

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

"Aislamiento de péptidos señal putativos de *Bacillus thuringiensis* y estimulación de la esporulación por los pentapéptidos NprRB y CSF"

Por:

ANGEL EMILIO ACEVES DIEZ

**TESIS APROBADA POR LA
COORDINACIÓN DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS**

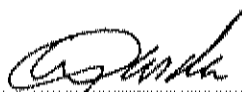
HERMOSILLO, SONORA

JULIO DEL 2005

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se de el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, A.C., previa aprobación escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de la tesis.

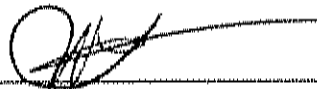


Dr. Alfonso Gardea Béjar

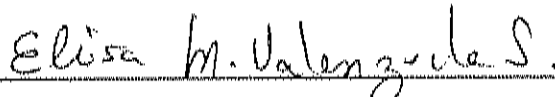
Director General

APROBACIÓN

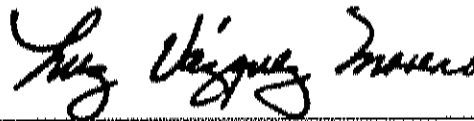
Los miembros del comité designado para revisar la tesis del Q.F.B. Angel Emilio Aceves Diez, lo han encontrado satisfactorio y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



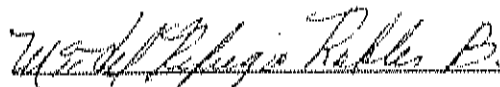
Dra. Mayra de la Torre Martínez
Directora de Tesis



Dra. Elisa M. Valenzuela Soto



Dra. Luz Vázquez Moreno



M.C. Refugio Robles Burgueño

DEDICATORIA

A DIOS

Por darme la oportunidad de crecer y llegar a este punto de mi vida con tus bendiciones y permitirme mejorar cada día de mi vida como persona y profesionalista, por estar siempre a mi lado en los triunfos y derrotas. Porque nunca me has abandonado.

A MIS PADRES

Por darme la vida, por su gran amor, apoyo incondicional y confianza ciega que siempre me han profesado. Por enseñarme a vivir y porque si he llegado hasta aquí es gracias al esfuerzo tan grande que han hecho por mi.

A MI HIJA

Por ser el motor y la razón de querer ser mejor cada día y la alegría de mi vida. Porque desde que llegaste me siento una mejor persona. Por darme la fuerza de seguir adelante cuando parece que todo se viene abajo. Porque todo lo que hago es por ti.

DEDICATORIA

A MIS HERMANOS

Por haber estado conmigo en todos los momentos de mi vida, buenos y malos. Por haber compartido una infancia feliz conmigo, por su apoyo y comprensión en todo momento.

A PAOLA

Por su amor, comprensión y gran apoyo antes y durante el desarrollo de este y otros proyectos de mi vida. Por hacer mi vida más emocionante y divertida. Por ayudarme en los momentos más difíciles de mi vida y estar siempre a mi lado con su amor.

A LA FAMILIA MORENO NAVARRO

Por brindarme su amistad y amor siempre. Por apoyarme en las decisiones importantes de mi vida y confiar plenamente en mí. Porque han sido una pieza fundamental para realizar este sueño.

AGRADECIMIENTOS

Al Conacyt por la beca crédito No 183921. Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. por la oportunidad de seguir mi formación científica y por las facilidades e instalaciones prestadas para la realización de este proyecto. Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN Unidad Irapuato por la donación de la cepa de *Bacillus subtilis*. A los miembros de mi comité de tesis y a la Dra. Ana María Calderón de la Barca por sus valiosas sugerencias y apoyo técnico. A los laboratorios del departamento de Ciencias de los Alimentos del CIAD; A.C., por la ayuda técnica prestada.

A la Dra. Mayra de la Torre Martínez por abrirme las puertas y darme la oportunidad de conocer lo fascinante de la investigación científica, por la confianza depositada para realizar este proyecto y por su apoyo en todos los aspectos. Por hacer realidad mi sueño.

Al grupo de trabajo de laboratorio por su apoyo técnico y amistad: Ali Assaf, Yolanda Reyes, Ana Lourdes Mata, Patricio Araneda.

Al Ing. Calixto Ortega Moreno de la planta piloto de fermentaciones del CINVESTAV-IPN, por su amistad, consejos y enseñanzas a lo largo de mi estancia en esta planta.

A Gerardo Reyna de la biblioteca del CIAD, A.C. por su amistad y apoyo en mis búsquedas bibliográficas. A Ana Isabel Escobedo por las atenciones prestadas.

INDICE

LISTA DE TABLAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS	x
1. RESUMEN	xii
2. INTRODUCCIÓN	1
3. ANTECEDENTES	3
3.1. <i>Bacillus thuringiensis</i> : Cercanía Filogenética con <i>Bacillus subtilis</i>	3
3.2. Comunicación Célula a Célula en <i>Bacillus subtilis</i> Mediada por Quórum Sensing	5
3.2.1. Factores Extracelulares de Comunicación Célula a Célula	6
3.2.2. Competencia Genética	7
3.2.3. Esporulación.....	9
3.2.3.1. Regulación de la esporulación.....	10
3.2.3.2. Expresión de genes de esporulación mediante Spo0A	13
3.2.3.3. Septación asimétrica y compartimentalización.....	14
3.2.3.4. Expresión genética específica de cada compartimiento: cascada de factores sigma específicos de esporulación	15
3.3. Retraso en la Esporulación y Expresión de los Genes <i>cry</i> en <i>Bacillus thuringiensis</i>	18
3.4. Evidencia Genética de la Posible Existencia de Péptidos Señal en <i>Bacillus thuringiensis</i>	19
4. JUSTIFICACIÓN	21
5. HIPÓTESIS	22
6. OBJETIVOS	23
6.1. Objetivo General	23
6.2. Objetivos Específicos	23
7. MATERIALES Y MÉTODOS	24
7.1. Microorganismos	24
7.2. Medios de Cultivo	24

7.3. Aislamiento de los Péptidos	25
7.3.1. Preparación de las Muestras	25
7.3.2. Análisis Mediante HPLC-MS	26
7.4. Ensayos de Actividad Biológica.....	26
7.5. Ensayo de β -galactosidasa	27
7.6. Cuenta de Células y Esporas	27
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
8.1. Efecto de los Péptidos CSF de <i>Bacillus subtilis</i> y NprRB de <i>Bacillus thuringiensis</i> en Ambas Bacterias.....	28
8.2. Identificación de Péptidos.....	37
9. CONCLUSIONES.....	41
10. PERSPECTIVAS.....	42
11. BIBLIOGRAFÍA	43
12. ABREVIACIONES	48

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Nombre y secuencia inferida de péptidos de la familia Phr de <i>Bacillus subtilis</i>	7
Tabla 2. Comparación de masas entre péptidos señal de <i>B. subtilis</i> y probables péptidos señal de <i>B. thuringiensis</i> identificados por HPLC-MS.....	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Quórum sensing</i> en <i>B. subtilis</i>	5
Figura 2. Mecanismos de regulación de la expresión de <i>srfA</i> y desarrollo de la competencia en <i>B. subtilis</i>	9
Figura 3. Cascada de fosforilación que regula la esporulación en <i>B. subtilis</i>	13
Figura 4. Cascada de activación de los factores sigma de esporulación.....	16
Figura 5. Similitud de los cassettes <i>rap-phr</i> de <i>B. thuringiensis</i> y <i>B. subtilis</i>	19
Figura 6. Alineación del gen <i>phr</i> putativo de <i>B. thuringiensis</i> con el gen <i>phr</i> de <i>B. subtilis</i>	20
Figura 7. Cinéticas de crecimiento de <i>B. subtilis</i> (CSF).....	28
Figura 8. Cinéticas de crecimiento y actividad de β -galactosidasa de <i>B. thuringiensis</i> (CSF).....	30
Figura 9. Cinéticas de crecimiento de <i>B. subtilis</i> (NprRB).....	32
Figura 10. Cinéticas de crecimiento y actividad de β -galactosidasa de <i>B. thuringiensis</i> (NprRB).....	33
Figura 11. Mecanismo propuesto para el sistema de regulación de la esporulación mediado por péptidos señal.....	35

Figura 12. Cromatogramas de fase de transición y medio de cultivo de <i>B. thuringiensis</i>	37
Figura 13. Cromatogramas de fase de transición y fase exponencial de <i>B. thuringiensis</i>	38
Figura 14. Fracciones obtenidas mediante HPLC-MS que se encuentran exclusivamente en el sobrenadante de la fase de transición.....	39

1. RESUMEN

En *Bacillus subtilis* la comunicación célula-célula es mediada por péptidos señal que están implicados en un mecanismo llamado Quórum sensing, el cuál permite a la bacteria censar la densidad celular, controlar su expresión genética y regular la esporulación. Resultados previos de nuestro grupo de investigación sugirieron la existencia de péptidos señal en *Bacillus thuringiensis*.

El objetivo de este trabajo fue demostrar que en *B. thuringiensis* existe un sistema de regulación de la esporulación mediado por péptidos señal similar al encontrado en *B. subtilis*. Para lo cual se estudió el efecto sobre esporulación en ambas bacterias del péptido señal CSF de *B. subtilis* y de un péptido señal putativo de *B. thuringiensis* (NprRB). Además, puesto que en esta última bacteria la expresión de *cry1Aa* (gen que codifica para la proteína tóxica Cry) se lleva a cabo a partir de dos promotores (B_I y B_{II}), uno de los cuales se enciende en las etapas tempranas de esporulación y el otro en las tardías, se estudió la cinética de expresión de este gen.

CSF estimuló la esporulación en *B. subtilis* pero no en *B. thuringiensis*, sin embargo, en esta bacteria incrementó la liberación de esporas y la expresión de *cry1Aa* a partir del promotor tardío (B_{II}), cuya transcripción requiere σ_{H} . NprRB no tuvo ningún efecto sobre *B. subtilis*, pero en *B. thuringiensis* aumentó la esporulación, la expresión de *cry1Aa* a partir del promotor tardío y la liberación de esporas. Estos resultados demuestran que en *B. thuringiensis* existe un sistema de comunicación célula-célula mediado por péptidos señal que regula la esporulación y por ende la expresión de *cry1Aa*.

Por otro lado, se logró aislar mediante HPLC-MS cinco fracciones que contienen en total 47 péptidos candidatos que se encuentran exclusivamente en el sobrenadante de *B. thuringiensis* en fase de transición, de los cuales seis presentan masas moleculares similares a los péptidos señal de la familia Phr de *B. subtilis*.

2. INTRODUCCIÓN

Cuando hay una disminución en la concentración de nutrientes, los bacilos esporulados gram positivos entran a una fase de transición en la cuál, las células redirigen su metabolismo y fisiología para enfrentarse a las condiciones hostiles y entrar en un proceso de diferenciación celular que conduce a la formación de una spora (Phillips y Strauch, 2002). Esta spora tiene un metabolismo atenuado y es muy resistente a los cambios ambientales. En las esporas se incorporan mecanismos para sensor las condiciones ambientales, de manera que cuando las condiciones favorables regresen puedan germinar y reanudar el crecimiento activo.

En *Bacillus subtilis* se requieren aproximadamente 100 genes para regular el proceso de esporulación, una vez iniciada, la bacteria no puede regresar a la fase vegetativa y para la sobrevivencia de la especie se tiene que completar el proceso. Por lo que los bacilos tienen mecanismos regulatorios que les permiten integrar la información metabólica, ambiental y fisiológica para determinar si hay nutrientes alternativos para seguir creciendo, o si se inicia la esporulación. Para iniciar este proceso la bacteria debe de contar con una reserva adecuada de nutrientes para completarlo, ya que es un proceso que requiere energía. Una vez que la elección está hecha, la expresión de ciertos genes va a detenerse y se va a encender la expresión de otros que son necesarios para desarrollar la opción elegida (Phillips y Strauch, 2002).

En una población, las bacterias se comunican entre sí mediante señales químicas secretadas para coordinar su comportamiento y así tomar decisiones que les permitan adaptarse a los cambios del medio ambiente para asegurar que sobreviva la especie. En esta forma funcionan como organismos

multicelulares (Dunny y Leonard, 1997; Havarstein *et al.*, 1995). La esporulación es una respuesta a *quórum sensing* mediada por péptidos señal y en este trabajo se investigó el efecto de algunos péptidos señal en *Bacillus thuringiensis*, por la importancia que reviste este mecanismo en la producción masiva de las esporas y de las toxinas Cry, que se expresan durante la esporulación, para ser utilizadas como bioinsecticidas. Previamente se propuso que la comunicación célula a célula en esta bacteria podría ser la causa para que en cultivos a alta concentración celular, se tuvieran bajas eficiencias de esporulación y rendimientos específicos de toxinas Cry inferiores a los logrados en cultivos con una concentración celular menor (López-y-López y de la Torre, 2005).

3. ANTECEDENTES

3.1. *Bacillus thuringiensis*: Cercanía Filogenética con *Bacillus subtilis*

B. thuringiensis es el bioinsecticida de mayor aplicación a nivel mundial. La actividad insecticida de la bacteria se debe a proteínas que cristalizan en las células, denominadas proteínas Cry (Cry1A, Cry4A, Cry4B, Cry11A y Cyt1A) (Poncet *et al.*, 1997). Los genes que codifican para estas proteínas, se localizan en plásmidos y la expresión de la mayoría de ellos es regulada por los factores sigma de esporulación. Por ello, la síntesis de estas proteínas está ligada al proceso de diferenciación celular que conlleva a la formación del esporangio y finalmente a la liberación de las esporas maduras. La expresión de genes durante la fase estacionaria, así como el proceso de esporulación y su fisiología han sido estudiados fundamentalmente en *B. subtilis*, pero dada la cercanía filogenética entre ambas especies es posible extrapolar algunos conceptos y principios fundamentales a *B. thuringiensis*.

La regulación genética compartamental y temporal durante el proceso de esporulación en *B. thuringiensis* es muy similar a la de *B. subtilis* y las proteínas Spo0A encargadas de activar genes específicos de esporulación, de *B. thuringiensis* y de *B. subtilis* son homólogas (Lereclus *et al.*, 1994). Además, los genes que codifican para dos factores sigma de esporulación en *B. thuringiensis* ya han sido identificados y secuenciados. La función de los factores sigma codificados por estos genes es la de regular la transcripción de otros genes involucrados en el proceso de esporulación. Estos factores sigma se han denominado σ^{36} y σ^{28} y son homólogos a los factores σ^E y σ^K específicos de la célula madre de *B. subtilis* (Adams *et al.*, 1991).

En *B. thuringiensis*, muchos genes *cry* son transcritos por dos formas de ARN-polimerasa que contienen a los factores transcripcionales σ^E o σ^K . La transcripción se inicia en la etapa II de esporulación con la forma de ARN-polimerasa que contiene a σ^E y continúa durante la esporulación tardía con la forma de la enzima que contiene a σ^K . Esta transcripción, con dos factores de transcripción y a partir de dos promotores diferentes en el caso de *cry1A*, asegura la síntesis prolongada y una acumulación en grandes cantidades de las protoxinas (Aronson, 2002).

Otros genes *cry* utilizan únicamente a la ARN-polimerasa que contiene al factor σ^E , por lo que la síntesis de protoxina está confinada a un periodo corto durante la esporulación (Baum y Malvar, 1995). Además, para al menos dos genes *cry* (*cry4A* y *cry11A*) la transcripción es iniciada a un nivel bajo al final del crecimiento vegetativo por una ARN-polimerasa con σ^H (codificada por el gen *spo0H*) (Poncet *et al.*, 1997). Una variación interesante en el uso de ARN-polimerasas de esporulación es que las regiones promotoras duales, para las formas σ^E y σ^K de la enzima utilizada por muchos genes *cry*, se traslapan (Baum y Malvar, 1995; Sedlak *et al.*, 1998). Algunos genes de esporulación contienen estos dos promotores en tandem y hay dos genes de esporulación de función desconocida con dichos traslapes, aunque su significado no es conocido. Se ha encontrado que este arreglo extraño de los promotores es importante para modular la transcripción de los genes *cry1* (Sedlak *et al.*, 1998). Debido a que hay una transcripción aproximadamente igual desde ambos promotores, se asegura como ya se mencionó antes, una velocidad constante de síntesis de protoxina por un periodo prolongado (Aronson, 2002).

3.2. Comunicación Célula a Célula en *Bacillus subtilis* Mediada por Quórum Sensing

El término *quórum sensing* se ha utilizado para describir una serie de mecanismos moleculares, empleados por las bacterias para monitorear la densidad de la población (Fuqua *et al.*, 1994). Este sistema de comunicación célula-célula permite a las bacterias responder a las condiciones ambientales detectadas (Dunny y Leonard, 1997). En *B. subtilis* el *quórum sensing* regula el desarrollo de la esporulación y de la competencia genética y es llevado a cabo mediante la producción, liberación y subsecuente detección y respuesta de señales moleculares de naturaleza peptídica llamadas autoinductores (Fig.1). La acumulación de una concentración estimuladora de un autoinductor, sólo puede ocurrir cuando hay un número suficiente de células "a quórum" y se requiere una concentración umbral del autoinductor para que se desencadene la respuesta (Bassler, 2002).

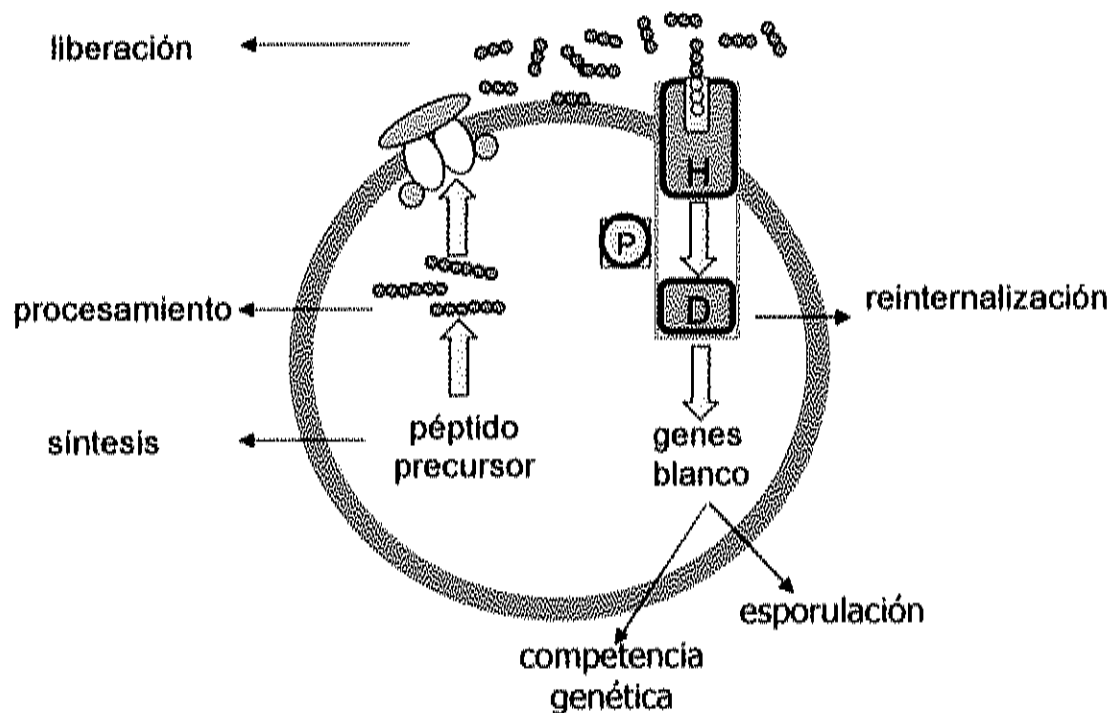


Figura 1. Quórum sensing en *B. subtilis*. El Sistema de traducción de señales ocurre mediante una cascada de fosforilación (P). En la figura se muestran la histidina cinasa y un regulador de respuesta, los cuales presentan sitios de fosforilación en una histidina (H) y en un aspartato (D), respectivamente (Modificado de Bassler, 2002)

3.2.1. Factores Extracelulares de Comunicación Célula a Célula

En *B. subtilis* el desarrollo de la competencia genética y esporulación está regulado por factores extracelulares de comunicación que son péptidos pequeños, los cuales son procesados a partir de péptidos de mayor tamaño. Estos péptidos ya procesados son exportados activamente por las células y posteriormente interactúan con los dominios externos de proteínas sensoras localizadas en la membrana o son transportados al interior de la célula (Fig.1). Hay un péptido específico para cada proteína receptora (Stephen y Bassler, 2002) y para que activen una respuesta biológica, usualmente se requieren concentraciones en un rango nanomolar o menor (Dunny y Leonard, 1997). Dentro de los péptidos transportados al interior de la célula destacan los de la familia Phr (Tabla 1).

Los péptidos señal Phr son secretados por la bacteria, posteriormente y a pesar de la presencia de peptidasas intracelulares, son reinternalizados activamente al interior de la célula donde interactúan con receptores intracelulares para regular la expresión genética (Pottathil y Lazazzera, 2003). Estos receptores son miembros de la familia de las aspartil-fosfato fosfatasas, las Rap fosfatasas. Estas fosfatasas causan la desfosforilación de proteínas reguladoras de respuesta de las que se hablará mas adelante. Inmediatamente corriente abajo de los genes que codifican para las Rap fosfatasas se encuentran los genes que codifican para los péptidos Phr formando cassettes *rap-phr*. Se han identificado al menos siete cassettes *rap-phr* en *B. subtilis* (Pottathil y Lazazzera, 2003).

Tabla 1. Nombre y Secuencia inferida de péptidos de la familia Phr de *Bacillus subtilis*

<i>Bacillus subtilis</i>	
Nombre	Secuencia
PhrA	ARNQT
CSF (PhrC)	ERGMT
PhrE*	SRNVT
PhrF*	QRGMI
PhrG*	EKMIG
PhrI*	DRVGA
PhrK*	ERPVG

* Su función no ha sido determinada.

Lazazzera, 2001

3.2.2. Competencia Genética

La competencia genética se define como la habilidad natural de las células para tomar ADN exógeno (Dubnau, 1991). Bajo condiciones apropiadas de crecimiento, una subpoblación de células en un cultivo sufre un proceso de diferenciación para volverse competente. Estas últimas son metabólicamente menos activas que las células no competentes. La diferenciación requiere de la expresión de varios genes reguladores, lo cual da como resultado la producción de proteínas especializadas que se unen a ADN (Magnuson *et al.*, 1994).

En *B. subtilis* las primeras etapas del desarrollo de la competencia son reguladas en respuesta a dos péptidos señal. Uno de ellos es el factor estimulante de competencia y esporulación (CSF). Este es un pentapéptido que corresponde a los últimos cinco aminoácidos del extremo carboxilo terminal de un propéptido de 40 aminoácidos codificado por *phrC* (Solomon *et al.*, 1996). El otro es la feromona ComX.

CSF fue purificado del sobrenadante de un cultivo libre de células, basándose en su habilidad para estimular la transcripción de un promotor temprano de competencia (*srfA*) en cultivos con baja densidad celular (Solomon *et al.*, 1996). La transcripción de *srfA* es activada directamente por la forma fosforilada del factor de transcripción ComA (Nakano y Zuber, 1991). ComA es fosforilado en un residuo de aspartato en el dominio N-terminal regulatorio, típico de la familia de proteínas reguladoras de respuesta. La fosforilación de ComA es controlada principalmente por ComP que es una histidina cinasa que se autofosforila en un residuo de histidina y dona fosfatos a ComA. La transcripción del operón *srfA* se incrementa cuando las células están creciendo a una alta densidad, debido a la acumulación de CSF y del segundo factor peptídico extracelular, la feromona ComX, que es un péptido de 10 aminoácidos con un residuo modificado de triptofano (Magnuson *et al.*, 1994) (Fig. 2).

CSF y la feromona ComX estimulan la transcripción de *srfA* mediante el incremento en la concentración de ComA fosforilado. Se ha comprobado que ComX estimula la actividad de la cinasa ComP (Solomon *et al.*, 1995), mientras que CSF probablemente inhibe (directa o indirectamente) la actividad de RapC fosfatasa. CSF tiene al menos tres actividades: 1) A bajas concentraciones (1-10 nM) estimula la expresión de *srfA*, probablemente mediante la inhibición de la actividad de RapC fosfatasa (Fig. 2). 2) A altas concentraciones (20 nM-1 μ M) inhibe la expresión de *srfA*, mediante un mecanismo que es independiente

de *rapC* (Lazazzera *et al.*, 1997) y 3) A altas concentraciones también estimula la esporulación (Solomon *et al.*, 1996). Estas respuestas a CSF dependen de la expresión de *spo0K* (*opp*) que codifica para una oligopéptido permeasa (Solomon *et al.*, 1995), la cual es miembro de la familia de proteínas transportadoras que tienen un sitio de unión a ATP (Perego *et al.*, 1991).

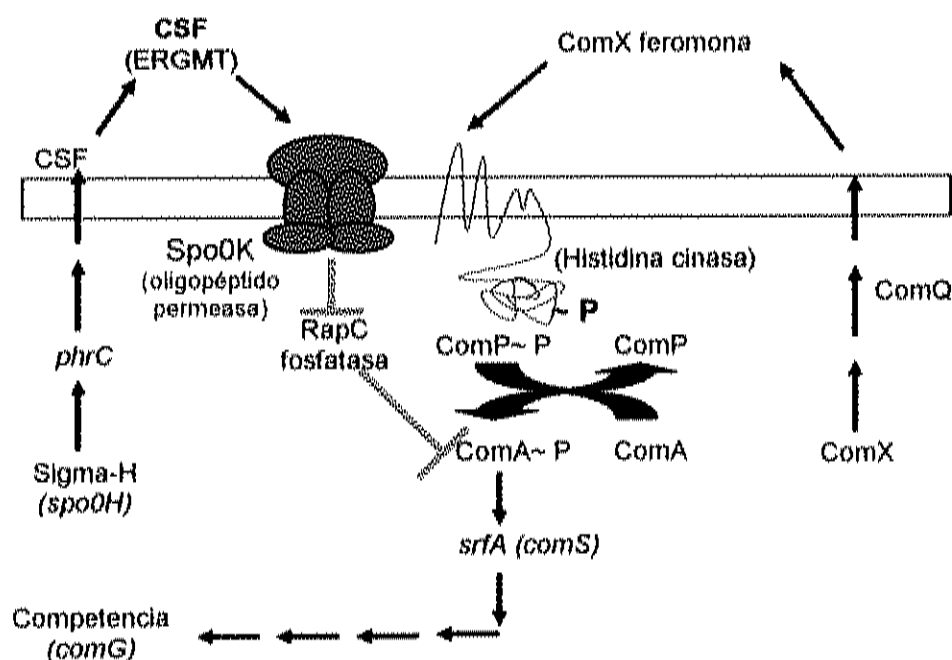


Figura 2. Mecanismos de regulación de la expresión de *srfA* y desarrollo de la competencia en *B. subtilis*. Dos factores extracelulares, la feromona ComX y el péptido señal CSF, estimulan la expresión de *srfA* (*comS*). (Solomon *et al.*, 1996).

3.2.3. Esporulación

Para que se inicie la formación de la espora en *B. subtilis*, se requiere de una serie de señales fisiológicas y ambientales (Ireton *et al.*, 1993). La privación de fuentes de carbono, nitrógeno o fósforo, constituye la primera señal. Además

de esta privación de nutrientes, las células tienen que estar a una densidad relativamente alta (Grossman y Losick, 1988) y sintetizando ADN (Ireton y Grossman, 1992). Estas tres condiciones tienen que estar presentes para el inicio exitoso de la esporulación. Además, *B. subtilis* tiene mecanismos que le permiten sentir e integrar estas señales para asegurar el desarrollo apropiado de la respuesta (Ireton *et al.*, 1993).

3.2.3.1. Regulación de la esporulación. El inicio de la esporulación en *B. subtilis* está regulado por un sistema multicomponente de transducción de señales sujeto a regulación espacial y temporal por una cascada de fosforilación. Este sistema se denomina en inglés "Phosphorelay" (Burbulys *et al.*, 1991). La naturaleza multicomponente de este sistema permite la entrada e integración de múltiples señales ambientales y tiene numerosos puntos de regulación (Phillips y Strauch, 2002). La fosforilación del factor de transcripción Spo0A es un punto de regulación crucial en este sistema de transducción de señales. Spo0A~P tiene dos funciones importantes para la respuesta adaptativa de la célula a la limitación de nutrientes. La primera función, que es la represión de la transcripción de *abrB*, se lleva a cabo sólo a bajas concentraciones intracelulares de Spo0A~P (Phillips y Strauch, 2002). La proteína AbrB se encarga de inhibir de forma indirecta la transcripción de los genes de esporulación durante el crecimiento. Si la concentración de Spo0A~P alcanza un nivel muy alto, entonces es capaz de activar la expresión de genes que son requeridos para el inicio de la esporulación (Fig. 3).

Se ha demostrado que cuatro histidinas cinasas (KinA, B, C y D) son capaces de iniciar la cascada de fosforilación (Jiang *et al.*, 2000b). La naturaleza de las señales por medio de las cuales las cinasas responden todavía no se conoce. El blanco de la actividad de estas cinasas es la proteína

Spo0F, la cual funciona como un mensajero secundario (Fig. 3). El grupo fosforil del Spo0F~P es transferido a la proteína Spo0B y de ésta a la proteína Spo0A (Fig. 3). KinC y KinD son las encargadas de generar un nivel de Spo0A~P suficiente para regular el inicio de la expresión genética del estado de transición (vía represión de *abrB*). Sin embargo, estos niveles no son suficientes para activar la expresión de los genes específicos de esporulación (Jiang *et al.*, 2000b). Para alcanzar los niveles requeridos para esta activación se requiere la actividad de KinA y KinB, por lo tanto, estas cinasas son las más importantes para la esporulación.

Presumiblemente la función de Spo0F y Spo0B como intermediarios entre las cinasas y Spo0A es proveer un control adicional al flujo de fosfatos a través de la ruta. Al menos tres fosfatasa (RapA, B y E), son capaces de desfosforilar a Spo0F~P (Jiang *et al.*, 2000a). La actividad de estas fosfatasas está regulada por péptidos señal que provienen del procesamiento de los péptidos Phr. Algunos de estos péptidos pueden funcionar como feromonas y moléculas de *quórum sensing* que proveen información sobre la densidad celular local. Un total de once miembros de la familia Rap son cotranscritos con estos péptidos precursores Phr. Los péptidos CSF (PhrC) y PhrA son derivados de péptidos de mayor tamaño codificados por los genes, *phrC* y *phrA*, respectivamente (Solomon *et al.*, 1996; Perego y Hoch, 1996). Estos péptidos son de aproximadamente cuarenta aminoácidos y tienen en su extremo carboxilo terminal, la secuencia correspondiente al péptido señal maduro de cinco aminoácidos.

Además, los genes *phrA* y *phrC* se encuentran inmediatamente corriente abajo y parcialmente superpuestos a los genes *rapA* y *rapC* respectivamente (Pottathil y Lazazzera, 2003). *rapA* codifica para la fosfatasa sobre la que actúa PhrA y *rapC* para aquella sobre la que actúa CSF (Solomon *et al.*, 1996; Perego

y Hoch, 1996), de esta manera los genes *rap* y *phr* parecen formar un cassette fosfatasa/péptido señal. Hasta el momento en *B. subtilis* se han identificados cinco cassettes *rap-phr* adicionales basándose en la similitud de la secuencia de aminoácidos con las de los cassettes *phrA-rapA* y *phrC-rapC* (Pottathil y Lazazzera, 2003). Todas las fosfatasas tienen 375 aminoácidos y comparten una homología mayor del 25%. Las proteínas Phr no comparten una homología significativa de aminoácidos, sin embargo, si son semejantes en el tamaño y posición de la secuencia putativa para exportar. Se ha demostrado que el cassette *rapE-phrE* funciona de manera análoga a los cassettes *rapA-phrA* y *rapC-phrC* (Jiang *et al.*, 2000a). Estas observaciones han permitido proponer un modelo en el cual los péptidos señal de cinco aminoácidos que provienen de un péptido precursor son importados para inhibir la actividad de su Rap fosfatasa correspondiente.

La ligera superposición del gen *rap* con su correspondiente gen *phr* sugiere que son cotranscritos (Pottathil y Lazazzera, 2003), aunque seis de los siete *phr* son también transcritos de manera independiente de su gen *rap*. Inmediatamente corriente abajo de los genes *phrC*, *phrE*, *phrF*, *phrG*, *phrI* y *phrK* se localiza un promotor que es reconocido por un factor sigma alternativo llamado sigma H (Lazazzera *et al.*, 1999; Mcquade *et al.*, 2001). Sigma H es requerido para la esporulación y es activado durante la fase de transición. Este promotor adicional podría servir para asegurar que la concentración de péptido señal Phr relativa a la Rap fosfatasa sea lo suficientemente alta para inhibir la función de la fosfatasa (Pottathil y Lazazzera, 2003).

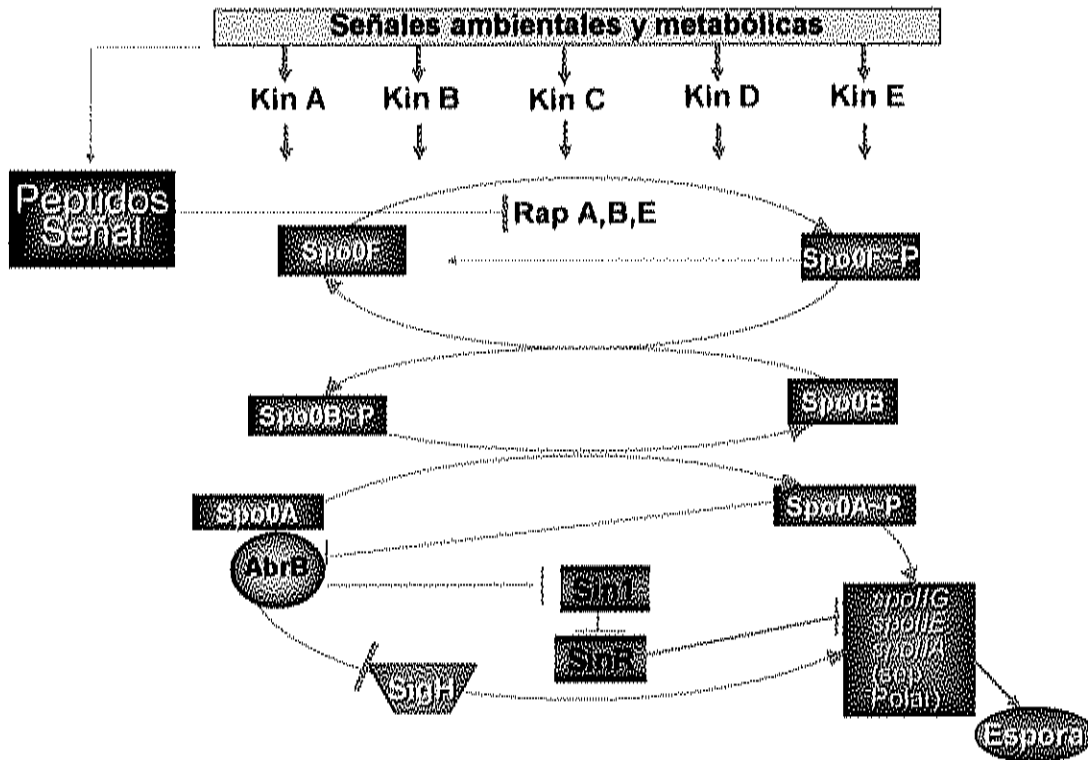


Figura 3. Cascada de fosforilación que regula la esporulación en *B. subtilis*.
Modificado de: Phillips y Strauch, 2002

3.2.3.2. Expresión de genes de esporulación mediante Spo0A.

Spo0A~P como ya se mencionó, también es requerida para la activación de los operones *spoliA*, *spoliG* y *spoliE* necesarios para el inicio de la esporulación (Fig. 3). La fosforilación de Spo0A incrementa la afinidad de sus sitios de unión a los operones *spoliA*, *spoliG* y *spoliE* (Strauch *et al.*, 1990). Spo0A, también incrementa la expresión de sus blancos mediante otros dos mecanismos indirectos importantes. Estos mecanismos son consecuencia de la represión de *abrB* por Spo0A~P. Uno es el incremento en los niveles de σ^H (*spoliA* es σ^H -dependiente) (Weir *et al.*, 1991) y el otro es la disminución de la actividad de

SinR, debido a que SinR es la encargada de reprimir a los genes *spolIA* *spolIG* y *spolIE* (Phillips y Strauch, 2002) (Fig. 3).

3.2.3.3. Septación asimétrica y compartimentalización. La etapa II de esporulación se caracteriza por la formación de un septo asimétrico que divide a la célula en dos compartimientos de tamaño no equivalente, la prespora y la célula madre (Phillips y Strauch, 2002). Cabe mencionar que antes de que ocurra la septación polar, la célula es todavía capaz de regresar al crecimiento activo o entrar a una fase estacionaria hasta que las señales apropiadas sean recibidas.

La septación polar empieza antes de que se complete la segregación de los cromosomas, por esta razón, únicamente por un periodo corto una porción pequeña del cromosoma (~30%) queda atrapada dentro del compartimiento de la prespora (Wu y Errington, 1994). Después de aproximadamente 15 minutos, el cromosoma restante es bombeado a través del septo a la prespora vía *SpolIIE*, la cual tiene una actividad de ADN traslocasa. La pequeña porción de ADN que inicialmente entró en la prespora contiene el origen de la replicación, incluyendo al gen *spolIIE* (Wu y Errington, 1994).

Aunque el septo divide físicamente a la célula (actualmente llamada esporangio) en dos compartimientos y cada uno tiene diferentes patrones de expresión genética, existe comunicación entre ambos. De hecho, para que la espora se forme correctamente, los dos compartimientos deben estar en una comunicación activa.

3.2.3.4. Expresión genética específica de cada compartimiento: cascada de factores sigma específicos de esporulación. Antes de que se complete la formación del septo polar, los factores sigma σ^F y σ^E son sintetizados en su forma inactiva y están presentes en ambos compartimientos del esporangio. Sin embargo, únicamente el σ^F estará activo en la prespora y el σ^E en la célula madre. La expresión genética temprana en la prespora esta dirigida por σ^F y no sólo es necesaria para la aparición del factor tardío σ^G en la prespora, sino también para la activación del factor σ^E en la célula madre (Phillips y Strauch, 2002). Del mismo modo, la expresión genética temprana en la célula madre esta dirigida por σ^E y no sólo es necesaria para la aparición del factor tardío σ^K en la célula madre, sino también para la activación de σ^G en la prespora (Fig. 4).

Por su parte, σ^F (*spollAC*) es el primer factor sigma específico de esporulación que aparece. Las proteínas reguladoras SpollAA y SpollAB son sintetizadas junto con σ^F antes de la división del esporangio y σ^F es mantenido en su estado inactivo mediante su asociación con el factor anti-sigma SpollAB (Duncan y Losick, 1993). Una vez que se ha dado la septación polar, la asociación entre σ^F y SpollAB en la prespora se rompe. Sin embargo, la asociación σ^F -SpollAB se mantiene en la célula madre después de la septación, asegurando así que σ^F en su forma activa esté presente únicamente en la prespora.

La proteína SpollAB actúa de tres maneras simultáneamente para asegurar que σ^F esté inactivo en la célula madre: 1) Como un factor anti-sigma, 2) Como una cinasa que fosforila a SpollAA impidiendo así la liberación de σ^F y 3) SpollAB forma un complejo con SpollAA desfosforilado (Fig. 4).

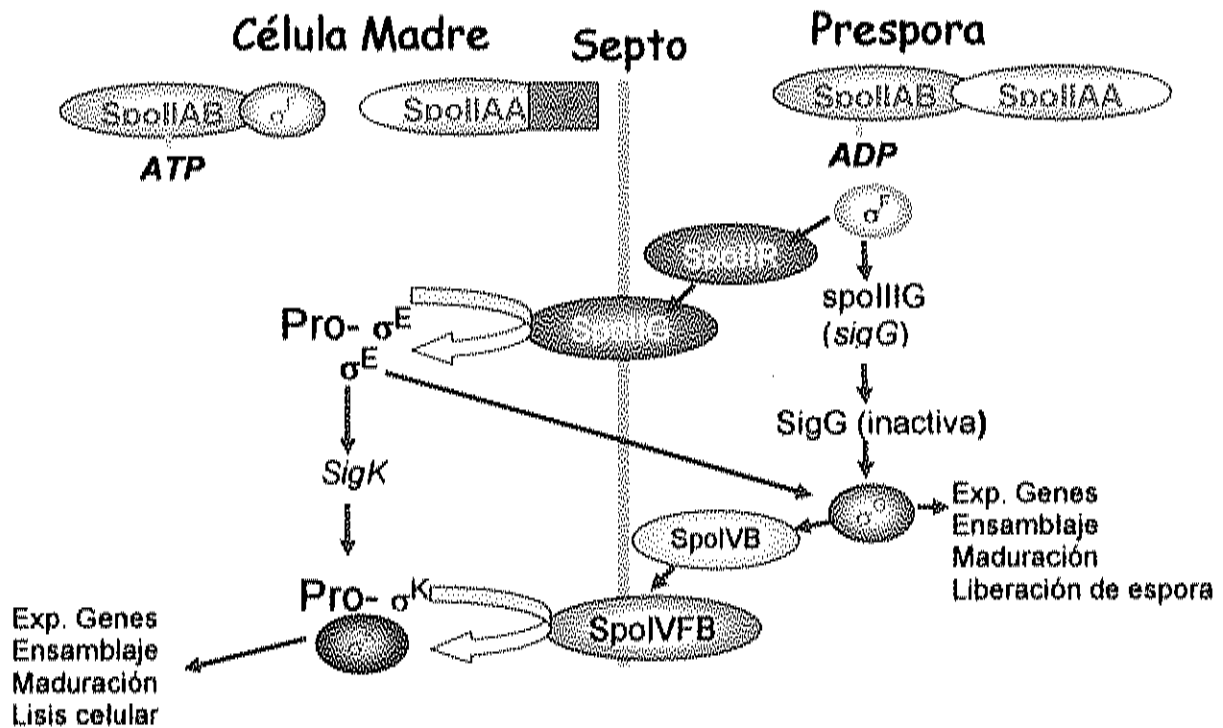


Figura 4. Cascada de activación de los factores sigma de esporulación (Phillips y Strauch, 2002).

En la prespora, se activa σ^F debido a que SpoIIAA contrarresta los efectos de SpoIIAB. SpoIIAA en su forma activa es capaz de desplazar a SpoIIAB de su complejo con σ^E , formándose así un complejo SpoIIAA-SpoIIAB y liberando a σ^E (Fig. 4). La concentración de SpoIIAA activo depende de la actividad cinasa de SpoIIAB y de la actividad fosfatasa de SpoIIIE. SpoIIAA fosforilado no puede interactuar con SpoIIAB. Debido a que SpoIIIE es sintetizado también antes de la septación, su actividad de fosfatasa puede darse hasta después de la septación y así únicamente aparece en la prespora (Phillips y Strauch, 2002). El mecanismo por el cual se retrasa la actividad de SpoIIIE es todavía desconocido.

El factor σ^F dirige la transcripción de *spolIG* y *spolIR*. El gen *spolIG* (*sigG*), codifica a σ^G , el cual es responsable de la expresión genética tardía en la prespora. *SpolIR* es requerida para la aparición de la actividad de σ^E en la célula madre. Al parecer ésta es secretada desde la prespora hacia la cavidad existente entre las dos membranas del septo polar, donde activa a la proteasa *SpolIGA* (Hofmeister *et al.*, 1995). *SpolIGA* corta a una proteína precursora, pro- σ^E , para así liberar al factor σ^E activo (Fig. 4). El mecanismo por medio del cual se lleva a cabo este procesamiento exclusivamente en la célula madre no está del todo claro.

El último factor sigma en aparecer durante la esporulación es σ^K , cuya actividad está restringida a la célula madre. Normalmente en *B. subtilis* el marco de lectura de *sigK* está interrumpido por un elemento de 48-kbp llamado *skin*. En este fragmento está codificada *SpoIVCA* que es una proteína recombinasa que escinde la secuencia *skin* quedando así *sigK* sin interrupciones. La transcripción de *spolVCA* y la subsecuente transcripción del gen intacto *sigK* está dirigida por σ^E y por una proteína reguladora conocida como *SpolIID* (Phillips y Strauch, 2002). Como en el caso de *sigE* (*spolIGB*), la traducción de *sigK* produce un precursor proteico inactivo, pro- σ^K . Su procesamiento requiere de la proteasa *SpoIVFB*, localizada en la membrana de la célula madre. Por lo menos dos proteínas localizadas en la célula madre (*SpoIVFA* y *BofA*) regulan negativamente la actividad de *SpoIVFB* (Rico *et al.*, 1992).

Una vez que σ^K y σ^G son activados en sus respectivos compartimientos, van a promover su propia transcripción mediante una autorregulación positiva. Estos factores de transcripción de la etapa tardía de esporulación son los responsables de la expresión de los genes necesarios para los pasos finales de ensamblaje, maduración y liberación de la espora completa.

3.3. Retraso en la Esporulaci3n y Expresi3n de los Genes cry en *Bacillus thuringiensis*

En varios trabajos se ha demostrado que *B. thuringiensis* puede alcanzar altas densidades celulares en un cultivo por lote alimentado; sin embargo, el grado de esporulaci3n observado es bajo (Arcas *et al.*, 1987; Kang *et al.*, 1992). Adem3s, la producci3n de prote3na Cry o de la actividad insecticida no incrementaron proporcionalmente al incrementarse la masa celular (Avignone-Rossa y Mignone, 1993). Para explicar este fen3meno se han propuesto diversas especulaciones sobre el requerimiento de una fuente de energ3a interna (Kang *et al.*, 1992).

Nuestro grupo de investigaci3n ha estudiado los cambios metab3licos y la expresi3n del gen *cry1Aa* en cultivos por lote y por lote alimentado, de una cepa de *B. thuringiensis* que conten3a una fusi3n *lacZ* con el promotor *cry1Aa*, adem3s de la cin3tica de liberaci3n de esporas. Los resultados obtenidos durante la alimentaci3n, demostraron que en el cultivo por lote alimentado la bacteria redirigi3 su metabolismo y adem3s redujo su velocidad espec3fica de crecimiento, a3n cuando la concentraci3n de nutrientes fue m3s alta que al inicio del cultivo. Estos cambios fisiol3gicos sugieren que el estado de transici3n se estableci3 durante la alimentaci3n (L3pez-y-L3pez y de la Torre, 2005).

Cuando el filtrado de un cultivo en el estado de transici3n, se a3adi3 a un cultivo por lote que se encontraba en la fase temprana de crecimiento exponencial, se observ3 un retraso en la expresi3n del gen *cry1Aa* y en la aparici3n de esporas. Esto indica que se retras3 la esporulaci3n, ya que el gen se transcribe a partir de la formaci3n del septo de la espora. Puesto que no hubo acumulaci3n de 3cido c3trico, el retraso en la esporulaci3n no se pudo

deber a la inhibición del proceso por este compuesto y se sugirió que la bacteria pudo haber excretado un compuesto durante el estado de transición que retrasó el inicio de la esporulación (López-y-López y de la Torre, 2005).

3.4. Evidencia Genética de la Posible Existencia de Péptidos Señal en *Bacillus thuringiensis*

Mediante un análisis comparativo de los genomas de *B. subtilis* y *B. thuringiensis* en busca de secuencias similares a las de las Rap fosfatas y péptidos Phr, se encontró que en *B. thuringiensis* existe un gen cuya proteína presenta una cierta similitud con las Rap fosfatasas de *B. subtilis* y además presenta una secuencia *phr* putativa inmediatamente corriente abajo (Fig. 5). La similitud de esta proteína con las Rap fosfatasas de *B. subtilis* está en la secuencia de aproximadamente 360 aminoácidos del extremo carboxilo terminal. Aunque dicha similitud es débil, esta proteína parece tener múltiples motivos TPR (dominios que participan en interacciones proteína-proteína) al igual que las Rap fosfatasas de *B. subtilis*.

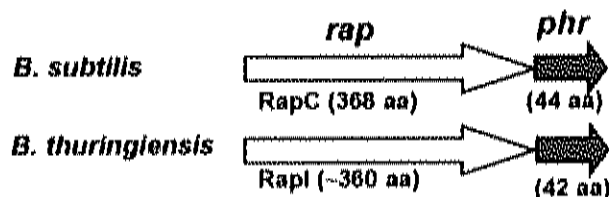


Figura 5. Similitud de los cassetes *rap-phr* de *B. thuringiensis* y *B. subtilis*. Las flechas amarillas representan los genes de las Rap fosfatasas. Las flechas violeta representan los genes *phr* (se muestra el número de aminoácidos codificados por estos genes). (Pottathil y Lazazzera, 2003).

El péptido precursor putativo Phr identificado en *B. thuringiensis* también presenta una similitud con los péptidos precursores Phr de *B. subtilis* (Fig. 6). Este precursor al parecer también tiene una secuencia señal para exportación, un carboxilo terminal polar y podría ser procesado a un pentapéptido que tendría la función de una molécula señal con un aminoácido básico en la segunda posición, que es una característica común de los péptidos señal de la familia Phr (Pottathil y Lazazzera, 2003).



Figura 6. Alineación del gen *phr* putativo de *B. thuringiensis* con el gen *phr* de *B. subtilis*. Región N Terminal (N), región hidrofóbica (H), tres aminoácidos putativos antes del sitio de corte (C).

4. JUSTIFICACIÓN

Es importante investigar la comunicación célula-célula en *B. thuringiensis* para ampliar el conocimiento sobre la comunicación en bacterias gram positivas y a largo plazo utilizar este conocimiento para mejorar el proceso de producción de las toxinas con actividad insecticida.

5. HIPÓTESIS

En *B. thuringiensis* la regulación de la esporulación y por ende la expresión de *cry1Aa* involucra péptidos señal.

6. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Investigar si en *B. thuringiensis* la regulación de la esporulación y la expresión de *cry1Aa* involucran péptidos señal.

6.2 Objetivos Específicos

1. Evaluar el efecto en la cinética de crecimiento y en la eficiencia de esporulación de *B. subtilis* y de *B. thuringiensis* del factor de competencia y esporulación CSF (ERGMT) de *B. subtilis* y del péptido señal putativo NprRB (SKPDT) de *B. thuringiensis*.
2. Evaluar el efecto en la expresión de *cry1Aa* en *B. thuringiensis* de los dos péptidos anteriores.
3. Aislar péptidos de 5 a 10 a.a. del sobrenadante del medio de cultivo de *B. thuringiensis* que se secreten o se incrementen en la etapa de transición (5 horas).

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Microorganismos

Se utilizaron las cepas de *B. thuringiensis* BtpHTcry1A2 (López-y-López y de la Torre, 2005) y de *B. subtilis* PY79 (pMLK83-2B) (GOB18), del cepario del Lab. Biol. Mol. de Bacterias de CINVESTAV-IPN Unidad Irapuato. *B. thuringiensis* BtpHTcry1A2 contiene una fusión del promotor de *cry1Aa* con *lacZ*, fue derivada de una cepa Cry(-)B (Stahly *et al.*, 1978) y contiene el plásmido pHTcry1A2 (Bravo *et al.*, 1996), que a su vez contiene un fragmento de 362 pb corriente arriba del promotor *cry1Aa* fusionado a *lacZ*. Para su conservación se prepararon discos de papel filtro con una concentración de 2.83×10^8 esporas por disco que se mantuvieron a $4\text{ }^\circ\text{C} \pm 1$. Estas esporas provinieron del crecimiento de la cepa en cajas Petri con agar nutritivo (Difco) incubadas por 48 horas a 37°C .

7.2. Medios de Cultivo

Medio harina de soya diluido. Su composición fue la siguiente: $2.35\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de glucosa, $1.375\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ de harina de soya, $0.3\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ extracto de levadura, $0.45\text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ sólidos de cocimiento de maíz, $150\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl, $10\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $2\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ MnSO_4 , $1.5\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ CoCl_2 , $0.375\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $0.25\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0.1\text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ FeSO_4 , $0.35\text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ H_3PO_4 85% (w/v) y $0.15\text{ ml}\cdot\text{l}^{-1}$ de antiespumante Mazu DF. (López-y-López y de la Torre, 2005).

Medio Luria-Bertani (LB). Su composición fue la siguiente: 10 g·l⁻¹ de peptona de caseína, 5 g·l⁻¹ de extracto de levadura y 10 g·l⁻¹ de NaCl.

7.3. Aislamiento de los Péptidos

Para obtener los sobrenadantes de diferentes fases de crecimiento de *B. thuringiensis* BtpHTcry1A2, se hicieron fermentaciones en lote en un fermentador Chemap A.G. de 30L usando el medio de harina de soya diluido y las condiciones de operación descritas por López-y-López y de la Torre, (2005). Se colectaron muestras de 500 ml a las 3 horas (crecimiento exponencial temprano), 5 horas (fase de transición) y durante el inicio de la esporulación (7 a 10 horas).

7.3.1. Preparación de las Muestras

Las células se removieron de las muestras por centrifugación a 10 000 rpm durante 10 min (centrifuga Eppendorf 5804R), posteriormente los sobrenadantes se filtraron a través de una membrana de nitrato de celulosa de 0.45 µm y se liofilizaron. Los sobrenadantes liofilizados se resuspendieron en un volumen de 10 ml y fueron ultrafiltrados en una celda Amicon a través de una membrana YM 3000. El filtrado que contenía moléculas de tamaño menor de 3000 Da se ajustó a una densidad óptica de 5 utilizando una longitud de onda de 215 nm y se aplicó en una columna preparativa SEP-PAK C-18 para desalarla. Una vez desalada se filtró a través de una membrana de 0.4 µm para su posterior análisis.

7.3.2. Análisis Mediante HPLC-MS

Para llevar a cabo la identificación de los péptidos, las muestras se analizaron con un equipo de HPLC acoplado a masas (HPLC/MS Agilent serie 1100 LC/MSD modelo Trap VL con un rango de masas de 50-2200 m/z). Se aplicó un volumen de muestra de 100 μ l a una columna de fase reversa (ZORBAX SB-300 C-18, 3.5 μ m, 4.6 x 150mm). Como fase móvil se utilizó ácido fórmico 0.5%/agua y ácido fórmico 0.5%/metanol, con un gradiente de 25-100% de metanol en un periodo de 56 minutos, a una velocidad de flujo de 0.25 ml/min. Este flujo bajo permitió prolongar el tiempo para el análisis de las diferentes fracciones en el equipo de masas acoplado. Se analizaron y se compararon los cromatogramas de los sobrenadantes de las distintas fases de crecimiento y se seleccionaron aquellos picos que se encontraban exclusivamente en la etapa de transición (5 horas). También se analizaron los espectros de masas (MS) de los picos seleccionados anteriormente y se eligieron aquellas fracciones que contenían péptidos con un rango de masas de entre 400 y 1500 m/z y que además presentaron cargas múltiples.

7.4. Ensayos de Actividad Biológica

Para evaluar la actividad biológica de los péptidos CSF (ERGMT) y NprRB (SKPDT) se prepararon matraces con 50 ml de medio de harina de soya diluido. A cada matraz se le añadió un disco con esporas de *B. thuringiensis* o *B. subtilis* con la concentración indicada. Posteriormente se incubaron a 30° C en una agitadora-incubadora (Environ-Shaker, Lab-Line) a 200 rpm. Cuando los cultivos alcanzaron la etapa de transición (5 horas) se adicionó alguno de los

péptidos a una concentración de 100 nM. En todos los matraces se siguieron las cinéticas de crecimiento, de expresión del gen *cry1Aa* y de esporulación.

7.5. Ensayo de β -galactosidasa

La actividad de β -galactosidasa se determinó según lo descrito por Sambrook *et al.* (1989). Las lecturas de absorbancia se realizaron en placas de ELISA conteniendo un volumen de 300 μ l por pozo y a una longitud de onda de 415 nm. La actividad se reportó en unidades Miller (UM). Una unidad Miller es definida como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μ mol de *orto*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) por min.

7.6. Cuenta de Células y Esporas

Las cuentas de células y esporas se determinaron microscópicamente en una cámara de Neubauer por cuadruplicado. En algunos experimentos se determinó también la cuenta viable de esporas de la siguiente manera: Las muestras fueron diluidas serialmente con agua destilada estéril y el número de esporas se midió como las unidades formadoras de colonias resistentes al calor (80° C por 20 min) en placas con agar LB. Las células viables se midieron como el total de unidades formadoras de colonias en placas con agar LB. El % de esporulación= [(esporas/ml)/(células/ml)] x 100%.

La eficiencia de esporulación se determinó de la siguiente manera:

$$\text{Eficiencia de esporulación} = \frac{\text{Bacilos esporulados} + \text{esporas}}{\text{Cuenta máxima de bacilos}}$$

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Efecto de los Péptidos CSF de *Bacillus subtilis* y NprRB de *Bacillus thuringiensis* en Ambas Bacterias

Con el propósito de utilizar como control el efecto del péptido CSF sobre *B. subtilis*, se evaluó su actividad biológica sobre las cinéticas de crecimiento y aparición de esporas maduras de este microorganismo. Los resultados muestran que en *B. subtilis* el péptido CSF no tuvo efecto en el crecimiento (Fig. 7A), pero la concentración de bacilos esporulados por mililitro se incremento 1.94 veces con respecto al control sin la adición del péptido (Fig. 7B). Las veces en incremento se determinaron en base a las eficiencias de esporulación. Veces en incremento = (eficiencia de esporulación con péptido)/(eficiencia de esporulación del control).

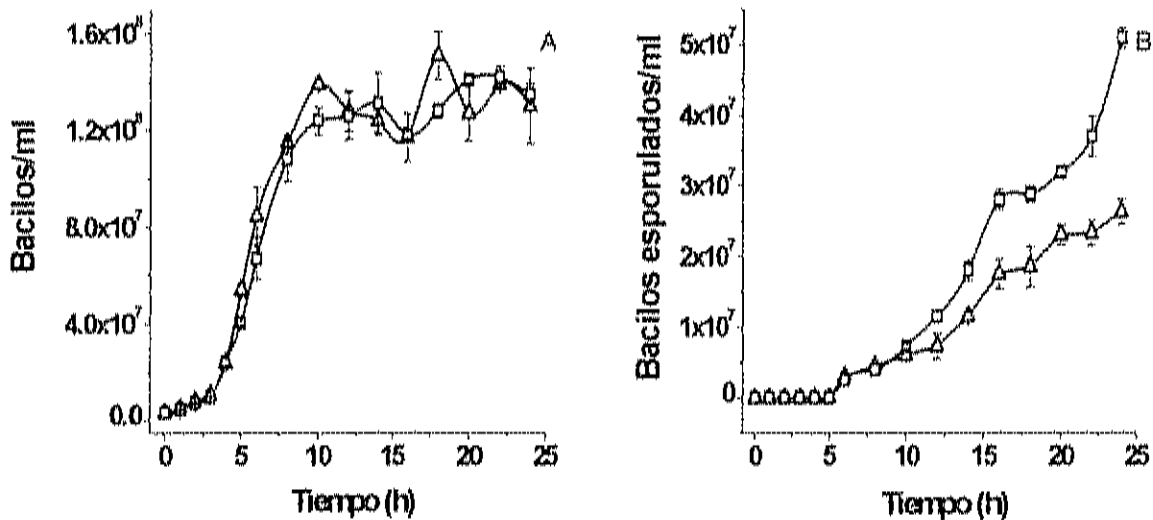


Figura 7. Cinéticas de crecimiento de *B. subtilis* (CSF). (Δ) Sin péptido (control) (□) Con péptido CSF 100 nM. A) Bacilos/ml, B) Bacilos esporulados/ml.

Solomon *et al.* (1996) encontraron un incremento en la esporulación 14 veces mayor que el de este estudio utilizando la misma concentración de CSF. Esto puede deberse a que utilizaron decoyina para establecer la condición de privación de nutrientes a una baja densidad celular, ya que decoyina es inhibidor de la GMP sintetasa involucrada indirectamente en la represión de la esporulación. En nuestro estudio la privación se presentó de forma natural debido al consumo de todos los nutrientes por parte de la bacteria. Sin embargo, Solomon *et al.* (1996) al determinar esporulación por cuenta viable, presenta el inconveniente de no distinguir entre esporas maduras refringentes en el bacilo y esporas liberadas, lo cual si es posible realizar en las cinéticas de crecimiento.

En el caso de *B. thuringiensis*, el péptido CSF, no tuvo efecto sobre el crecimiento, ni sobre la esporulación (Fig. 8A, 8B), pero si sobre la liberación de las esporas, ya que esta se incremento 2.18 veces con respecto al control al que no se le adicionó el péptido (Fig. 8C). El péptido también estimuló la expresión de *cry1Aa* fundamentalmente a partir del promotor tardío BtII, ya que la actividad de β -galactosidasa aumentó 1.51 veces con respecto al control (Fig. 8D) y este aumento se dió 11 horas después de que se inició la esporulación.

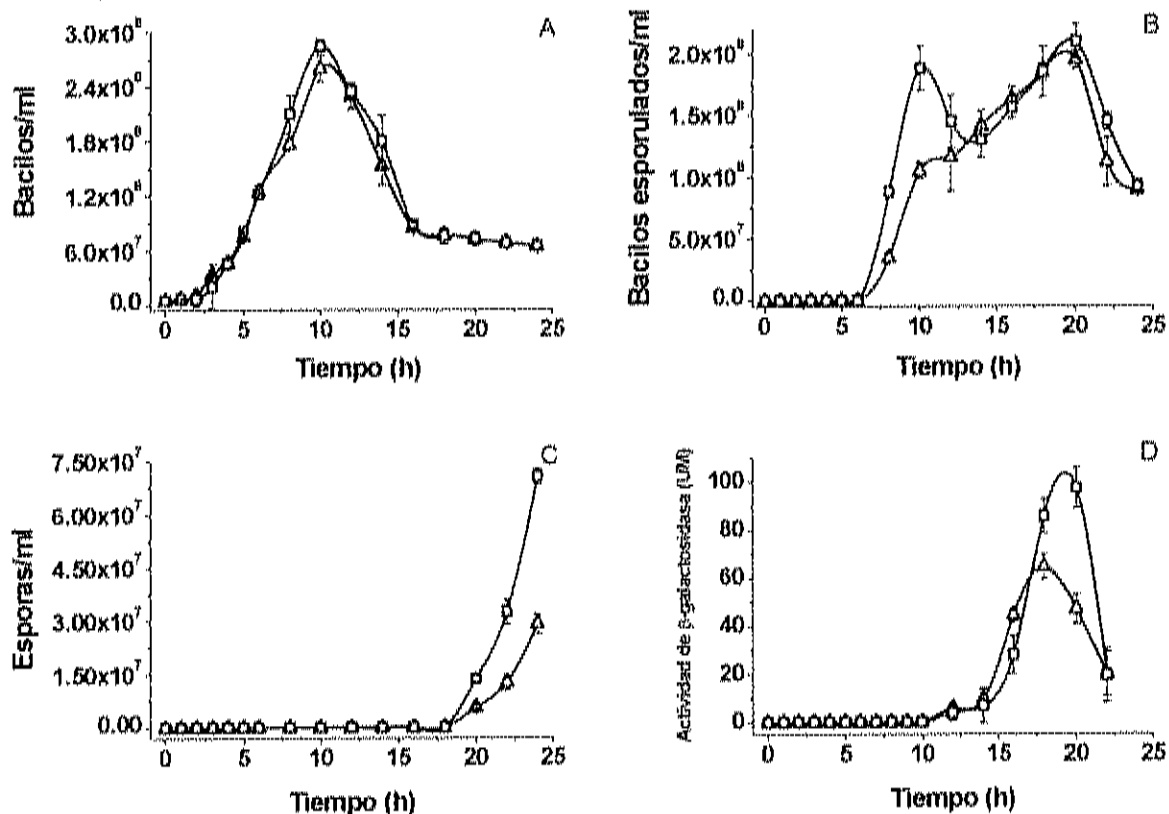


Figura 8. Cinéticas de crecimiento y actividad de β -galactosidasa de *B. thuringiensis* (CSF). (Δ) Sin péptido (control), (\square) Con péptido CSF 100 nM. A) Bacilos/ml, B) Bacilos esporulados/ml, C) Esporas/ml, D) Actividad de β -galactosidasa.

El hecho de que el péptido CSF haya incrementado la esporulación en *B. subtilis* y no en *B. thuringiensis* es debido a la gran especificidad que el péptido CSF presenta hacia su fosfatasa (RapC fosfatasa) que se encuentra únicamente en *B. subtilis*. Sin embargo, en *B. thuringiensis* CSF incrementó la liberación de esporas y la actividad de β -galactosidasa. Este fenómeno probablemente se debe a que el péptido CSF presenta similitud en tamaño y secuencia a algún péptido señal de *B. thuringiensis*, permitiendo su reconocimiento por parte de alguna fosfatasa en la bacteria. Este resultado era

de esperarse debido a que existe una cercanía filogenética entre ambas bacterias aunque la interacción podría tener baja especificidad explicando el ligero aumento en liberación de esporas y actividad de β -galactosidasa.

El péptido CSF logró retrasar dos horas la actividad de β -galactosidasa en *B. thuringiensis*, ya que el máximo de actividad se alcanzó a las 20 horas y en el control se alcanzó a las 18 horas (Fig. 8D). El retraso de actividad en β -galactosidasa está ligada a un retraso en la expresión del gen *cry* ya que su promotor está fusionado al promotor *cry1Aa* y sugiere un retraso en el inicio de la esporulación. Este retraso fue reportado por López-y-López y de la Torre, (2005) pero la diferencia radica en que ellos añadieron el sobrenadante de un cultivo en fase de transición (5 horas) en lugar del péptido. Ellos encontraron un retraso en la esporulación de 6 horas y en este estudio fue de 2 horas, ello puede deberse a que el péptido CSF no es específico para *B. thuringiensis*, en cambio en el sobrenadante añadido se encontraban los péptidos específicos para esta bacteria.

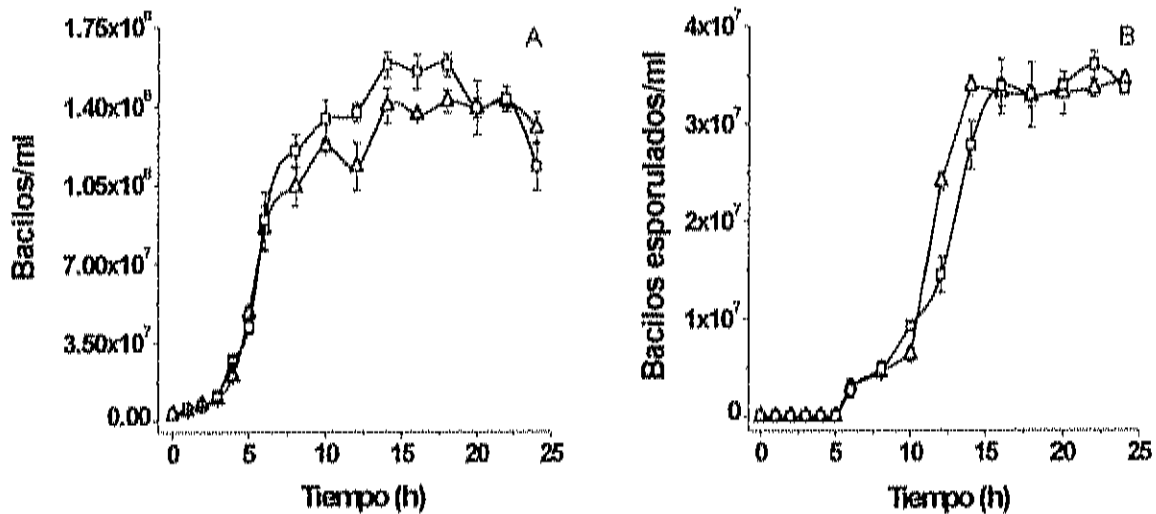


Figura 9. Cinéticas de crecimiento de *B. subtilis* (NprRB). (Δ) Sin péptido (control), (\square) Con péptido NprRB 100 nM. A) Bacilos/ml, B) Bacilos esporulados/ml.

Por otra parte, en *B. subtilis*, NprRB no tuvo efecto en el crecimiento ni en la esporulación (Fig. 9A, 9B), tampoco tuvo efecto en el crecimiento de *B. thuringiensis* (Fig. 10A) pero si en su esporulación (Fig. 10B, 10C). La concentración de bacilos esporulados por mililitro en *B. thuringiensis* se incrementó 1.72 veces con respecto al control (Fig. 10B). También propició la liberación de las esporas, ya que hubo un incremento de 3.42 veces en las esporas libres con respecto al control (Fig. 10C) y además estimuló la expresión de *cry1Aa* a partir del promotor tardío BtlI del gen *cry1Aa* 3.6 veces con respecto al control (Fig. 10D), este aumento se dio 12 horas después de que se inició la esporulación.

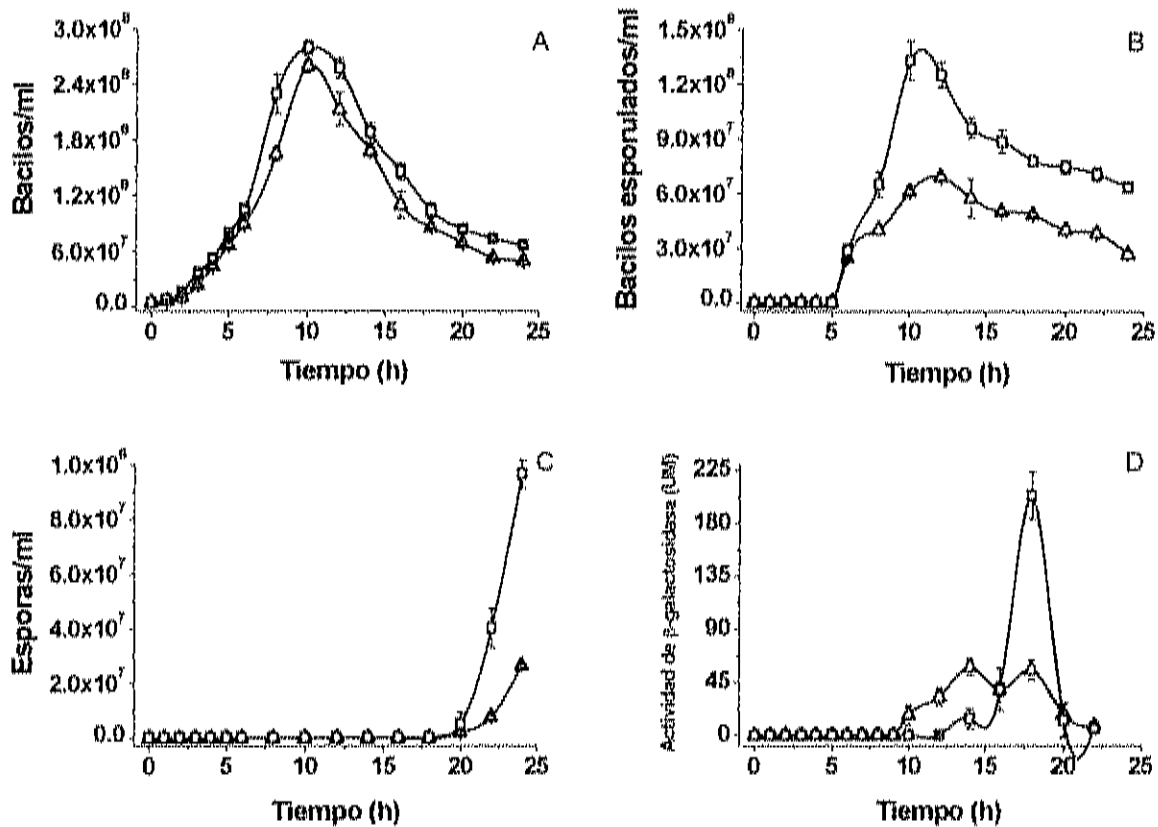


Figura 10. Cinéticas de crecimiento y actividad de β -galactosidasa de *B. thuringiensis* (NprRB). (Δ) Sin péptido (control), (\square) Con péptido NprRB 100 nM. A) Bacilos/ml, B) Bacilos esporulados/ml, C) Esporas/ml, D) Actividad de β -galactosidasa.

El péptido putativo NprRB no tuvo efecto en la esporulación de *B. subtilis* pero si incrementó la esporulación en *B. thuringiensis*, debido probablemente a que el péptido NprRB no presenta especificidad hacia las Rap fosfatasa de *B. subtilis*, en cambio en *B. thuringiensis* el péptido podría estar siendo reconocido por su fosfatasa específica. Pottathil y Lazazzera, (2003) identificaron a este péptido por un análisis comparativo de secuencias del genoma de *B. thuringiensis* que pudieran codificar para las fosfatasa y que tuvieran corriente abajo, una secuencia que pudiera ser la de un péptido que en su extremo

carboxilo terminal codificara para un péptido señal putativo similar a los de la familia Phr, es decir, existe un cassette NprRB-RapI; sin embargo, la actividad de este péptido no había sido demostrada *in vivo* sobre *B. thuringiensis* hasta la fecha.

El péptido NprRB logró retrasar la aparición de la actividad de β -galactosidasa en *B. thuringiensis* cuatro horas con respecto al control, lo cual se traduce en un retraso en la expresión del gen *cry1Aa*. Esto es, en el control se inicia la actividad de β -galactosidasa a la hora 10 mientras que con el péptido se inicia a la hora 14. Estos resultados sugieren de nuevo que los péptidos señal pudieran regular temporalmente el establecimiento de la esporulación, además de estimularla como fue sugerido por López-y-López y de la Torre, (2005) pero, debido a que ellos añadieron el sobrenadante de un cultivo en fase de transición (5 horas) en lugar del péptido, el retraso de la esporulación de 6 horas que ellos encontraron probablemente se deba a la acción conjunta de varios péptidos señal del sobrenadante y no por un solo péptido como en este estudio.

Para explicar este fenómeno se puede plantear la siguiente hipótesis: los péptidos CSF y NprRB al internalizarse en la célula inhibirán a las Rap fosfatasas las cuales son uno de los factores involucrados en mantener el proceso de esporulación latente. Consecuentemente, los niveles de Spo0A~P aumentarán activando los operones involucrados en el proceso de esporulación (Fig. 11).

En las cinéticas de *B. thuringiensis* en las que se añadieron los péptidos CSF y particularmente NprRB a una alta concentración (100 nM), probablemente las Rap fosfatasas estén siendo inhibidas fuertemente, provocando el aumento de los niveles de Spo0A~P y a su vez el incremento en

la expresión de los operones *spoIIG*, *spoIIE* y *spoIIA* necesarios para la adecuada septación de la célula y los pasos finales de la esporulación.

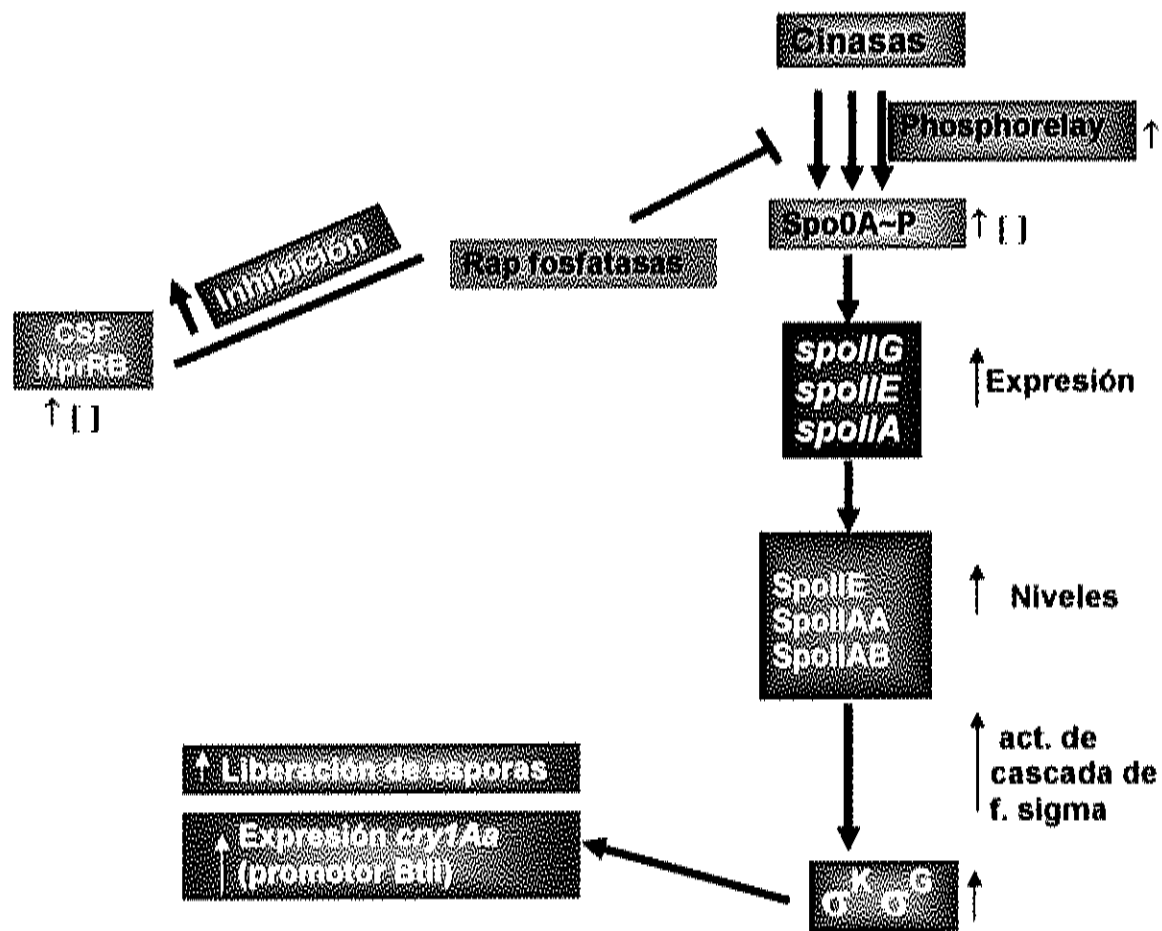


Figura 11. "Modelo del mecanismo propuesto para el sistema de regulación de la esporulación mediado por péptidos señal". (Aceves, 2005, este estudio).

Dentro de los productos codificados por estos operones están, el factor σ^F que es el iniciador de la cascada de factores sigma de esporulación y es codificado por el gen *spollAC*, la SpoIIIE fosfatasa (Fig. 4) que es el producto del gen *spollE*, y SpoIIAA y SpoIIAB involucrados en la activación del factor σ^F los cuales son producto del operon *spollA*.

Durante la etapa II de esporulación se finaliza la formación del septo y es en este momento cuando el factor σ^F se activa únicamente en el compartimiento de la prespora. Esta activación se da cuando el factor σ^F se libera de la proteína SpoIIAB, que posteriormente forma un complejo con SpoIIAA evitando que el factor σ^F vuelva a su estado inactivo (Phillips y Strauch, 2002).

Al aumentar los niveles del factor σ^F en el compartimiento de la prespora debido a los péptidos CSF y NprRB, probablemente se incrementan los niveles de σ^K y σ^G . El papel de σ^K es iniciar la transcripción de genes involucrados en el proceso de lisis celular (Nugroho *et al.*, 1999) y eso explicaría el incremento en esporas libres observado en *B. thuringiensis* (Fig. 11). Además el factor σ^K también está involucrado en la expresión del promotor tardío BtII del gen *cry* (Baum y Malvar, 1995), por lo tanto al haber mayores niveles del factor σ^K , posiblemente existió mayor expresión de este promotor (Fig. 11). Por otro lado σ^G se encarga de iniciar la transcripción de genes que codifican para proteínas que le confieren a la espora la capacidad de resistencia a situaciones de estrés como calor (Setlow y Setlow, 1995; Bagyan *et al.*, 1998), luz ultravioleta (Mason y Setlow, 1986; Bagyan *et al.*, 1998) y estrés oxidativo (Setlow, 1995; Bagyan *et al.*, 1998), así como también aquellos genes involucrados en la germinación de la espora (Feavers *et al.*, 1990; Kemp *et al.*, 1991), sin embargo, estos parámetros no fueron evaluados, por lo cual no fue posible observar un efecto de los péptidos sobre el factor σ^G .

8.2. Identificación de Péptidos

En las figuras 12 y 13, se presenta una comparación de los cromatogramas del sobrenadante en fase de transición (5 horas) con el del medio de cultivo y de la fase exponencial (3 horas). Se señalan con un asterisco aquellos picos que se encuentran exclusivamente en el sobrenadante de la fase de transición (5 horas) y no en los otros sobrenadantes. Al inicio de la corrida de los 0 a 10 minutos se observa una variación en el perfil de separación siendo esta región donde se encuentran los compuestos más polares y por lo tanto los posibles péptidos de interés. Entre los 10 y 30 minutos los cromatogramas muestran un patrón de separación muy similar y después de los 30 minutos la diferencia es pequeña.

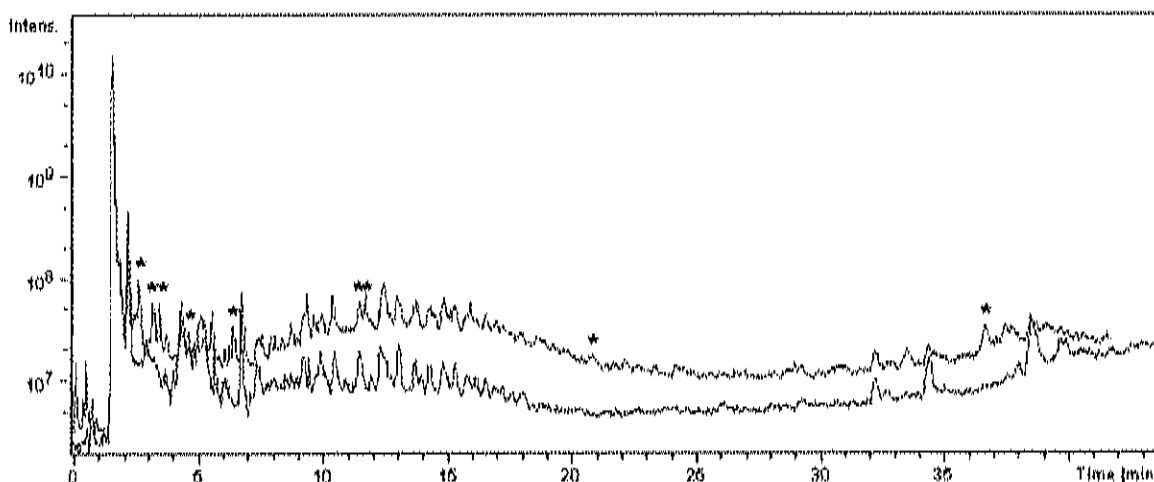


Figura 12. Cromatogramas de fase de transición y medio de cultivo de *B. thuringiensis*. Comparación de los cromatogramas de los sobrenadantes de la fase de transición (5 horas), azul y del medio de cultivo, rojo.

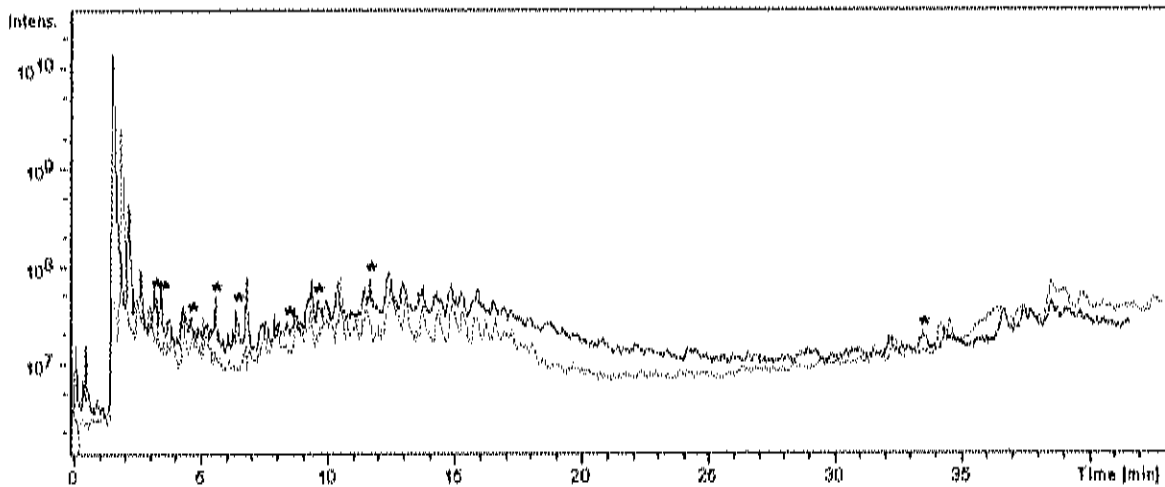


Figura 13. Cromatogramas de fase de transición y fase exponencial de *B. thuringiensis*. Comparación de los cromatogramas de los sobrenadantes de la fase de transición (5 horas), azul y de la fase exponencial (3 horas), verde.

A partir de los cromatogramas se seleccionaron los picos que se encontraban exclusivamente en el sobrenadante de la fase de transición (indicados con asteriscos), posteriormente se evaluaron por MS encontrándose un total de 47 péptidos (Fig. 14). Se seleccionaron aquellas moléculas que presentaron cargas múltiples y un rango de masa de 400-1500 m/z (4 y 10 aminoácidos) ya que los péptidos señal en *B. subtilis* y el péptido señal de *B. thuringiensis* involucrado en el mecanismo de regulación de la expresión de los factores de virulencia se caracterizan por presentar este rango de masas (Solomon *et al.*, 1996, Slamti y Lereclus, 2002). Entre los 47 péptidos encontrados, seis tienen una masa muy semejante a la de los péptidos señal de *B. subtilis* (Tabla 2) y al pentapéptido PapR de *B. thuringiensis*, el cual actúa como un efector de *quórum sensing*, interaccionando con la proteína reguladora PlcR, facilitando su unión al ADN de sus genes blanco (Slamti y Lereclus, 2002).

Sin embargo como no ha sido posible obtener el patrón adecuado de fragmentación de los péptidos estándar con que se cuenta (Oxitocina, Neurotensina, Angiotensina, Bradikinina), no se pudo determinar la secuencia de estos péptidos para saber cuales presentan un aminoácido básico en la segunda posición y así poder identificar aquellos que podrían pertenecer a la familia de los Phr. Por lo que para estudios posteriores será necesario determinar cuales de las fracciones que contienen estos péptidos tienen un efecto regulatorio en la esporulación y después purificar los péptidos y secuenciarlos.

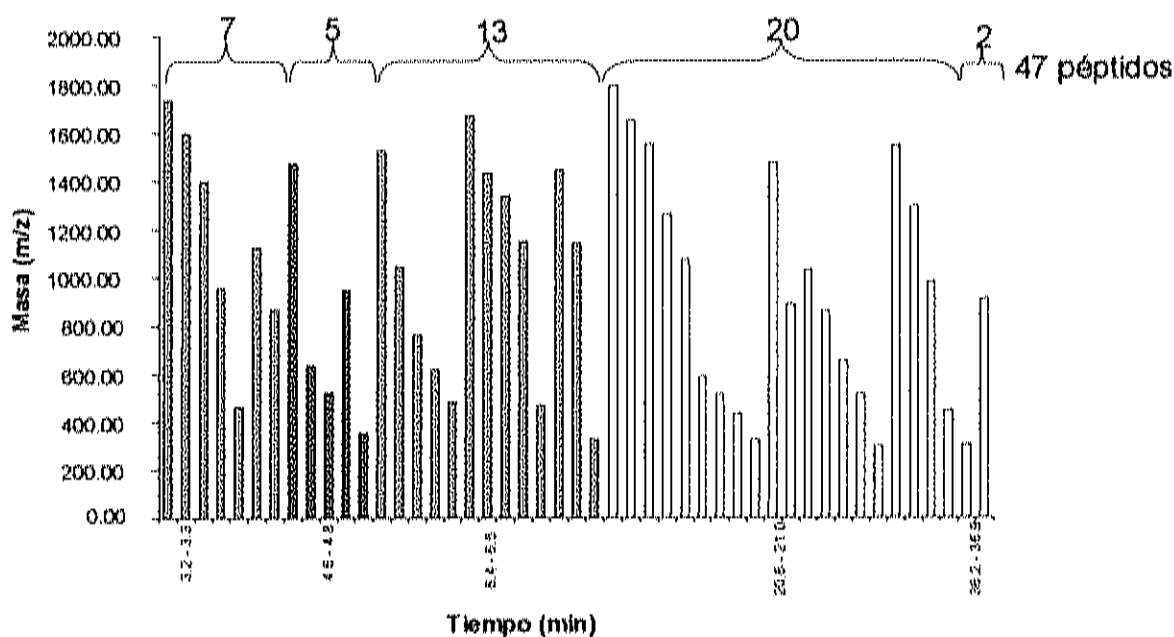


Figura 14. Fracciones obtenidas mediante HPLC-MS que se encuentran exclusivamente en el sobrenadante de la fase de transición.

Tabla 2. Comparación de Masas entre péptidos señal de *B. subtilis* y probables péptidos señal de *B. thuringiensis* identificados por HPLC-MS.

Péptidos señal <i>B. subtilis</i>		Péptidos identificados de <i>B. thuringiensis</i>	
Nombre	Masa (Da)	Nombre	Masa (m/z)
CSF	593	A	590
PhrA	589	A	590
PhrE	576	A	590
PhrF	604	B	634
		C	616
PhrG	577	A	590
PhrI	517	A	515
		B	520
ComX	1158	C	1141

A = Fracción 4 (20.6-21.0 min)

B = Fracción 2 (4.6-4.8 min)

C = Fracción 3 (6.4-6.5 min)

9. CONCLUSIONES

B. thuringiensis responde a altas concentraciones del péptido señal CSF de *B. subtilis* y al péptido putativo NprRB de *B. thuringiensis* incrementando la expresión de *cry1Aa* y la liberación de esporas, así como también afectando el tiempo en el que se inicia la esporulación. Además, la respuesta de *B. thuringiensis* a NprRB es mayor con respecto a CSF, ello podría deberse a que CSF es un péptido señal de una especie diferente a la de *B. thuringiensis* en cambio NprRB es propio de esta bacteria, por lo tanto NprRB es reconocido con alta afinidad por la fosfatasa putativa con la que es probablemente cotranscrito.

Por otro lado, es probable que existan mas péptidos señal involucrados en el mecanismo de comunicación célula-célula, particularmente en la regulación de la esporulación de *B. thuringiensis* ya que mediante HPLC-MS fueron identificadas 47 moléculas de naturaleza peptídica de las cuales 6 presentan una masa muy semejante a los péptidos señal de *B. subtilis* y al péptido señal de *B. thuringiensis* involucrado en el mecanismo de regulación de la expresión de los factores de virulencia.

NprRB es un péptido señal de *B. thuringiensis* que regula la esporulación, tanto los niveles como el tiempo en el que se inicia. Además, estimula la expresión de *cry1Aa* a partir del promotor tardío. Este péptido es específico para *B. thuringiensis*. CSF tiene probablemente alguna función relacionada con la regulación de los genes involucrados en la esporulación tardía, probablemente con la regulación de los factores σ^G y σ^K .

Por lo tanto en *B. thuringiensis* la regulación de la esporulación y por ende la expresión de *cry1Aa* involucra péptidos señal.

10. PERSPECTIVAS

Investigar en *Bacillus thuringiensis* el efecto a nivel molecular de los péptidos señal en la expresión de genes que codifican para los factores σ de esporulación, mediante la cuantificación de ARN mensajero o por fusión de sus promotores con genes reporteros. También, investigar la expresión de los genes afectados por estos péptidos mediante microarreglos.

Por otro lado, se tiene que continuar con el proceso de aislamiento, caracterización e identificación de los péptidos que se encuentren en el sobrenadante de la fase de transición de *Bacillus thuringiensis* y que actúen como señales de comunicación célula a célula, regulando la esporulación y por ende la expresión del gen *cry*.

Finalmente, a largo plazo el conocimiento adquirido en éste y subsecuentes trabajos, nos permitirá establecer estrategias basadas en la regulación del proceso de esporulación y de la expresión de los genes *cry* de *Bacillus thuringiensis*, para mejorar los rendimientos de las proteínas con actividad insecticida a escalas piloto e industrial.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Adams LF, Brown KL, Whiteley HR. 1991. Molecular cloning and characterization of two genes encoding sigma factors that direct transcription from a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene promoter. *J. Bacteriol.* 173: 3846-3854
- Arcas J, Yantorno O, Ertola R. 1987. Effect of high concentrations of nutrients on *Bacillus thuringiensis* culture. *Biotechnol. Lett.* 2: 105-110
- Aronson A. 2002. Sporulation and δ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 417-425
- Avignone-Rossa C, Mignone C. 1993. Delta-endotoxin activity and spore production in batch and fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Lett.* 15: 295-300
- Bagyan I, Setlow B, Setlow P. 1998. New Small, acid-soluble proteins unique to spores of *Bacillus subtilis*: Identification of the coding genes and regulation and function of two of these genes. *J. Bacteriol.* 180: 6704-6712
- Bassler BL. 2002. Small Talk: Cell-to-cell communication in bacteria. *Cell.* 109: 421-424
- Baum J, Malvar T. 1995. Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 18: 1-12
- Burbulys D, Trach KA, Hoch JA. 1991. Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell.* 64: 545-552
- Bravo A, Salamitou S, Agaisse H, Lereclus D. 1996. Analysis of *cry1Aa* expressions in sigE and sigK mutants of *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Gen. Genet.* 250: 734-741
- Dubnau D. 1991. Genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Rev.* 55: 395-424
- Duncan L, Losick R. 1993. SpoIIAB is an anti-sigma factor that binds to and inhibits transcription by regulatory protein sigma F from *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2325-2329

- Dunny GM, Leonard BAB. 1997. Cell-Cell Communication in gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 527-564
- Feavers IM, Foulkes J, Setlow B, Sun D, Nicholson W, Setlow P, Moir A. 1990. The regulation of transcription of the *gerA* spore germination operon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 4: 275-282.
- Fujita M, Losick R. 2003. The master regulator for entry into sporulation in *Bacillus subtilis* becomes a cell-specific transcription factor after asymmetric division. *Genes & Dev.* 17:1166-1174
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP. 1994. Quorum sensing in bacteria: The LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* 176: 269-275
- Grossman A, Losick R. 1988. Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4369-4373
- Havarstein L, Coomaraswamy G, Morrison D. 1995. An unmodified heptadecapeptide pheromone induces competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 11140-11144
- Hofmeister A, Londono-Vallejo A, Harry E, Stragier P, Losick R. 1995. Extracellular signal protein triggering the proteolytic activation of a developmental transcription factor in *Bacillus subtilis*. *Cell.* 83: 219-226
- Ireton K, Grossman A. 1992. Coupling between gene expression and DNA synthesis early during development in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 8808-8812
- Ireton K, Rudner DZ, Siranosian KJ, Grossman AD. 1993. Integration of multiple developmental signals in *Bacillus subtilis* through the Spo0A transcription factor. *Genes & Dev.* 7:283-294
- Jiang M, Grau R., Perego M. 2000a. Differential processing of propeptide inhibitors of Rap phosphatases in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 182: 303-310
- Jiang M, Shao W., Perego M, Hoch J.A. 2000b. Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 38: 535-542

- Kang BC, Lee SY, Chang HN. 1992. Enhanced spore production of *Bacillus thuringiensis* by fed-batch culture. *Biotechnol. Lett.* 14: 721-726
- Kemp EH, Sammons RL, Moir A, Sun D, Setlow P. 1991. Analysis of transcriptional control of the *gerD* spore germination gene of *Bacillus subtilis* 168. *J. Bacteriol.* 173: 4646-4652.
- Lazazzera BA, Solomon JM, Grossman AD. 1997. An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *Bacillus subtilis*. *Cell.* 89: 917-925.
- Lazazzera BA, Kurtser IG, Mcquade RS, Grossman AD. 1999. An autoregulatory circuit affecting peptide signaling in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 181: 5193-5200
- Lazazzera BA. 2000. Quorum sensing and starvation: signals for entry into the stationary phase. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 177-182
- Lereclus D, Agaisse H, Gominet M, Chaufaux J. 1994. Overproduction of encapsulate insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis spo0A* mutant. *Bio/Technology.* 13: 67-71
- López-y-López EV, de la Torre M. 2005. Redirection of metabolism during nutrient feeding in fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 67: 254-260
- Magnuson R, Solomon JM, Grossman AD. 1994. Biochemical and genetic characterization of a competence pheromone from *B. subtilis*. *Cell.* 77: 207-216
- Mason JM, Setlow P. 1986. Essential role of small, acid-soluble spore proteins in resistance of *Bacillus subtilis* spores to UV light. *J. Bacteriol.* 167: 174-178
- Mcquade RS, Comella N, Grossman AD. 2001. Control of a family of phosphatase regulatory genes (*phr*) by the alternate sigma factor sigma-H of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 183: 4905-4909
- Nakano MM, Zuber P. 1991. The primary role of ComA in establishment of the competence state in *Bacillus subtilis* is to activate expression of *srfA*. *J. Bacteriol.* 173: 7269-7274

- Nugroho FA, Yamamoto H, Kobayashi Y, Sekiguchi J. 1999. Characterization of a new sigma-K-dependent peptidoglycan hydrolase gene that plays a role in *Bacillus subtilis* mother cell lysis. *J. Bacteriol.* 181: 6230-6237.
- Perego M, Higgins CF, Pearce SR, Gallagher MP, Hoch JA. 1991. The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. *Mol. Microbiol.* 5: 173-185
- Perego M, Hoch JA. 1996. Cell-cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 1549-1553
- Phillips ZEV, Strauch MA. 2002. *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* 59: 392-402
- Poncet S, Dervyn E, Klier A, Rapoport G. 1997. Spo0A represses transcription of the cry toxin genes in *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology.* 143: 2743-2751
- Pottathil M, Lazazzera B. 2003. The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*. *Front. Biosci.* 8: 32-45
- Rico E, Cutting S, Losick R. 1992. Characterization of bofA, a gene involved in intercompartmental regulation of pro- sigma K processing during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 174: 3172-3184
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. 1989. Molecular cloning a laboratory manual 2nd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory.* 16.66-16.67 pp.
- Sedlak M, Walter T, Aronson A. 1998. The function of overlapping promoters in the regulation of *Bacillus thuringiensis* protoxin genes. *J. Bacteriol.* 182: 734-743
- Setlow, P. 1995. Mechanisms for the prevention of damage to the DNA in spores of *Bacillus* species. *Annu. Rev. Microbiol.* 49:29-54
- Setlow B, Setlow P. 1995. Small, acid-soluble proteins bound to DNA protect *Bacillus subtilis* spores from killing by dry heat. *Appl Environ Microbiol.* 61: 2787-2790

- Slamti L, Lereclus D. 2002. A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *EMBO J.* 21: 4550-4559
- Solomon JM, Magnuson R, Srivastava A, Grossman AD. 1995. Convergent sensing pathways mediate response to two extracellular competence factors in *Bacillus subtilis*. *Genes & Dev.* 9: 547-558
- Solomon JM, Lazazzera BA, Grossman AD. 1996. Purification and characterization of an extracellular peptide factor that effects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes & Dev.* 10: 2014-2024
- Stahly CP, Dingman DW, Bulla LA Jr, Aronson A. 1978. Possible origin and function of the parasporal crystals in *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 58: 581-588
- Stephen CW, Bassler BL. 2002. Mob Psychology. *J. Bacteriol.* 184: 873-883
- Strauch M, Webb V, Spiegelman G, Hoch J. 1990. The Spo0A protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1801-1805
- Weir J, Predich M, Dubnau E, Nair G, Smith I. 1991. Regulation of spo0H, a gene coding for the *Bacillus subtilis* σ^H factor. *J. Bacteriol.* 173: 521-529
- Wu LJ, Errington J. 1994. *Bacillus subtilis* SpoIIIE protein required for DNA segregation during asymmetric cell division. *Sci.* 264: 572-575

12. ABREVIACIONES

CSF	Factor estimulante de competencia y esporulación (siglas en inglés)
RAP	Familia de las Aspartil Fosfato Fosfatasas
<i>rap</i>	Gen que codifica para las Aspartil Fosfato Fosfatasas
<i>phr</i>	Gen que codifica para péptidos de la familia Phr
Cry	Proteína cristalina con actividad bioinsecticida (abreviatura en Inglés)
<i>cry</i>	Gen que codifica para las proteínas Cry.
σ	Factor sigma de esporulación
GMP	Guanosín Monofosfato
ADN	Ácido Desoxiribonucleico
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Resolución (siglas en inglés)
MS	Espectrometría de Masa
rpm	Revoluciones por minuto
UM	Unidades Miller