iniciales de las proteínas que la constituyen: Rap/ NprR/ PlcR/ PrgX (Declerck *et al.*, 2007; Rocha-Estrada *et al.*, 2010). Las proteínas receptoras de esta familia comparten gran similitud estructural y de éstas, NprR además de ser un regulador transcripcional, tiene similitud estructural con las Rap que se unen a proteínas reguladoras de respuesta para regular el flujo de fosfatos en la cascada de señalización llamada “phosphorelay” (Perchat *et al.*, 2011, Perego, 2001) La activación de la transcripción de la proteína reguladora NprR y su péptido de señalización NprRB comienza en el inicio de la fase estacionaria (Dubois *et al.*, 2013). NprR cuenta en su estructura con un dominio de unión a DNA y otro de unión a péptidos y proteínas. Ha sido descrita como el regulador transcripcional de la proteasa neutra (NprA) (Perchat *et al.*, 2011) y recientemente se ha propuesto como regulador de enzimas degradativas, y de genes involucrados en la resistencia a estrés por parte de la bacteria, esto en base a su regulón (Dubois *et al.*, 2013). NprRB se secreta como un péptido de 19 aminoácidos, y es procesado extracelularmente antes de ser reimportado a la célula bacteriana. La secuencia correspondiente al péptido de señalización maduro es una secuencia interna del péptido inmaduro exportado (Rocha *et al.*, 2011, Pottathil & Lazazzera., 2003).

Rocha *et al.*(2011) encontraron evidencia científica de que el sistema NprR-NprRB podría estar implicado en el mecanismo de regulación de la esporulación en *Bacillus thuringiensis*, y en la regulación de la expresión de proteínas Cry. Observaron que los pentapéptidos sintéticos SKPDI (codificado en *nprRB*) y sus variantes SKPDT, SAPDT aumentan sutilmente la expresión de *cry1Aa* y los péptidos de mayor longitud YSSKPDI, SKPDIVG, SSKPDIV, SSKPDIVG, y YSSKPDIVG, codificados en *nprRB*, la disminuyen. Caso contrario ocurrió en la esporulación, donde los pentapéptidos no tuvieron efecto

y los péptidos de mayor longitud la aumentaban y aceleraban la aparición de esporas. Lo anterior es un indicio de que la longitud y secuencia del péptido de señalización maduro (NprRB) influye en la función del sistema NprR - NprRB (Rocha *et al.*, 2011).

Respecto a la especificidad péptido de señalización-proteína sensora, en el caso de proteínas Rap, cuyos péptidos están codificados en los genes *phr* en el genoma de *B. subtilis*, se han identificado genes que codifican para 11 Rap fosfatasas y 8 Phr. En el caso de *B. thuringiensis israelensis*, en su genoma hay secuencias putativas para 8 Rap y 4 Phr, lo que nos lleva a sugerir que no todas las proteínas Rap son proteínas de QS, o bien, que estas Rap pudieran ser activadas por péptidos provenientes de otros genes *phr*. Se ha encontrado en algunos casos que el péptido de señalización codificado en un gene *phr* llega a unirse a 2 proteínas Rap diferentes como en el caso de PhrC que se une a las proteínas RapC y RapD (Anderson *et al.*, 2005.).

Así mismo, en el caso de la proteína PrgX participan 2 péptidos de señalización, siendo el péptido de señalización cCF10 (LVTLVFV) un activador y el péptido iCF10 (AITLIFI) un represor, los cuales son codificados en diferentes genes y actúan sobre un individuo (célula bacteriana) diferente del que la produjo (Kozłowicz *et al.*, 2006).

Observando que NprR podría estar interviniendo en otros procesos a parte de la regulación transcripcional de los genes que integran su regulón, la pregunta a responder es: ¿NprR participa en otros fenotipos regulados por quórum sensing y el péptido SKPDIVG, que es necesario para la función de NprR como activador transcripcional de NprA, se requiere también para las funciones de NprR relacionadas con la regulación del inicio de la esporulación, o bien se necesitan péptidos diferentes para esas funciones?.

CAPITULO II

ANTECEDENTES

2.1 Bacillus thuringiensis

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria Gram-positiva, la cual pertenece al grupo de bacterias *Bacillus cereus*, que incluye además a *B. cereus*, *B. mycoides* y *B. anthracis*. Bt es una bacteria con propiedades bioinsecticidas y es el agente entomopatígeno más utilizado en el control biológico de plagas.

Bacillus thuringiensis (Bt), produce un cristal paraesporal durante la fase de esporulación, que es el responsable de la actividad bioinsecticida. El cristal está constituido por δ -endotoxinas también conocidas como proteínas Cry, estas toxinas son altamente específicas contra insectos plaga, gracias a lo cual los bioinsecticidas basados en esta bacteria tienen un impacto ambiental muy bajo (Soberón y Bravo, 2007). La expresión de la mayoría de los genes que codifican para las proteínas Cry depende de los factores sigma de la esporulación, por lo que la síntesis de las proteínas Cry está reguladas indirectamente por la esporulación.

2.1.1 Proteínas Cry

El mecanismo de acción de las proteínas Cry se ha estudiado principalmente en lepidópteros y es un proceso de múltiples etapas. Los insectos que han ingerido

los cristales y esporas de Bt presentan como síntomas: cese de la ingesta, parálisis del intestino, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte (Soberón y Bravo, 2007). Después de que los cristales son ingeridos por el insecto, éstos son solubilizados en el intestino medio del insecto, y las proteínas Cry solubilizadas son procesadas por proteasas intestinales para generar las toxinas activas que llevarán a la muerte de la larva (Bravo *et al.*, 2004). El mecanismo de acción de las toxinas Cry en los insectos es un proceso complejo que implica el contacto con los receptores de la toxina en el epitelio del intestino medio, provocando así cambios conformacionales en las moléculas de toxinas necesarias para la oligomerización y para la inserción en la membrana celular para formar poros, y finalmente matar las larvas (Portugal *et al.* 2014).

Como ya se mencionó, la producción de la mayoría de las proteínas Cry está ligada al proceso de esporulación de la bacteria, porque depende de los factores sigma de esporulación. En *B. thuringiensis* el factor σ^F se activa en la preespora y posteriormente activa a σ^{35} (σ^E) en la célula madre. Este último se requiere para la expresión a partir del promotor *Btl* de los genes que codifican para las proteínas Cry dependientes de la esporulación, como lo son los genes *cryIAa*, *cryIIA* y *cryIB*. Después de que finaliza el proceso en el cual la preespora se recubre de dos membranas, se activan σ^G en la preespora y σ^{28} (σ^K) en la célula madre. σ^{28} se encarga de activar al promotor *BtII* para continuar con la transcripción de los genes Cry (Agaisse y Lereclus, 1995). El cristal parasporal se ubica en el interior del esporangio y, por lo general, fuera del exosporio de la espora. Ambos son finalmente liberados tras la lisis celular.

2.1.2 Esporulación

La esporulación es un fenómeno muy bien estudiado en *B. subtilis*, el cual es el modelo de estudio de bacilos. El fenómeno de esporulación es un proceso de diferenciación celular que involucra la regulación de la expresión temporal y

espacial de varios genes. El inicio de la esporulación depende de la falta de fuentes de carbono, nitrógeno o fósforo (Piggot y Coote, 1976), de quorum sensing, de la replicación del ADN y de la carga energética de la célula (Schneider *et al.*, 2002).

En *B. subtilis* se sabe que las bacterias pueden detectar señales metabólicas y ambientales, para después integrarlas a un sistema de transferencia secuencial de fosfatos, llamado “phosphorelay” (Hilbert y Piggot, 2004). El sistema está compuesto por histidinas cinasas (HCs), aspartil fosfato fosfatasas pertenecientes a la familia de las Rap-fosfatasas, fosfotransferasas como Spo0B y reguladores de respuesta (RR) como Spo0F y Spo0A (Fujita y Losick, 2005). En *B. subtilis* las HCs que intervienen en el “phosphorelay” son Kin A, B, C, D y E (Jiang *et al.*, 2000). Las de mayor importancia son las 3 primeras ya que participan en el inicio de la esporulación (Kobayashi *et al.*, 1995). Diversas señales provocan que las HCs sean fosforiladas en un residuo conservado de histidina, para luego transferir el grupo fosfato a un residuo conservado de aspartato en el RR Spo0F. Spo0F es incapaz de activar la transcripción ya que carece de un dominio de unión a ADN (Molle *et al.*, 2003). Lo que sucede es que Spo0F transfiere el grupo fosfato a un residuo conservado de histidina en la fosfotransferasa Spo0B, la cual lo transfiere a su vez a un residuo conservado de aspartato localizado en el extremo amino terminal del RR Spo0A. La fosforilación de Spo0A estimula su unión al ADN. En *B. subtilis* las Rap fosfatasas A, B, y E son las encargadas de liberar grupos fosfatos de Spo0F~P (Perego, 2001), mientras que las fosfatasas Spo0E, YisI y YnzD, liberan el grupo fosfato de Spo0A~P (Perego, 2001), regulándose así los niveles de Spo0A fosforilado.

Spo0A es el regulador maestro de la esporulación, en *B. subtilis*, más de 121 genes están bajo su control, un tercio de los cuales son activados y el resto son reprimidos (Stephenson y Hoch, 2002; Molle *et al.*, 2003). Cuando la concentración Spo0A~P es baja, se reprime la transcripción del gen *abrB*, y por ende la síntesis del regulador del estado de transición AbrB, que reprime la

transcripción de genes inadecuados para la fase de crecimiento exponencial. Durante la fase de transición *Abr* reorganiza la expresión de más de 100 genes de la fase postexponencial que tienen diferentes funciones biológicas, incluyendo la formación de biopelículas, movilidad, etc (Strauch *et al.*, 1990). Cuando la concentración de Spo0A~P es alta se activan los promotores de los genes tempranos de esporulación *spolIA*, *spolIE* y *spolIG*.

2.2 Quorum Sensing

Los sistemas de quorum sensing (QS) son sistemas de comunicación célula – célula que permiten la regulación de la expresión génica bacteriana en respuesta a la densidad celular. La base del mecanismo es la producción, secreción, y detección de pequeñas moléculas de señalización. La concentración de estas moléculas se correlaciona con la concentración de microorganismos y cuando se alcanza un umbral de densidad celular, y por ende de concentración del elicitador, se presenta el fenómeno de quorum. Entonces los microorganismos responden a las señales a través de un cambio coordinado en sus perfiles de expresión génica. Mediante la regulación de la expresión génica de acuerdo a la densidad de población, el QS permite a las bacterias coordinar su comportamiento como una comunidad entera y podría haber sido uno de los primeros pasos en el desarrollo de la multicelularidad (Waters & Bassler, 2005).

Procesos bacterianos como la secreción de factores de virulencia, formación de biopelículas, esporulación, desarrollo de competencia, bioluminiscencia, conjugación, producción de metabolitos secundarios, “swimming” y “swarming” están regulados por QS (Bassler & Losick 2006). El movimiento de “swimming” es un movimiento bacteriano realizado por cada bacteria de manera independiente en medios líquidos utilizando sus flagelos, a

diferencia de “swarming” donde el conjunto de la población se desplaza de manera agrupada sobre superficies semisólidas.

2.2.1 Mecanismo de Acción de Quorum Sensing

Quorum sensing involucra la interacción de una señal difusible con un regulador transcripcional, directa o indirectamente a través de la activación de una cinasa sensora. Las moléculas de señalización de quorum sensing también suelen ser llamadas “autoinductores” debido a que regulan su propia transcripción. El quorum sensing depende de la densidad celular más que de la cantidad de bacterias (Boedicker *et al.*, 2009; Carnes *et al.*, 2009) y presenta grandes diferencias entre bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. La mayoría de los sistemas de QS de bacterias Gram (-) usan acilhomoserina lactonas (AHL) como moléculas de señalización. Éstas tienen un núcleo con un residuo de homoserina lactona unido a una cadena lateral (Bassler y Losick; 2006). La especificidad está dada por dicha cadena, la cual puede variar en longitud (4 a 18 carbonos), grado de saturación y grupos R sustituyentes.

Los oligopéptidos derivados del procesamiento de proteínas específicas de pequeño tamaño (péptidos autoinductores o AIPs) son las moléculas de señalización utilizadas por la mayoría de las bacterias Gram-positivas (Bassler y Losick 2006; Novick y Geisinger 2008). Los AIPs generalmente contienen modificaciones postransduccionales, como la generación de un residuo de triptófano, o la formación de tiolactona cíclica. Su secreción es usualmente mediada por una maquinaria de transporte de la proteína. Los AIPs secretados por la bacteria son reconocidas por histidina-quinasas transmembranales, las cuales activan vía fosforilación a un regulador de respuesta citoplasmático, involucrado en una cascada de transducción de señales, regulando la expresión de genes y modificando así el perfil de expresión de genes de la célula. A este

sistema se le denomina sistema de dos componentes (Stock *et al.*, 2000; Wolanin *et al.*, 2002).

2.2.2 Familia de Receptores RNPP

En las bacterias Gram –positivas existe una familia de proteínas sensoras citoplásmicas de QS, que se unen directamente a su péptido de señalización y regulan directa o indirectamente la expresión de grupos de genes (Rocha-Estrada *et al.*, 2010). A diferencia del sistema de dos componentes, estas proteínas no son proteínas cinasa, ni se fosforilan, pero si pueden intervenir en cadenas de transducción de señales regulando el flujo de fosfatos. La familia se denomina RNPP, por las iniciales de las proteínas que son las que la constituyen: Rap / NprR / PlcR / PrgX (Declerck *et al.*, 2007; Rocha-Estrada *et al.*, 2010). Estas proteínas tienen en su estructura varias repeticiones tetratricopéptido (TPRs), que son responsables de las interacciones proteína-proteína y proteína-péptido. NprR, PlcR y PrgX presentan en su extremo N terminal un dominio Hélice-vuelta-Hélice (HTH) de unión al ADN, como se puede observar en la Fig.- 1 (Perchat *et al.*, 2011). A pesar de sus similitudes y de que sus mecanismos de activación son muy similares, estas proteínas tienen funciones muy diferentes entre sí.

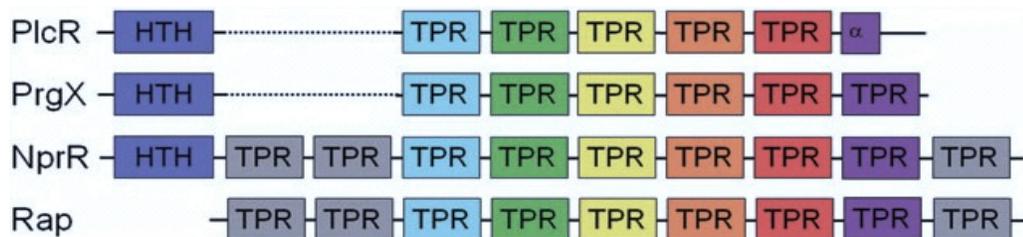


Figura 1.- Representación esquemática de las proteínas de la familia RNPP. El dominio de unión a DNA (HTH) no se presenta en las proteínas RAP. NprR y Rap cuentan con 3 repeticiones de TPR que no se presentan en PlcR y PrgX (Perchat *et al.*, 2011).

2.2.2.1 RAP fosfatasa. En *B. subtilis* se han reportado 11 Rap fosfatasa que tienen dominios en tándem de seis repeticiones tetratricopeptídicas (TPR) que promueven las interacciones proteína - proteína (Core y Perego, 2003). La función de cada Rap fosfatasa está mediada por un pentapéptido específico derivado del producto de un gen *phr*. Este gen se encuentra adyacente al gen que codifica para su Rap receptora formando cassetes de señalización de rap-phr, que se transcriben al mismo tiempo (Pottathil y Lazazzera, 2003). Después de la importación, los pentapéptidos Phr derivados inhiben la actividad de sus Raps afines.

Las proteínas Rap son de aproximadamente 375 aminoácidos ácidos de longitud, con > 25% de identidad entre sí, y tienen diferentes funciones. RapA, RapB, RapE y Rap H funcionan como reguladores negativos de la cadena de transferencia secuencial de fosfatos “phosphorelay”, que regula el inicio de la esporulación. Éstas Rap actúan desfosforilando al regulador de respuesta Spo0F, evitando con esto el inicio de la esporulación. Los péptidos de señalización Phr, al unirse a su proteína receptora inhiben la unión de ésta al regulador de respuesta Spo0F del sistema “phosphorelay”, evitando que la Rap lo desfosforile permitiendo por lo tanto el flujo de fosfatos a través del sistema hasta el regulador maestro Spo0A y regulando por ende el inicio de la esporulación (Perego, 2001). RapC regula el desarrollo de competencia mediante la modulación de la actividad del regulador de respuesta (RR) y el factor transcripcional ComA (Pottathil y Lazazzera, 2003).

Existe una gran variabilidad en las secuencias y longitud de los péptidos de señalización de las proteínas que conforman la familia RNPP, así como también llegan a presentar cierta flexibilidad en su especificidad de unión a su proteína receptora. Aunque los péptidos de señalización Phr generalmente son pentapéptidos que se originan a partir del C-terminal del propéptido, también se llegan a presentar péptidos de señalización provenientes de la región interna del propéptido de Phr, como el Phr BA3791, el cual es un pentapéptido interno. En el genoma de *B. subtilis* se han identificado genes que codifican para 11

Rap fosfatasa y 8 Phr, entonces 3 de los 11 genes rap conocidos no son seguidos por los genes *phr* funcionales. En el caso de *B. thuringiensis israelensis*, en su genoma hay secuencias putativas para ocho Rap y cuatro Phr, esto nos lleva a que no todas las proteínas Rap son proteínas de QS, pero por otro lado, como se ha visto que algunas proteínas Phr se llegan a unir a 2 proteínas Rap diferentes, estas proteínas Rap que no tienen Phr específico pudieran ser activadas por Phr codificados en los cassetes de otras Rap. (Anderson *et al.*, 2005.).

2.2.2.2 PrgX. Se sabe que PrgX está implicado en la regulación de la expresión de genes involucrados en la conjugación (Kozłowicz *et al.*, 2006). El sistema de QS de PrgX tiene la particularidad de que la señalización ocurre entre dos tipos de células diferentes. Los genes que controlan la agregación de las bacterias para la conjugación son regulados en las bacterias donadoras como respuesta a la densidad de población de las bacterias receptoras (Kozłowicz *et al.*, 2006). Además, el regulador transcripcional PrgX se une a dos diferentes péptidos de señalización: la feromona cCF10 (codificada en el cromosoma bacteriano) que lo activa y el inhibidor de iCF10 (codificado en el plásmido pCF10 de las células donantes) que lo inhibe. El receptor de la feromona sexual de *E. faecalis* está codificado en el plásmido pCF10 y tanto las bacterias donadoras como las receptoras tienen el gen cCF10 (Chandler *et al.*, 2005).

2.2.2.3 PlcR. PlcR es un regulador específico del grupo *B. cereus*. Originalmente fue descrito como un regulador pleiotrópico de los factores de virulencia extracelular, tales como la fosfolipasa C (Lereclus *et al.*, 1996). PlcR se encarga de controlar positivamente 45 genes que codifican para proteínas extracelulares, los cuales presentan funciones que están asociadas con el suministro de alimento, la protección celular, y la integración de señales. El regulón PlcR incluye enzimas, toxinas, bacteriocinas, proteínas sensoras, y

proteínas involucradas en sistemas de transporte (Gohar *et al.*, 2008). El péptido de señalización de PlcR se deriva de la proteína PapR, cuyo gen se localiza inmediatamente río abajo de PlcR. Dado que el sistema PlcR-PapR regula un gran número de procesos implicados en la patogénesis del grupo *B. cereus*, que incluye a patógenos tanto de humanos como de insectos, la comprensión y la ingeniería de este sistema tiene un impacto en la biotecnología y en la salud humana (Rocha-Estrada *et al.*, 2010).

2.2.2.4 NprR. NprR es un regulador transcripcional cuya actividad depende de la unión de su péptido de señalización NprRB (llamado también NprX), el gen que codifica para NprRB se encuentra adyacente a NprR formando el cassette NprR-NprRB (Perchat *et al.*, 2011). Fue descrito originalmente como el regulador de la proteasa neutra (también llamada NprA) en *B. subtilis* (Uehara *et al.*, 1974) y en los últimos años se ha visto que el regulador de proteasa neutra (NprR) de alguna manera puede estar interviniendo en la regulación de la esporulación y expresión de genes *cry* (Aceves-Diez *et al.*, 2007 y Rotcha *et al.*, 2012).

Asimismo se ha descrito que NprR interviene en la regulación de alrededor 40 genes adicionales que codifican para proteínas implicadas en el suministro de nutrientes, el estrés y la resistencia a los antibióticos, y en la síntesis de un lipopéptido (Kurstakin) el cual es esencial para la capacidad de movimiento “swarming” y para la formación de biopelículas (Dubois *et al.*, 2012). Experimentos *in vivo* con larvas de insectos indican que estos genes se expresan después de la muerte del huésped permitiendo que las bacterias del grupo *B. cereus* sobrevivan y esporulen en el cadáver del insecto (Dubois *et al.*, 2012).

2.3 Sistema NprR-NprRB

La activación de la proteína de quórum sensing NprR requiere la unión de su péptido de señalización NprRB, la transcripción de ambos es activada al inicio de la fase estacionaria. Sin embargo, se ha reportado que en la fase estacionaria tardía, *nprRB* es transcrito independientemente de *nprR* (Dubois *et al.*, 2013). El péptido de señalización NprRB primeramente es secretado en su forma inmadura como un péptido de 19 aminoácidos. Después es procesado extracelularmente a su forma madura, presumiblemente a un heptapéptido (SKPDIVG) o un octapéptido (SSKPDIVG); los cuales son secuencias de la región interna del péptido de señalización inmaduro que es exportado (Perchat *et al.*, 2011, Cabrera *et al.*; datos no publicados).

Como se mencionó anteriormente, el sistema NprR-NprRB está implicado en la regulación de varios genes por su función de regulador transcripcional, y recientemente se ha sugerido que podría estar implicado en la regulación de la esporulación participando en el llamado “phosporelay” en *Bacillus thuringiensis*; también en la regulación de la expresión de proteínas Cry. Lo anterior se deduce en base a resultados obtenidos en ensayos mediante la adición de péptidos sintéticos codificados en la región exportada del péptido de señalización NprRB, en los que se prueba que los pentapéptidos aumentan sutilmente la expresión de *cry1Aa*, mientras que los péptidos de mayor longitud la disminuyen. Sin embargo, en el caso del fenómeno de esporulación, ocurrió lo contrario. Los pentapéptidos no tuvieron efecto y los péptidos de mayor longitud incrementaron la eficiencia de esporulación y aceleraron la aparición de esporas. Esto nos lleva a pensar que la función del sistema NprR-NprRB es influenciada o determinada por la longitud y secuencia del péptido de señalización maduro (NprRB) (Rocha *et al.*, 2011).

Otros estudios indican que el sistema NprR-NprRB podría estar implicado en funciones adicionales a las ya reportadas. Por ejemplo, Wang *et al.*

(2010), mostraron resultados donde una cepa mutante de *Bacillus thuringiensis* con la delección del gen que codifica para NprR ($\Delta nprR$), presentaba niveles de actividad más altos de expresión y transcripción del gen *cry1Ac*, en comparación con la cepa silvestre. Asimismo, se ha observado que cepas de *B. anthracis* con mutaciones en el gen de NprR son deficientes en esporulación (Yang *et al.* 2011). Dubois *et al.* (2012) encontraron en mutantes $\Delta nprR-nprRB$ que este sistema es importante para la sobrevivencia de la bacteria después de la muerte del insecto infectado y que 41 genes están regulados por este sistema. El operón incluye genes involucrados en la resistencia a condiciones de estrés y antibióticos, genes que codifican para el sistema oligopéptido permeasa (Opp), y genes que codifican para enzimas degradativas, donde destacan la regulación de genes que codifican para proteínas que participan en la síntesis de ciertos lipopéptidos, como el llamado Kurstakin, el cual se ha visto que es necesario para que se lleve a cabo el movimiento de swarming y la formación de biopelículas de forma eficiente. Sin embargo es importante destacar que ninguno de los genes del operón está involucrado en esporulación.

En base a estos antecedentes, es importante evaluar si el sistema NprR interviene en fenotipos que se sabe están regulados por quórum sensing, especialmente los relacionados con el inicio de la esporulación de la bacteria y con genes reportados en el regulón de NprR.

CAPITULO III

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 Hipótesis

La eliminación de los genes *nprR-nprRB* de *Bacillus thuringiensis* afecta, además de la esporulación y la expresión de la proteasa NprA, otros fenotipos relacionados con quorum sensing.

3.2 Objetivos

3.2.1 General

Evaluar el efecto de la eliminación de los genes *nprR-nprRB* de *Bacillus thuringiensis* sobre fenotipos relacionados con quorum sensing y la complementación con el cassette completo o cada uno de los genes que lo integran.

3.2.2 Particulares

- Evaluar diferencias entre las cepas Bt8741 y Bt Δ *nprR-nprRB* en los fenotipos de actividad de proteasas extracelulares, esporulación,

formación de biopelículas, “swarming”, “swimming” y expresión de *cry1Aa*.

- Evaluar la participación del gen *nprRB* y del dominio de unión a DNA de la proteína NprR en los fenotipos alterados.
- Evaluar la participación/efecto de péptidos codificados en *nprRB* en la restauración de los fenotipos alterados.

CAPITULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cepas Utilizadas

Para el desarrollo de este proyecto se utilizaron las cepas Bt 8741 (*Bacillus thuringiensis* serovar *thuringiensis*) y una cepa mutante derivada de Bt 8741 denominada $\Delta nprR-nprRB$. Esta cepa contiene el intercambio alélico $spcR:nprR-nprRB$, y fue construida anteriormente en nuestro grupo de trabajo (**Tabla 1**).

4.1.1 Complementación Genética de la Mutante

Se realizaron ensayos de complementación genética de la mutante con plásmidos *pMAD* que contenían las regiones *nprR-nprRB* o *nprR* solamente, o las mismas construcciones pero con el gen *nprR* truncado, sin el dominio de unión a DNA (HTH) $nprR\Delta HTH - B$ y $nprR\Delta HTH$, obteniéndose las cepas $\Delta nprR-nprRB[pNprR-NprRB]$, $\Delta nprR-nprRB[pNprR]$, $\Delta nprR-nprRB[pNprR\Delta HTH-NprRB]$ y $\Delta nprR-nprRB[pNprR\Delta HTH]$ respectivamente (**Tabla .1**).

Para transformar a la bacteria se utilizó la técnica de electroporación, para lo cual se prepararon células electro-competentes de Bt8741 creciéndolas primeramente en medio BHI a DO600 de 0.9. Luego, las células se enfriaron en hielo y se lavaron 3 veces con agua deionizada a 4°C. El sedimento celular se resuspendió en PEG 600 al 40% refrigerado (Fluka Analytical, MO, USA) y se prepararon alícuotas de 400 μ L. Las células electro-competentes Bt8741 se

electroporaron inmediatamente con un solo pulso de 2.3 kV, 475 Ω y 25 mF en un Electro Manipulador celular (ECM 630, Harvard Apparatus, Holliston, MA, EE.UU.). Se recuperaron las células en BHI durante 3 h y luego fueron sembradas en placas de agar BHI con eritromicina. Las cepas transformadas se seleccionaron a partir de su resistencia al antibiótico eritromicina, que le confiere el plásmido pMAD, seleccionándose las colonias que habían crecido para después realizarse PCR buscando los fragmentos *nprR-nprRB*, *nprR*, *nprR Δ HTH – B* y *nprR Δ HTH*, correspondientes a cada cepa complementada en particular, para confirmarla complementación deseada.

Tabla 1.- Cepas silvestres y transformadas utilizadas.

Nombre	Plásmido	<i>nprR</i>	<i>nprR(ΔHTH)</i>	<i>nprRB</i>
Bt8741		Genoma	-	genoma
<i>ΔnprR-nprRB</i>		-	-	-
<i>ΔnprR-nprRB</i> [pNprR-NprRB]	pMADR-B	en plásmido	-	en plásmido
<i>ΔnprRnprRB</i> [pNprR]	pMADR	en plásmido	-	-
<i>ΔnprR-nprRB</i> [pNprR Δ HTH-NprRB]	pMADR Δ HTH-B	-	en plásmido	en plásmido
<i>ΔnprR-nprRB</i> [pNprR Δ HTH]	pMADR Δ HTH	-	en plásmido	-
Bt8741[Cry1Aa'Z]	pHTcryIA2	Genoma		genoma
<i>ΔnprR-nprRB</i> [Cry1Aa'Z]	pHTcryIA2			
Bt8741[SpoIIA'Z]	pHTspoIIA-Z	Genoma		genoma
<i>ΔnprR-nprRB</i> [SpoIIA'Z]	pHTspoIIA-Z			

4.1.2 Fusiones Transcripcionales *cry1Aa'Z* y *spollA'Z* en Cepa Silvestre y Mutante $\Delta nprR-nprRB$

Se utilizó el plásmido pHTcryIA2, el cual es un vector que incluye los orígenes de replicación *oriC* y *ori1030*, que son funcionales para *Escherichia coli* y *B. thuringiensis*, respectivamente, el gen *ermC* para la resistencia a eritromicina, y una fusión de *lacZ* con un fragmento de 362 pb, que contiene la región promotora de *cry1Aa* que incluye los promotores Btl y BtII (Bravo *et al.* 1996).

Para la fusión transcripcional *cry1Aa'Z*, el plásmido fue transformado por medio de electroporación en las cepas mutante y silvestre de *B. thuringiensis*, obteniéndose las cepas $\Delta nprR-nprRB$ [Cry1Aa'Z] y Bt8741[Cry1Aa'Z] respectivamente (**Tabla .1**).

Para realizar la fusión transcripcional *spollA'Z*, el plásmido fue cortado con las enzimas de restricción BamH1 y HinDIII para eliminar el inserto *cry1Aa* de la fusión *cry1Aa – lacZ*, esto nos permitió hacer una ligación con el promotor de *SpollA* y *lacZ*, obteniendo el plásmido pHTSpollA-Z.

El plásmido obtenido se transformó en las células silvestre y la mutante $\Delta nprR-nprRB$, obteniéndose las cepas Bt8741[SpollA'Z] y $\Delta nprR-nprRB$ [SpollA'Z] respectivamente.

Las cepas transformadas fueron crecidas en placas BHI con eritromicina, y se seleccionaron las colonias que crecieron, se extrajo el DNA plasmídico y se realizó PCR con primers específicos para el promotor de *SpollA* y *Cry1Aa*, para cada cepa respectivamente, para verificar la correcta transformación de cada cepa (**Tabla .1**)

4.2 Búsqueda de Fenotipos Alterados en la Mutante $\Delta nprR-nprRB$

Se compararon los fenotipos actividad de proteasa neutra extracelular, esporulación, expresión de proteínas Cry, “Swarming”, “Swimming” y

formación de biopelícula de las cepas mutante $\Delta nprR-nprRB$ y silvestre Bt 8741, de acuerdo a la siguiente metodología:

4.2.1 Proteasa Neutra

Las cepas silvestre y mutante fueron crecidas previamente en medio LB (Becton, Dickinson and Company, NJ USA) durante 16 h, a 30°C y 250 rpm. Después se colocó una gota de 1 μ L del inóculo de cada cepa en tres zonas separadas de una misma placa de Petri con agar nutritivo (Becton, Dickinson and Company, NJ USA) suplementado con 5% de leche descremada en polvo. Las placas se incubaron a 30° C durante 24 h.

4.2.2 Esporulación

Se realizaron preinóculos en matraces que contenían 30 mL de caldo nutritivo, con 400 μ L de la cepa de *B. thuringiensis* $\Delta nprR-nprRB$ (preservada a -70°C) o con un disco estéril conteniendo 10⁸ esporas de la cepa Bt 8741. Los matraces se incubaron en un agitador a 30° C y 300 rpm durante 10 h y después se realizó un pase, colocando 1mL del inóculo en matraces con medio para esporulación SSM de acuerdo a Kreuser *et al.* (2003). El crecimiento se determinó por absorbancia con luz roja (Photoelectric Colorimeter 800-3, Klett Summerson, NY, USA), cada hora hasta llegar a la fase de transición (80 unidades Klett), la cual fue considerada como tiempo 0 (t_0), a partir de ahí se tomó 1 mL del cultivo cada hora. Para la cuenta viable de esporas, las muestras se sometieron a un tratamiento térmico a 80° C por 10 min, posteriormente se hicieron diluciones seriales con Tween 80 al 0.05 %. Las diluciones se sembraron en placas con agar LB (Becton, Dickinson and Company, NJ USA), las placas se incubaron a 30° C durante 24 h. (Acevez-Diez *et al.*, 2007).

4.2.3 Transcripción de *SpollA*

Las células Bt8741[*SpollA'*Z] y $\Delta nprR$ -*nprRB*[*SpollA'*Z] que contenían el plásmido pHT*SpollA*-Z fueron incubadas en medio LB durante 16 h, para después resembrar 400 μ L de este pre inoculo en matraces con 30 mL de medio SSM, los matraces se colocaron a 30° C. El crecimiento se midió cada hora, a partir de la fase de transición (80 unidades Klett), la cual fue considerada como tiempo 0 (t_0). A partir de ahí se tomó 1 mL del cultivo cada h, hasta llegar a la hora 9, después de transición (t_9). Se realizó el ensayo de β -galactosidasa a las muestras, de acuerdo al método de Miller's (Miller 1992).

4.2.4 “Swarming”

El ensayo para “swarming” se realizó en una placa con agar LB (0.7 % de agar) (Becton, Dickinson and Company), la cual no presentaba rastros de agua en la superficie. Se colocó en el centro de una placa de 1 – 3 μ L de caldo LB con $\Delta nprR$ -*nprRB* y otra placa con Bt8741, las cuales fueron cultivadas previamente en caldo LB durante 16 h a 30°C y 250 rpm. Las placas fueron incubadas a 30° C durante 36 h, para después observarse el fenómeno de movimiento característico de “Swarming”. El ensayo se realizó por triplicado (O'May *et al.* 2011).

4.2.5 “Swimming”

El ensayo de “swimming” se realizó de la misma manera que el de “swarming” en placas con agar LB (Becton, Dickinson and Company) pero con 0.3 % de agar, para que se pudiera observar el movimiento característico del fenómeno

de “Swimming”. Las placas fueron incubadas durante 20 h a 30° C. Se realizaron 3 repeticiones en el ensayo (O’May *et al.* 2011).

4.2.6 Formación de biopelícula

La formación de biopelícula se midió por medio del método de tinción con cristal violeta, para lo cual se cultivó un pre-inóculo de la cepa de Bt8741 o de la cepa mutante $\Delta nprR-nprRB$ en medio LB (Becton, Dickinson and Company) y en agitación a 30° C, hasta llegar a fase de crecimiento estacionario (DO600). Se realizaron diluciones del cultivo y se inoculó con 200 μ L del cultivo por pocillo de una placa “multiwell” de 96 pocillos (MICROTEST Tissue Culture Plate 96, BD Falcon, NJ USA) (cada cultivo se evaluó por duplicado, con 5 observaciones por réplica). Se leyó DO en tiempo cero a 595 nm. Las placas se incubaron con agitación a 300 rpm por 24-48 h, después se aspiró el medio suavemente para evitar levantar la biopelícula y se lavó cada pocillo con 250 μ L de NaCl 0.9 % para lavar las células planctónicas y los restos de medio de cultivo. Se agregaron 250 μ L de cristal violeta al 0.1% a cada pocillo, y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos protegiendo la placa de la luz, se aspiró el exceso de colorante y se realizaron 3 lavados con 250 μ L de NaCl 0.9%, posteriormente se dejó secar unos minutos la placa.

El colorante que penetró a las bacterias adheridas se extrajo con 250 μ L de EtOH 95% por pocillo, y se pasó a una placa nueva para luego medir la absorbancia a 595 nm en un lector de placas de ELISA (680 micro-plate reader, BioRad, CA, USA). La intensidad de color es directamente proporcional a la cantidad de biopelícula presente en cada pocillo (Morikawa *et al.* 2006).

4.2.7 Transcripción de *cry1Aa*

Se utilizaron las cepas $\Delta nprR-nprRB[Cry1Aa'Z]$ y Bt8741[Cry1Aa'Z] que contienen la fusión *cry1Aa'Z*, estas células fueron incubadas durante 16 h en

medio nutritivo a 30° C y agitación a 200 rpm, para después realizar un pase de 400 µL a matraces con 30 mL de medio SSM, los matraces se colocaron en un agitador a 30° C con agitación a 200 rpm, para después realizar el muestreo y el ensayo de β – galactosidasa, a partir de la fase de transición, como fue descrito anteriormente.

4.3 Evaluación de la Complementación Genética de la Mutante en los Fenotipos Alterados por la Mutación $\Delta nprR$ - $nprRB$.

Una vez conocidos los fenotipos que se vieron alterados en la cepa mutante, se utilizaron, las cepas complementadas $\Delta nprR$ - $nprRB$ [pNprR-NprRB], $\Delta nprR$ - $nprRB$ [pNprR], $\Delta nprR$ - $nprRB$ [pNprR Δ HTH-NprRB] y $\Delta nprR$ - $nprRB$ [pNprR Δ HTH] que fueron descritas anteriormente, se utilizaron para repetirse los ensayos de esporulación y proteasa neutra, para evaluar el efecto de la complementación genética de la mutante en estos fenotipos. Así mismo, las cepas complementadas con $nprR$ o $nprR$ Δ HTH se usaron para los ensayos de complementación con péptidos de señalización sintéticos.

4.4 Ensayos con Péptidos Sintéticos

Se utilizaron las cepas $\Delta nprR$ - $nprRB$ [pNprR] y $\Delta nprR$ - $nprRB$ [pNprR Δ HTH] para ser ensayadas con los péptidos de señalización sintéticos codificados en la región exportada del péptido NprRB (Fig.- 2). Los péptidos sintéticos que se usaron fueron SKPDT, SKPDI, SKPDIVG, SSKPDIV, SSKPDIVG y EQVNL (GenScript) (Fig. 2).

En el caso del ensayo de la proteasa neutra, los péptidos fueron adicionados en la superficie de la placa con Agar-leche hasta una concentración final de 1 µM para cada péptido. Para el ensayo de esporulación, los péptidos

fueron adicionados a los matraces con los cultivos 2 horas antes de la fase de transición, hasta una concentración final de 1 μM para cada péptido.

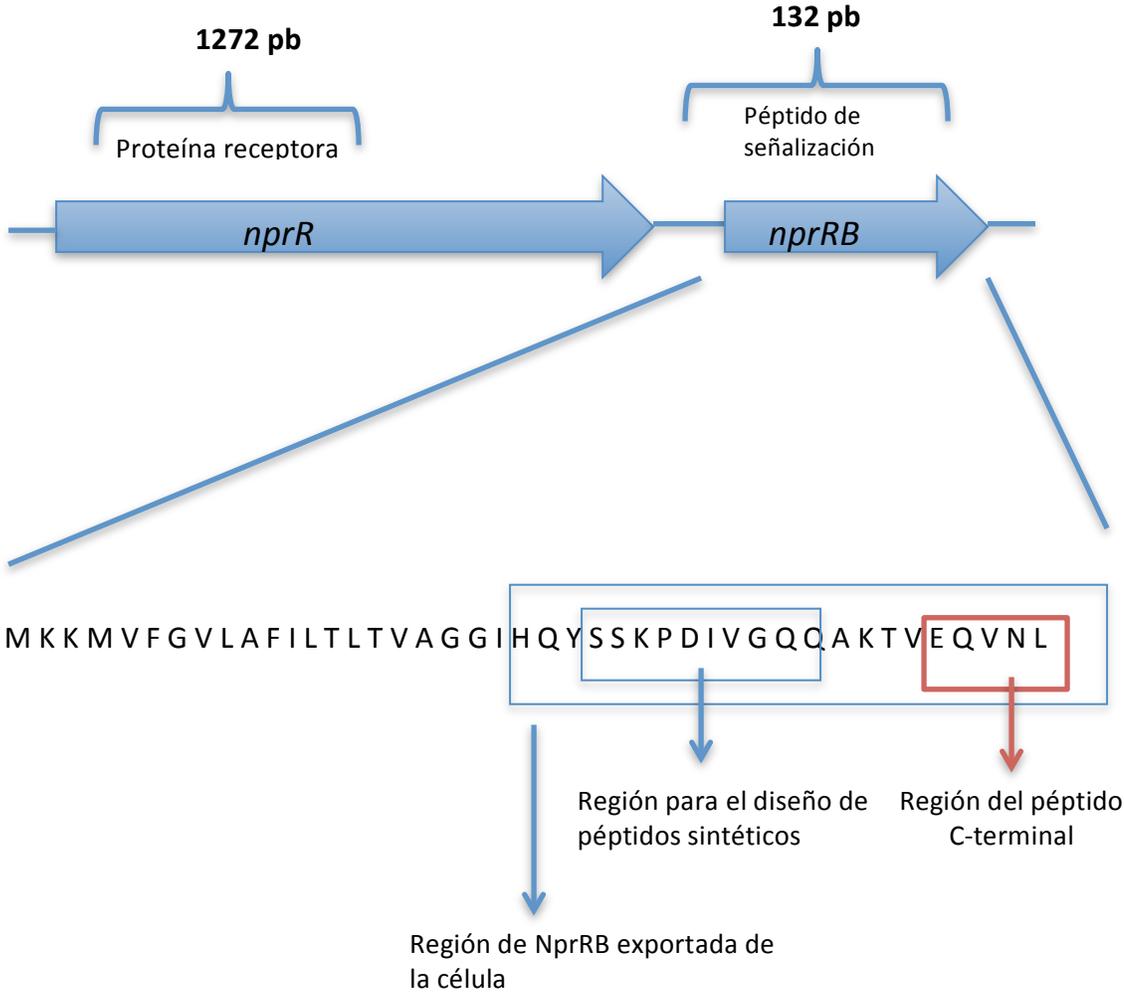


Figura 2.- Esquema del cassette NprR-NprRB en el genoma de Bt y región a partir de la cual se diseñaron los péptidos sintéticos, así como el pentapéptido correspondiente al C-terminal.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Cepas Transformadas

Se obtuvieron las cepas transformadas listadas en la Tabla 1. En cada transformante se verificó que estuvieran las secuencias de los genes *nprR*, *nprRΔHTH* y/o *nprRB* por PCR (Fig. 3). En el caso del cassette *nprR-nprRB* los primers utilizados amplifican una sección que comprende la mitad de la secuencia del marco de lectura abierta *nprR* y el gen *nprRB* (900 pb). En las cepas $\Delta nprR-nprRB$, $\Delta nprRnprRB[pNprR]$ y $\Delta nprR-nprRB[pNprR\Delta HTH]$ no se amplificó ningún fragmento, ya que no cuentan con la región *nprRB* ó *nprR-nprRB*, según corresponda. Cuando se utilizaron primers que amplifican solamente *nprR*, todas las cepas excepto la mutante que no tenía el cassette amplificaron. En el caso de las cepas $\Delta nprR-nprRB[pNprR\Delta HTH]$ y $\Delta nprR-nprRB[pNprR\Delta HTH-NprRB]$ el fragmento *nprR* mostró un menor tamaño, debido a la delección del dominio de unión a DNA. Estos resultados demuestran que cada cepa tenía la construcción desaseada.

También se verificaron las fusiones transcripcionales *cry1Aa'Z* y *spolIA'Z*, la digestión del plásmido pHTcry1A2 con las enzimas de restricción mostró las 2 bandas esperadas en esta doble digestión del plásmido, confirmándose que la cepa transformada contenía el plásmido correcto. Asimismo en el caso del plásmido pHTSpolIA, se logró amplificar el promotor de *spolIA*, confirmando que el plásmido es el correcto y que cuenta con la fusión transcripcional (Fig. 4).

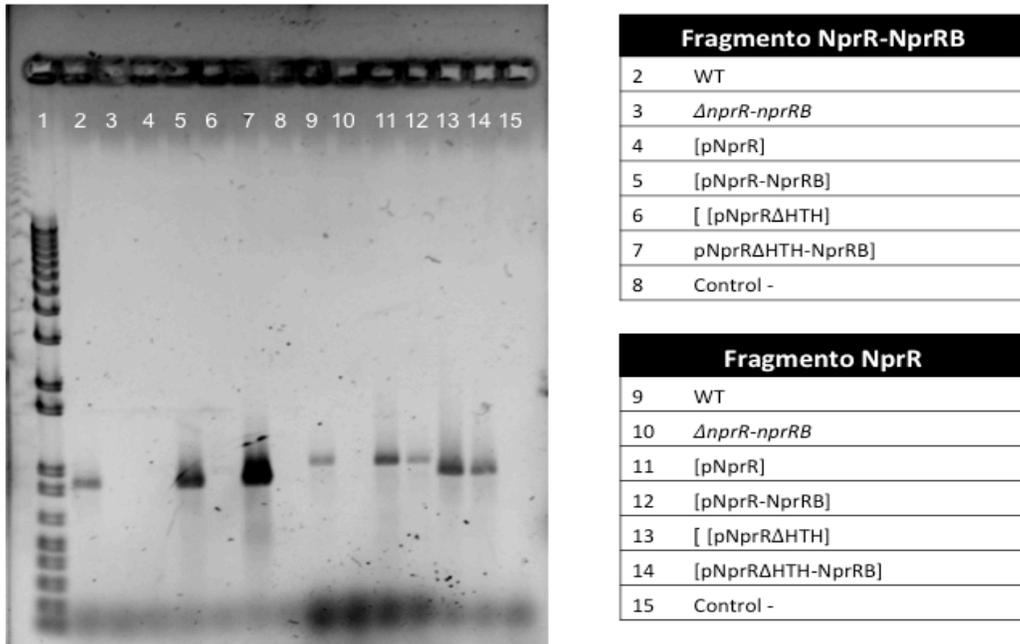


Figura 3.- Amplificación de los fragmentos NprR-NprRB y NprR, en las cepas transformadas.

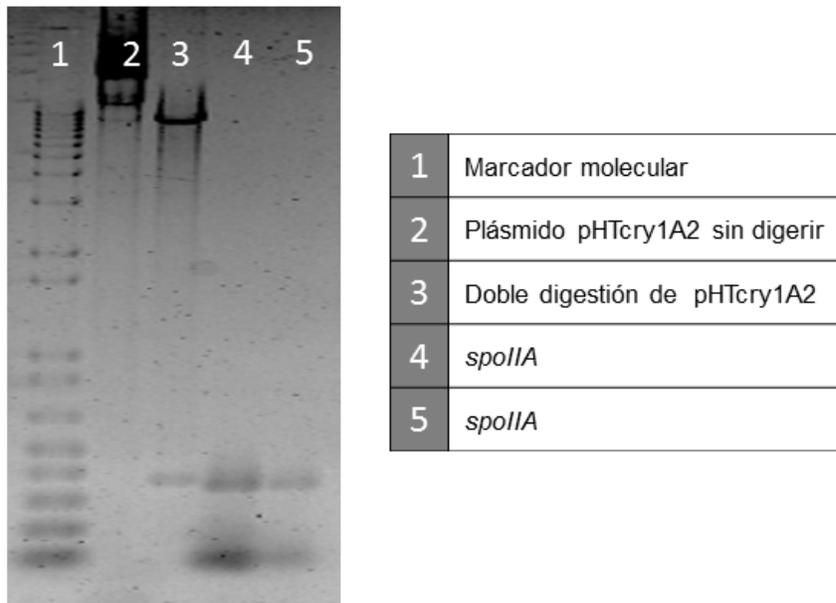


Figura 4. Doble digestión del plásmido pHTcry1A2 y amplificación de *spoIIA*

5.2 Efecto de la eliminación de *nprR-nprRB* en los fenotipos de Bt.

5.2.1 Proteasa neutra

El fenotipo de la actividad de proteasa neutra se vió claramente afectado en la cepa mutante $\Delta nprR-nprRB$, ya que se presentó un halo de actividad muy pequeño en el medio Agar-leche comparado con el de la cepa Bt 8741, 4mm de grosor para la silvestre y 1 mm para la mutante (Fig.- 5). Este resultado era esperado ya que el sistema NprR-NprRB funciona como regulador transcripcional del gen de la proteasa neutra (*nprA*). Además, concuerda con el obtenido por Perchat *et al.*, (2011), donde, al usar una cepa mutante $\Delta nprR-nprRB$ (ΔRB), observaron que los genes *nprR-nprRB* eran necesarios para la expresión de la proteasa neutra. El resultado que obtuvimos confirma que el cassette *nprR-nprRB* fue eliminado en esta cepa.

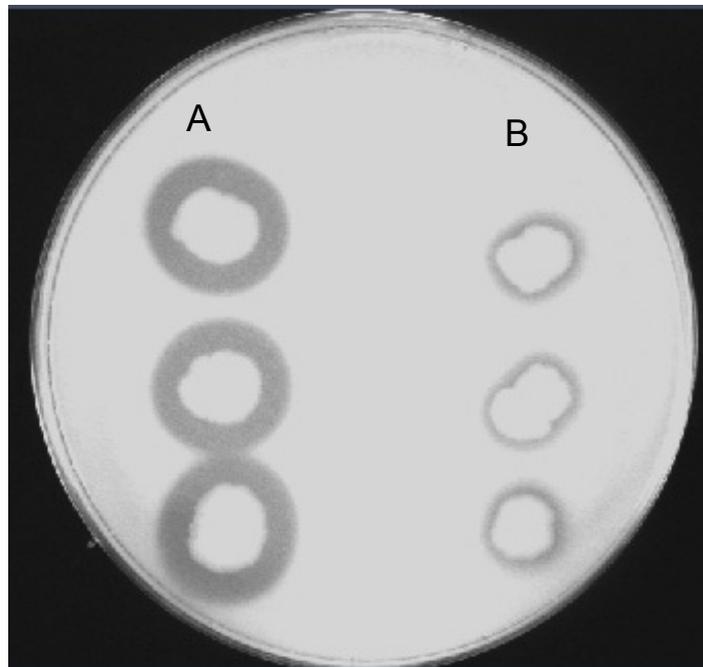


Figura 5. Actividad de proteasas en cepas de *B. thuringiensis*. A) Cepa Bt8741 B) Cepa $\Delta nprR-nprRB$

5.2.2 Esporulaci3n

La cepa mutante present3 un retraso en el inicio de la esporulaci3n (Fig.- 6). Despu3s de m3s de 24 h, el n3mero de esporas se igual3 en la cepa mutante $\Delta nprR-nprRB$ y en Bt 8741, sugiriendo que los genes que codifican para la prote3na NprR y para su p3ptido de se3alizacion, podr3an estar involucrados en la regulaci3n temporal del inicio de la esporulaci3n. Resultados obtenidos en otras investigaciones respaldan la idea de la participaci3n de NprR en la regulaci3n de la esporulaci3n, Yang *et al.* (2011), demostraron que cepas de *B. anthracis* con mutaciones en el gen NprR no fueron capaces de esporular. Por su parte, Dubois *et al.* (2012), encontraron que, en cierta medida, la esporulaci3n se ve3a afectada, en una cepa mutante ΔRB , a pesar de que en el regul3n de NprR no se presenta ning3n gen implicado en la esporulaci3n, sin embargo ellos no discutieron el porqu3 de estos resultados.

5.2.3 Transcripci3n de SpollA

Los resultados obtenidos en el ensayo de β -galactosidasa con las cepas que conten3an la fusi3n $spollA'Z$ respaldan que el sistema NprR-nprRB participa en la regulaci3n del inicio de la esporulaci3n, ya que al ser SpollA un gen activado por el regulador maestro del inicio de la esporulaci3n Spo0A, SpollA act3a como un indicador del inicio de este proceso de diferenciaci3n celular. En la Fig. 7 se puede observar como la cepa mutante presenta menor actividad de β -galactosidasa. Es decir, hubo una menor expresi3n de SpollA en comparaci3n con Bt 8741, lo que indica que el sistema NprR interviene en el inicio de la esporulaci3n.

Sin embargo, el hecho de que los niveles m3ximos de SpollA no lleguen a ser iguales entre ambas cepas es interesante. Se ha mencionado que en una poblaci3n celular cuando las condiciones son propicias para iniciar la esporulaci3n, no todas las c3lulas entran a este estado al mismo tiempo, incluso

no todas lo llegan hacer (Fujita *et al.* 2005). Esta podría ser una forma en que el sistema NprR-NprRB estuviera interviniendo, y en ausencia de este sistema, la subpoblación que no inicia esporulación sea mayor, contribuyendo así, a mantener un estado bi-estable en la población. Asimismo, Fujita *et al.* (2005), mencionan que para que el operon de SpoIIA sea activado, se necesitan niveles muy altos de Spo0A, ya que presentan poca afinidad entre sí. Esto nos lleva a pensar que el sistema NprR-NprRB interviene de forma positiva en el inicio de la esporulación, permitiendo que el flujo de fosfatos sea más eficiente, lo que conlleva a que se presenten niveles más altos de Spo0A.

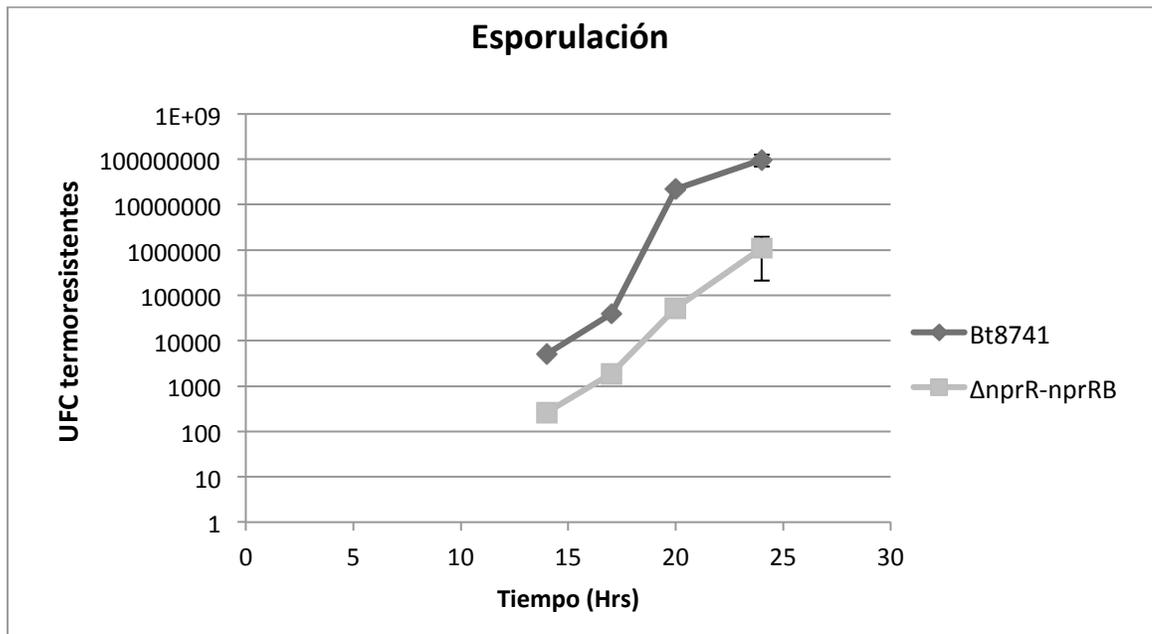


Figura 6.- Evolución del número de esporas con respecto al tiempo de incubación.

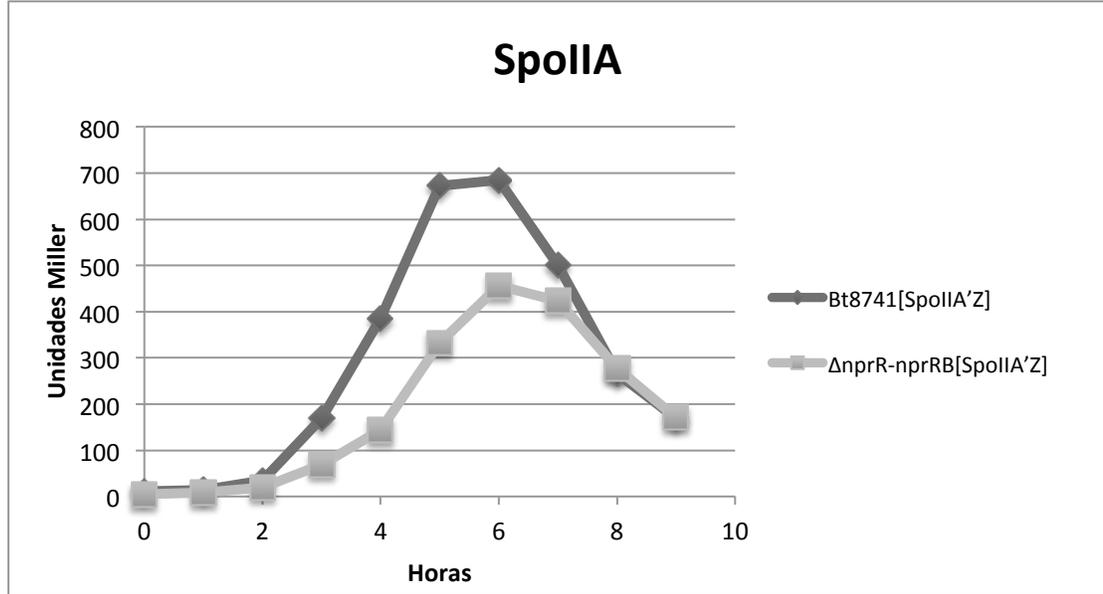


Figura 7.- Expresión de *spollA* en la cepa Bt8741[SpollA'Z] y $\Delta nprR-nprRB[SpollA'Z]$.

Sin embargo, el hecho de que los niveles máximos de SpollA no lleguen a ser iguales entre ambas cepas es interesante. Se ha mencionado que en una población celular cuando las condiciones son propicias para iniciar la esporulación, no todas las células entran a este estado al mismo tiempo, incluso no todas lo llegan hacer (Fujita *et al.* 2005). Esta podría ser una forma en que el sistema NprR-NprRB estuviera interviniendo, y en ausencia de este sistema, la subpoblación que no inicia esporulación sea mayor, contribuyendo así, a mantener un estado bi-estable en la población. Asimismo, Fujita *et al.* (2005), mencionan que para que el operon de SpollA sea activado, se necesitan niveles muy altos de Spo0A, ya que presentan poca afinidad entre sí. Esto nos lleva a pensar que el sistema NprR-NprRB interviene de forma positiva en el inicio de la esporulación, permitiendo que el flujo de fosfatos sea más eficiente, lo que conlleva a que se presenten niveles más altos de Spo0A.

5.2.4 “Swarming”

Se observó que en la cepa mutante se afecta negativamente la capacidad de movimiento de swarming, con una colonia de 1.8 cm de diámetro, mientras que en la cepa silvestre se observa los bordes de la colonia irregulares, lo cual pone de manifiesto el movimiento swarming, además de que se aprecia un mayor diámetro de la colonia (2.9 cm), lo que sugiere que NprR puede estar interviniendo de alguna manera en este fenómeno (Fig.- 8). Dubois *et al* (2012), encontraron en el regulón de NprR, genes que codifican para proteínas involucradas en la síntesis de un lipopéptido llamado Kurstakin, y mostraron que éste se requiere para la movilidad tipo swarming de Bt. Los resultados obtenidos en este estudio comprueban que el sistema NprR interviene, y una de las formas en que lo podría estar haciendo es regulando la expresión de las proteínas que participan en la síntesis del lipopéptido y con esto regular indirectamente la activación de la síntesis del mismo.

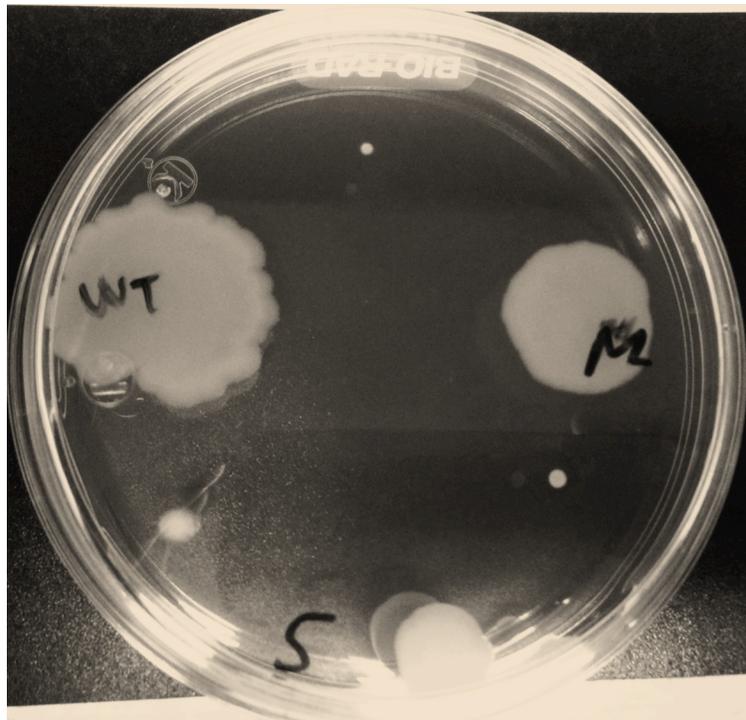


Figura 8.-“Swarming” de las cepas de Bt. Izquierda, Cepa silvestre Bt8741 (WT), Derecha, Cepa mutante $\Delta nprR-nprRB$.

5.2.5 “Swimming”

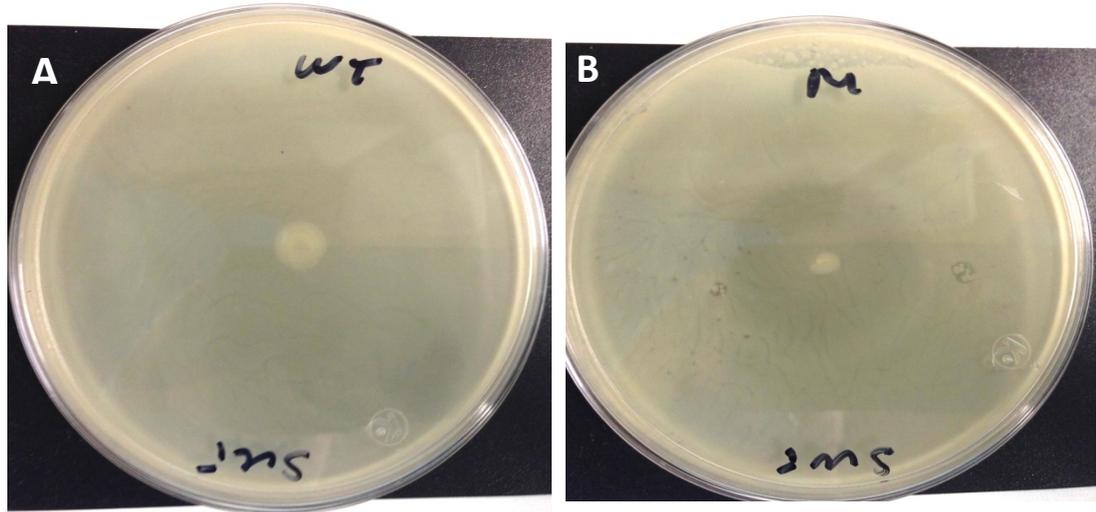


Figura 9.- “Swimming” de las cepas de Bt. A) cepa silvestre Bt8741 (WT), B) cepa mutante $\Delta nprR-nprRB$.

El fenotipo de “swimming” no se vio afectado en la cepa mutante, ya que el crecimiento inicio donde se colocó la gota y se desplazó a toda la placa, al igual que ocurrió con la cepa silvestre. (Fig. 9), sugiriendo que NprR no está implicado en este fenómeno. El mecanismo de cómo es regulado el movimiento de “swimming” no ha sido descrito a profundidad en el grupo *Bacillus cereus*, pero estudios con *Bacillus subtilis* muestran el papel que tiene el operón *swrA*, el cual regula la expresión de genes flagelares y es importante tanto en la regulación de “swimming” como también de “swarming”, así como también el papel que tiene el lipopéptido surfactina para la movilidad de la bacteria. Sin embargo, la regulación del fenómeno de “swimming” parece ser menos compleja, ya que dentro del operón *swrA*, se encuentran los genes *swrAA* y *swrAB*, siendo el primero de éstos, esencial para el control del número de flagelos en medios líquidos y el ensamble de flagelos al entrar en contacto con superficies sólidas. El gen *swrAB* es importante en el movimiento de “swarming”, no siendo indispensable en el movimiento de “swimming”.

Además, para un movimiento swimming eficiente la bacteria aparentemente requiere un menor contenido de lipopéptidos que para el “swarming”, éste además es dependiente del lipopéptido Kurstakin (Calvio *et al.* 2012; Ghelardi *et al.* 2005). Esto y los resultados obtenidos muestran que no existe una dependencia del sistema NprR-NprRB en este fenómeno.

5.2.6 Formación de biopelícula

La capacidad de formación de biopelícula se evaluó tanto en la cepa silvestre, como en la mutante. Los resultados mostraron que la capacidad de la cepa mutante para producir biopelículas, se vio afectada, comparándola con la cepa silvestre. En la Fig.10, se puede observar que el promedio de las 6 lecturas hechas en 6 pozos diferentes de la cepa silvestre fue de una absorbancia a 620 nm de 1.178, en cambio la mutante mostró una media de absorbancia de 0.51 a 620 nm.

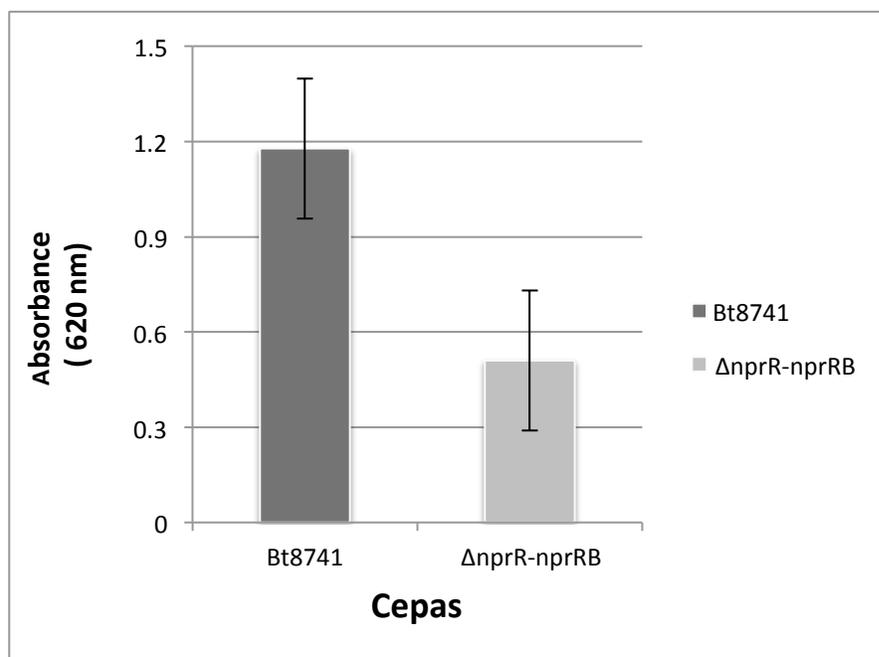


Figura 10.- Capacidad de formación de biopelícula de la cepas silvestre (WT) y mutante $\Delta nprR-nprRB$

Estos resultados sugieren que el sistema NprR-NprRB esta implicado en la regulación o activación de este fenómeno, ya que la cepa mutante sí fue capaz de producir una biopelícula, pero de una manera deficiente. Se sabe que este fenómeno está regulado por mecanismos de quórum sensing, como está reportado para *P. aeruginosa*, donde cepas mutantes del gen de QS *lasI* desarrollaron biopelículas más delgadas en comparación con la cepa silvestre (Davies *et al.* 1998). Asimismo, como mencionamos anteriormente, Dubois *et al.* 2012, observaron que NprR es necesario para la regulación de proteínas que intervienen en la síntesis del lipopéptido Kurstakin, y mostraron que éste es necesario para la formación de biopelículas en Bt. Por lo tanto, el efecto observado se puede deber a que el sistema NprR-NprRB interviene en la regulación de la expresión de los genes que codifican dichas proteínas. Otro mecanismo en el que podría estar interviniendo NprR y por el cual se da la afectación en la capacidad de formación de biopelículas es por medio del regulador Spo0A, ya que al verse afectado el “phosphorelay” los niveles de Spo0A fosforilada se verían disminuidos, afectándose la capacidad de activación de *sinI*, el cual está regulado por Spo0A, *sinI* es el antirepresor de *sinR*. Trabajos recientes muestran que *sinR* es crucial para la formación de biopelículas actuando como represor de genes indispensables en este fenómeno. Por consecuencia, NprR estaría provocando indirectamente niveles bajos de *sinI*, haciendo menos eficiente la regulación de la formación de biopelícula (Fujita *et al.* 2005).

5.2.7 Expresión de *cry1Aa*

La actividad de β -galactosidasa, como indicador de la expresión de *cry1Aa*, se vio afectada en la cepa mutante en comparación con la cepa silvestre, en la Fig.- 11. se puede observar como los niveles de actividad en la cepa silvestre siempre estuvieron por debajo de los niveles presentados en la cepa mutante. Esto nos indica que el sistema NprR-NprRB podría ser un regulador negativo o

represor de la expresión de *cry1Aa*. Nuestros resultados concuerdan con los resultados mostrados por Wang *et al.* (2010), donde una cepa mutante de *B. thuringiensis* con la delección del gen que codifica para NprR ($\Delta nprR$), presentaba niveles de actividad más altos de expresión y transcripción del gen *cry1Ac* en comparación con la cepa silvestre, mostrando que esta diferencia se da en la fase de transición y fase estacionaria temprana, sin embargo, nuestros resultados muestran que esta diferencia se da 5 horas después de la fase de transición, es decir durante la fase esporulación

Rocha *et al* (2011), demostraron que el sistema NprR está implicado en la expresión de proteínas *cry*. Observaron que la adición de péptidos de señalización sintéticos correspondientes a NprRB, tenían efecto en la expresión de *cry1Aa*, los pentapéptidos aumentan la expresión de *cry1Aa* y los péptidos de mayor longitud disminuían su expresión, evidenciando no solo una función de NprR, sino también la importancia de la longitud del péptido de señalización de este sistema. Los resultados de este trabajo sugieren que NprR actúa como un represor del gen *cry1Aa* en *B. thuringiensis*.

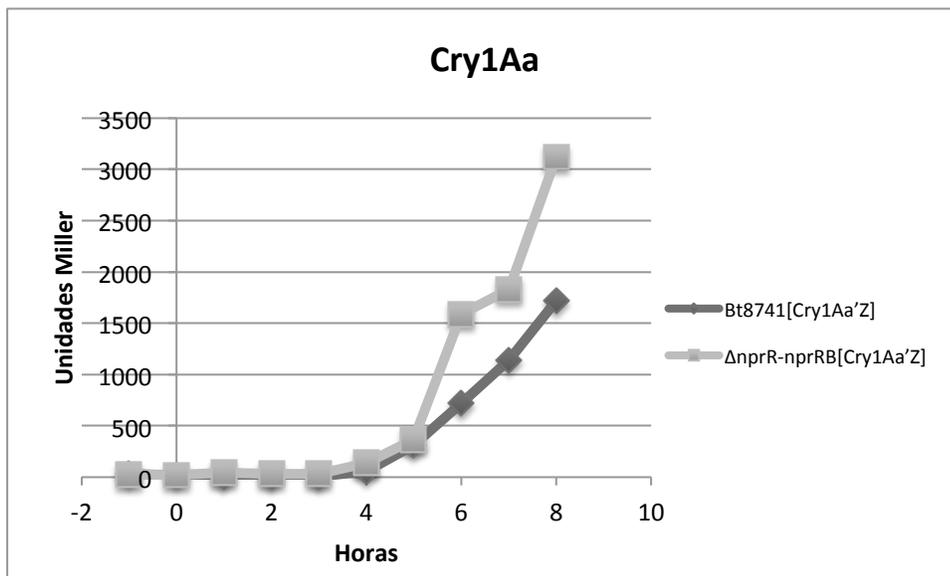


Figura 11.- Expresión de *cry1Aa* en la cepa Bt8741[Cry1Aa'Z] y $\Delta nprR$ -nprRB[Cry1Aa'Z].

5.3 Complementación Genética de la Mutante $\Delta nprR-nprRB$

Se transformó la mutante $\Delta nprR-nprRB$ mediante electroporación con el plásmido pMAD que contenía las construcciones [pNprR-NprRB], [pNprR], [pNprR Δ HTH-NprRB], o [pNprR Δ HTH] (Tabla 1). En las cepas transformadas se evaluaron esporulación y la actividad de proteasa neutra. En la Fig.- 12 se observó que el cassette completo $nprR-nprRB$ fue capaz de complementar a la mutante (cepa $\Delta nprR-nprRB$ [pNprR-NprRB]), y ésta recuperó el fenotipo de producción de proteasa neutra, observándose un halo de actividad igual al de la cepa Bt8741. Por otro lado, el gen del receptor $nprR$ por sí solo no fue capaz de complementar a la mutante, de lo que se infiere que el péptido de señalización es necesario para que funcione como regulador transcripcional de la proteasa neutra. Nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Perchat *et al.* 2011, donde muestran que una cepa mutante con la delección del cassette $nprR-nprRB$, recuperó la actividad de proteasa neutra al ser complementada con el cassette.

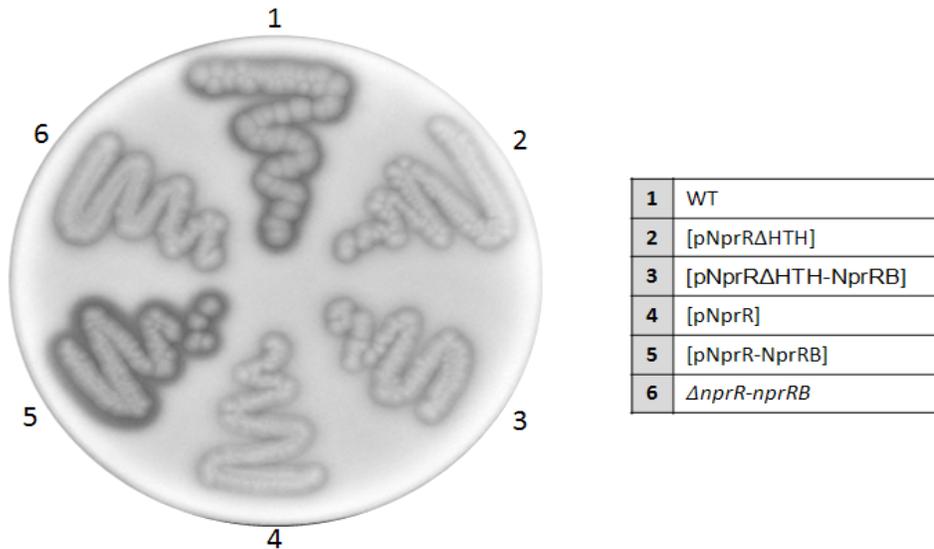


Figura 12.- Actividad de proteasa neutra de las cepas de Bt. Silvestre (WT), mutante $\Delta nprR-nprRB$ y las cepas complementadas, $\Delta nprR-nprRB$ [pNprR-NprRB], $\Delta nprR-nprRB$ [pNprR], $\Delta nprR-nprRB$ [pNprR Δ HTH-NprRB], $\Delta nprR-nprRB$ [pNprR Δ HTH]

Al eliminar el dominio de unión a DNA (HTH), la proteína NprR pierde la capacidad de unirse directamente al DNA bacteriano y con esto su función de regulador transcripcional. Esto se confirmó porque en la cepa mutante transformada con el cassette completo *nprR-nprRB*, pero con un gen *nprR* carente del dominio HTH, no se restableció la actividad de la proteasa neutra.

También se evaluó si el fenotipo de esporulación era complementado con las cepas transformantes. Como se observa en la Fig.- 13., en las cepas $\Delta nprR nprRB [pNprR]$ y $\Delta nprR-nprRB [pNprR\Delta HTH]$ no hubo complementación, haciendo evidente la necesidad del sistema NprR-NprRB completo para que se active este sistema y se restablezca la capacidad de esporulación. En las cepas $\Delta nprR-nprRB [pNprR-NprRB]$ y $\Delta nprR-nprRB [pNprR\Delta HTH-NprRB]$ se recuperó el fenotipo silvestre de esporulación, es interesante recalcar que el sitio de unión a DNA de la proteína NprR no fue necesario para la función de este receptor en la esporulación, lo que nos sugiere que el sistema de NprR-NprRB actúa como un regulador de la esporulación a través de un mecanismo independiente de su función como regulador transcripcional. En nuestro grupo de trabajo se ha observado que NprR estructuralmente es muy parecida a RapH, la cual se une a Spo0F disminuyendo el flujo de fosfatos en el sistema de “phosphorelay”. Por lo anterior nosotros proponemos que NprR podría estar participando en el sistema “phosphorelay” contrarrestando el efecto de RapH, es decir cuando NprR se une a Spo0F permite el flujo de fosfatos en el sistema “phosphorelay”.

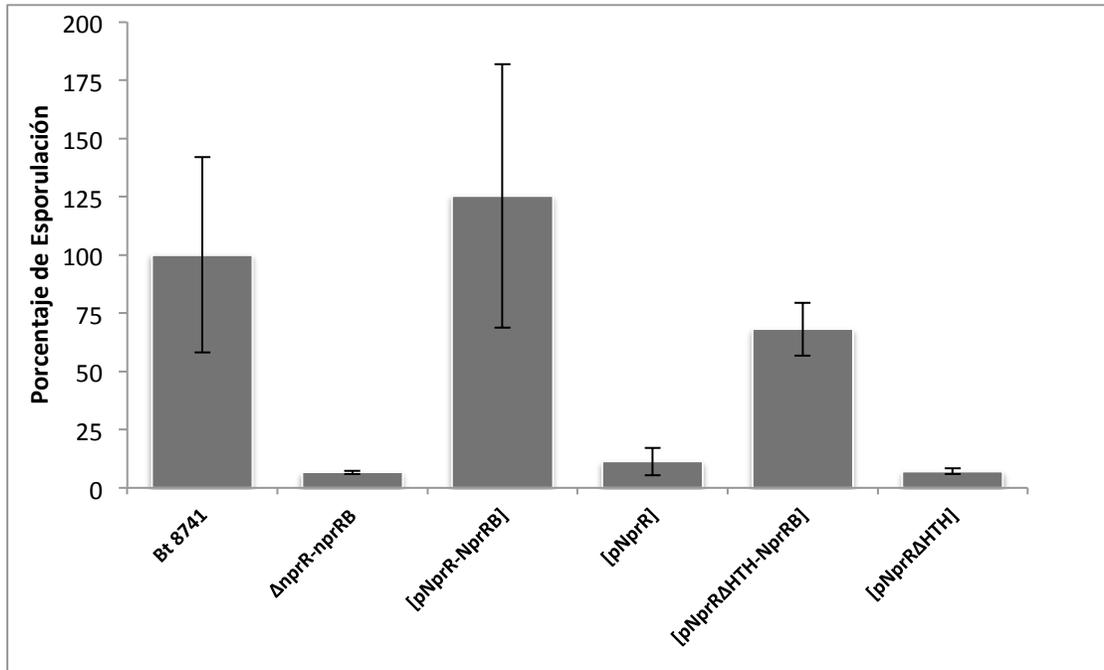


Figura 13.- Porcentaje de esporulación de las cepas transformadas con respecto a la cepa silvestre después de 10 h de la fase de transición.

5.4 Restablecimiento de Fenotipos de Proteasa Neutra NprA en Bt $\Delta nprRnprRB$ [pNprR] y $\Delta nprR-nprRB$ [pNprR Δ HTH] Añadiendo Péptidos Sintéticos

En la Fig.- 14 se muestra el efecto de la adición de los péptidos sintéticos a las placas que contenían las cepas silvestre (WT), mutante $\Delta nprR-nprRB$ y la cepa $\Delta nprRnprRB$ [pNprR], donde se pudo observar que el heptapéptido SKPDIVG y el octapéptido SSKPDIVG fueron capaces de restablecer la actividad de la proteasa neutra, mientras que el resto de los péptidos no lo hicieron. Estos 2 péptidos ,por lo tanto, funcionan como péptidos de señalización de NprR, en su función como regulador transcripcional.

Estos resultados son comparables con los obtenidos por Perchat *et al.* 2011, en los cuales plantean que la longitud mínima para el péptido de señalización de NprR para su función como regulador transcripcional del gen *nprA* que codifica para la proteasa neutra es de 7 amino ácidos y proponen que la secuencia funcional es SKPDIVG.

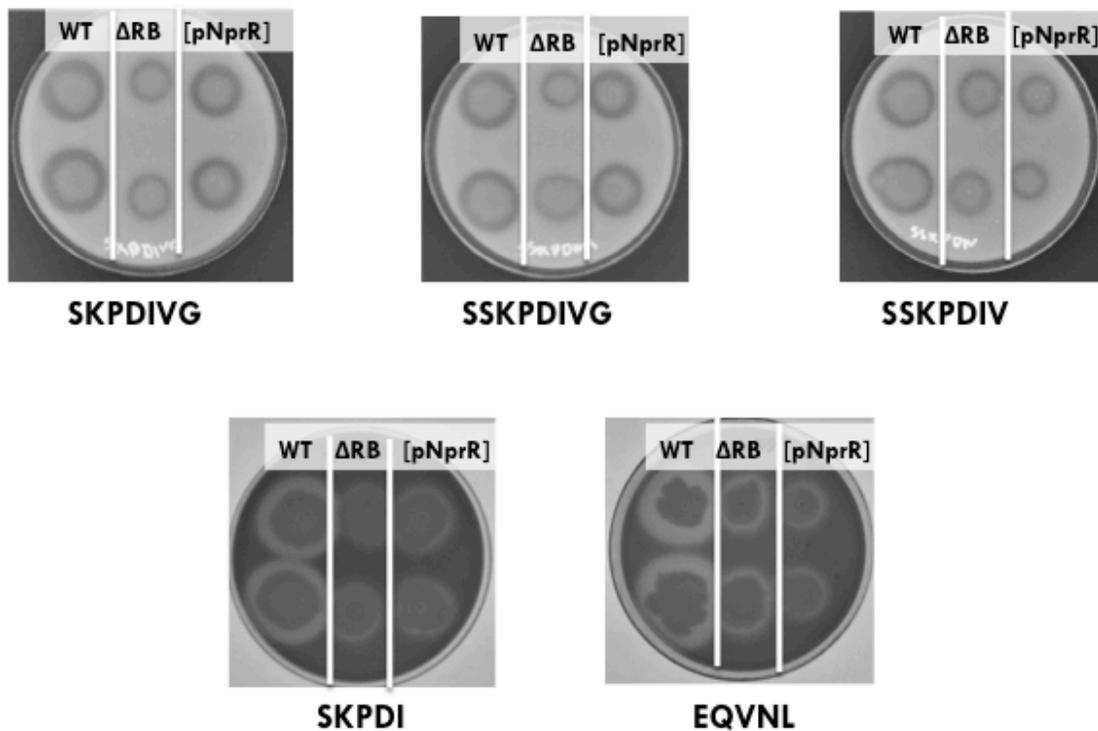
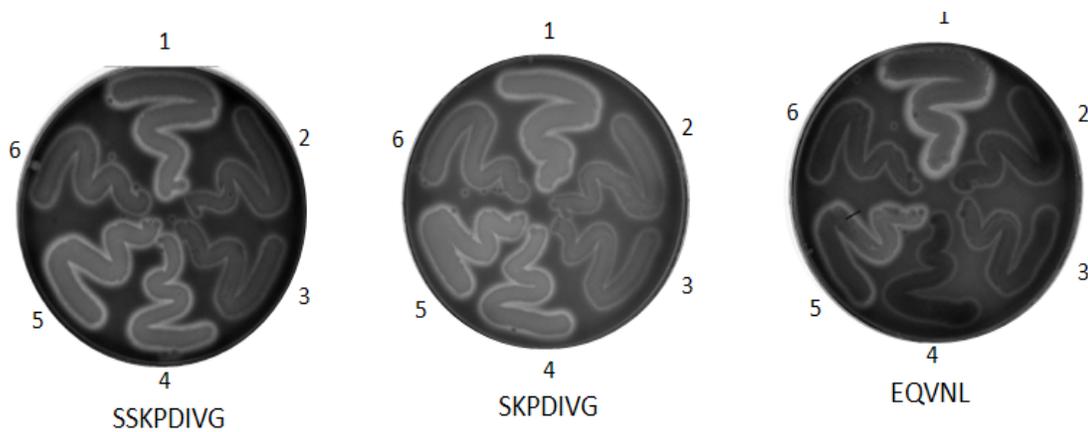


Figura 14.- Efecto sobre la actividad de proteasas de la adición de diferentes péptidos sintéticos a las cepas silvestre Bt8741 (WT), mutante $\Delta nprR-nprRB$ (ΔRB) y la cepa $\Delta nprRnprRB[pNprR]$ (pNprR)

En la Fig.- 15 se puede observar el efecto que tuvieron los mismos heptapéptido y octapéptido y el péptido C terminal de 5 aminoácidos, en todas las construcciones. En la cepa $\Delta nprR-nprRB[pNprR\Delta HTH]$ a pesar de contar con el gen del receptor *nprR*, la adición del péptido de señalización no fue

suficiente para restaurar la actividad de la proteasa neutra. Ello debido a la eliminación del dominio HTH del receptor, confirmando lo encontrado en los estudios de complementación. Es decir, que NprR en su función de regulador transcripcional, requiere el dominio de unión a DNA y el péptido de señalización.



1	WT	3	[pNprR Δ HTH-NprRB]	5	[pNprR-NprRB]
2	[pNprR Δ HTH]	4	[pNprR]	6	Δ nprR-nprRB

Figura 15.- Efecto sobre la actividad de proteasas de la adición de diferentes péptidos sintéticos a las cepas transformadas.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

El sistema de QS en *B. thuringiensis* está involucrado en la expresión de la proteasa neutra NprA, la esporulación, la formación de biopelícula, el movimiento de “Swarming” y participa como un regulador negativo en la expresión de las proteínas Cry.

El mecanismo molecular en el caso de la esporulación es independiente de la unión a DNA de NprR y se asocia probablemente a una participación en el sistema phosphorelay que regula el inicio de la esporulación, evidenciando una bifuncionalidad de la proteína NprR.

Los péptidos SSKPDIVG y SKPDIVG actúan como péptidos de señalización de NprR, sin embargo, el sistema podría ser activado por un péptido de señalización diferente dependiendo de la función que realice.

BIBLIOGRAFÍA

1. Aceves-Diez, Angel E., Robles-Burgueño, Refugio., & de la Torre, Mayra. (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(1), 203-209. doi: 10.1007/s00253-007-0982-0
2. Agaisse H Fau - Lereclus, D., & Lereclus, D. (1995). How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol*, 17(0021-9193 (Print)), 6027-6032. doi: D - NLM: PMC177438 EDAT-1995/11/01 MHDA- 2000/03/23 09:00 CRDT- 1995/11/01 00:00 PST – ppublish
3. Anderson, I., Sorokin, A., Kapatral, V., Reznik, G., Bhattacharya, A., Mikhailova, N., Burd, H., Joukov, V., Kaznadzey, D., Walunas, T., D'Souza, M., Larsen, N., Pusch, G., Liolios, K., Grechkin, Y., Lapidus, A., Goltsman, E., Chu, L., Fonstein, M., Ehrlich, S.D., Overbeek, R., Kyrpides, N., Ivanova, N. (2005). Comparative genome analysis of *Bacillus cereus* group genomes with *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, 250(2), 175-184. DOI: 10.1016/j.femsle.2005.07.008
4. Bassler, B.L., Losick, R. (2006). Bacterially Speaking. *Cell*, 125(2), 237-246. DOI: 10.1016/j.cell.2006.04.001
5. Boedicker, James Q, Vincent, Meghan E, & Ismagilov, Rustem F. (2009). Microfluidic Confinement of Single Cells of Bacteria in Small Volumes Initiates High-Density Behavior of Quorum Sensing and Growth and Reveals Its Variability. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(32), 5908-5911. doi: 10.1002/anie.200901550
6. Bravo, A., Gómez, I., Conde, J., Muñoz-Garay, C., Sánchez, J., Miranda, R., . . . Soberón, M. (2004). Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1667(1), 38-46.

7. Calvio, C., Celandroni, F., Ghelardi, E., Amati, G., Salvetti, S., Ceciliani, F., ... & Senesi, S. (2005). Swarming differentiation and swimming motility in *Bacillus subtilis* are controlled by *swrA*, a newly identified dicistronic operon. *Journal of bacteriology*, 187(15), 5356-5366.
8. Carnes Ec Fau - Lopez, Deanna M., Lopez Dm Fau - Donegan, Niles P., Donegan Np Fau - Cheung, Ambrose, Cheung A Fau - Gresham, Hattie, Gresham H Fau - Timmins, Graham S., Timmins Gs Fau - Brinker, C. Jeffrey, & Brinker, C. J. (2010). Confinement-induced quorum sensing of individual *Staphylococcus aureus* bacteria. *Nat Chem Biol*, 6(1552-4469 (Electronic)), 41-45.
9. Chandler, Josephine R., Flynn, Aron R., Bryan, Edward M., & Dunny, Gary M. (2005). Specific Control of Endogenous cCF10 Pheromone by a Conserved Domain of the pCF10-Encoded Regulatory Protein PrgY in *Enterococcus faecalis*. *Journal of Bacteriology*, 187(14), 4830-4843. doi: 10.1128/jb.187.14.4830-4843.2005
10. Core, Leighton, & Perego, Marta. (2003). TPR-mediated interaction of RapC with ComA inhibits response regulator-DNA binding for competence development in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 49(6), 1509-1522. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03659.x
11. Declerck N Fau - Bouillaut, Laurent, Bouillaut L Fau - Chaix, Denis, Chaix D Fau - Rugani, Nathalie, Rugani N Fau - Slamti, Leyla, Slamti L Fau - Hoh, Francois, Hoh F Fau - Lereclus, Didier, Arold, S. T. (2007). Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 104(1091-6490 (Electronic)), 18490-18495.
12. Declerck, N., Bouillaut, L., Chaix, D., Rugani, N., Slamti, L., Hoh, F., Lereclus, D., Arold, S.T. (2007). Structure of PlcR: Insights into virulence regulation and evolution of quorum sensing in Gram-positive bacteria. *National Academy of Sciences of the USA*. 104(47), 18490-18495. DOI: 10.1073/pnas.0704501104

13. Dubois, T., Faegri, K., Perchat, S., Lemy, C., Buisson, C., Nielsen-LeRoux, C., ... & Lereclus, D. (2012). Necrotrophism is a quorum-sensing-regulated lifestyle in *Bacillus thuringiensis*. *PLoS pathogens*, 8(4), e1002629.
14. Dubois, T., Perchat, S., Verplaetse, E., Gominet, M., Lemy, C., Aumont-Nicaise, M., ... & Lereclus, D. (2013). Activity of the *Bacillus thuringiensis* NprR–NprX cell–cell communication system is co-ordinated to the physiological stage through a complex transcriptional regulation. *Molecular microbiology*, 88(1), 48-63.
15. Fujita, M., González-Pastor, J. E., & Losick, R. (2005). High-and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 187(4), 1357-1368.
16. Fujita, Masaya, & Losick, Richard. (2005). Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes & Development*, 19(18), 2236-2244. doi: 10.1101/gad.1335705
17. Ghelardi, E., Salvetti, S., Ceragioli, M., Gueye, S. A., Celandroni, F., & Senesi, S. (2012). Contribution of surfactin and SwrA to flagellin expression, swimming, and surface motility in *Bacillus subtilis*. *Applied and environmental microbiology*, 78(18), 6540-6544.
18. Gohar, Michel, Faegri, Karoline, Perchat, Stéphane, Ravnum, Solveig, Økstad, Ole Andreas, Gominet, Myriam, . . . Lereclus, Didier. (2008). The PlcR Virulence Regulon of *Bacillus cereus*. *PLoS ONE*, 3(7), e2793. doi: 10.1371/journal.pone.0002793
19. Hilbert, David W., & Piggot, Patrick J. (2004). Compartmentalization of Gene Expression during *Bacillus subtilis* Spore Formation. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68(2), 234-262. doi: 10.1128/mnbr.68.2.234-262.2004
20. Jiang, Min, Shao, Weilan, Perego, Marta, & Hoch, James A. (2000). Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in

- Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 38(3), 535-542. doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.02148.x
21. Kobayashi, K, Shoji, K, Shimizu, T, Nakano, K, Sato, T, & Kobayashi, Y. (1995). Analysis of a suppressor mutation *ssb* (*kinC*) of *sur0B20* (*spo0A*) mutation in *Bacillus subtilis* reveals that *kinC* encodes a histidine protein kinase. *Journal of Bacteriology*, 177(1), 176-182.
 22. Kozłowicz, B.K., Dworkin, M., Dunny, G.M. (2006). Pheromone-inducible conjugation in *Enterococcus faecalis*: a model for the evolution of biological complexity? *International Journal of Medical Microbiology*, 296(2-3), 141–147. DOI: 10.1016/j.ijmm.2006.01.040
 23. Lereclus, D, Agaisse, H, Gominet, M, Salamitou, S, & Sanchis, V. (1996). Identification of a *Bacillus thuringiensis* gene that positively regulates transcription of the phosphatidylinositol-specific phospholipase C gene at the onset of the stationary phase. *Journal of Bacteriology*, 178(10), 2749-2756.
 24. Molle, Virginie, Fujita, Masaya, Jensen, Shane T., Eichenberger, Patrick, González-Pastor, José E., Liu, Jun S., & Losick, Richard. (2003). The *Spo0A* regulon of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 50(5), 1683-1701. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03818.x
 25. Novick, R.P., Geisinger, E. (2008). Quorum Sensing in *Staphylococci*. *Annual Review of Genetics*, 42(1), 541-564. DOI: doi:10.1146/annurev.genet.42.110807.091640
 26. Novick, Richard P., & Geisinger, Edward. (2008). Quorum Sensing in *Staphylococci*. *Annual Review of Genetics*, 42(1), 541-564. doi: doi: 10.1146/annurev.genet.42.110807.091640
 27. 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(3), 619-633. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2011.07839.x
 28. Perego, M. (2001). A new family of aspartyl phosphate phosphatases targeting the sporulation transcription factor *Spo0A* of *Bacillus subtilis*.

- Molecular Microbiology, 42(1), 133-143. DOI: 10.1046/j.1365-2958.2001.02611.x
29. Piggot, PJ, & Coote, JG. (1976). Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriological Reviews*, 40(4), 908.
 30. Portugal, L., Gringorten, J. L., Caputo, G. F., Soberón, M., Muñoz-Garay, C., & Bravo, A. (2013). Toxicity and mode of action of insecticidal Cry1A proteins from *Bacillus thuringiensis* in an insect cell line, CF-1. *Peptides*.
 31. Pottathil, Mridula, & Lazazzera, Beth A. (2003). The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*. *Front Biosci*, 8, d32-d45.
 32. Rocha-Estrada, J., Aceves-Diez, A.E., Guarneros, G., de la Torre, M. (2010). The RNPP family of quorum-sensing proteins in Gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87(3), 913-923. DOI: 10.1007/s00253-010-2651-y
 33. Rocha, J., Flores, V., Cabrera, R., Soto-Guzmán, A., Granados, G., Juaristi, E., de la Torre, M. (2011). Evolution and some functions of the NprR–NprRB quorum-sensing system in the *Bacillus cereus* group. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(4), 1069-1078. DOI: 10.1007/s00253-011-3775-4
 34. Schneider, Katherine Bacon, Palmer, Tanya M., & Grossman, Alan D. (2002). Characterization of comQ and comX, Two Genes Required for Production of ComX Pheromone in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 184(2), 410-419. doi: 10.1128/jb.184.2.410-419.2002
 35. Soberón M & Bravo A (2007). Las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*: modo de acción y consecuencias de su aplicación. *Biotechnologia*; V14 CS3.indd 313
 36. Stephenson, Keith, & Hoch, James A. (2002). Evolution of signalling in the sporulation phosphorelay. *Molecular Microbiology*, 46(2), 297-304. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03186.x
 37. Stock, Ann M., Robinson, Victoria L., & Goudreau, Paul N. (2000). TWO-COMPONENT SIGNAL TRANSDUCTION. *Annual Review of Biochemistry*, 69(1), 183-215. doi: doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.183

38. Strauch, M, Webb, V, Spiegelman, G, & Hoch, J A. (1990). The SpoOA protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 87(5), 1801-1805.
39. Uehara, Hiroshi, Yoneda, Yuko, Yamane, Kunio, & Maruo, Bunji. (1974). Regulation of Neutral Protease Productivity in *Bacillus subtilis*: Transformation of High Protease Productivity. *Journal of Bacteriology*, 119(1), 82-91.
40. Wang, Y., Deng, C., Peng, Q., Chen, Z., Huang, D., Zhang, J., & Song, F. (2010). [Effect of quorum sensing response regulator *nprR* deletion on expression of cry protein in *Bacillus thuringiensis*]. *Wei sheng wu xue bao= Acta microbiologica Sinica*, 50(11), 1550-1555.
41. Waters, C. M., & Bassler, B. L. (2005). Quorum sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 21, 319-346.
42. Wolanin, Peter, Thomason, Peter, & Stock, Jeffry. (2002). Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biology*, 3(10), reviews3013.3011 - reviews3013.3018.
43. 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.