

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN ALIMENTACIÓN Y
DESARROLLO, A. C.**

**EFFECTO DE LA EXPRESIÓN DE RapA-PhrA Y DEL PÉPTIDO
SEÑAL SINTÉTICO PhrA EN LA ESPORULACIÓN DE *Bacillus*
subtilis Y *Bacillus thuringiensis*.**

POR

VARINIA LÓPEZ RAMÍREZ

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE**

MAESTRÍA EN CIENCIAS

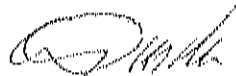
HERMOSILLO, SON.

DICIEMBRE, 2005.

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé 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. (CIAD).

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

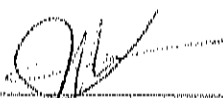


Dr. Alfonso Gardea Béjar

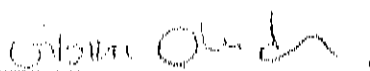
Director General

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de la Q. A. Varinia López Ramírez, la han encontrado satisfactorio y recomiendan sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



Dra. MAYRA DE LA TORRE MARTÍNEZ
Directora de Tesis



Dra. GABRIELA OLMEDO ÁLVAREZ
Asesor



Dra. MA. AUXILIADORA ISLAS OSUNA
Asesor



Dra. GLORIA YEPÍZ PLASCENCIA
Asesor

AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo económico proporcionado durante los estudios de Maestría.

Al personal académico y docente de CIAD por todos los conocimientos y experiencias recibidas.

A la Dra. Gabriela Olmedo y la Dra. Mayra de la Torre por haber creído en mí e impulsarme en todo momento.

A CINVESTAV-Irapuato en especial a todos los miembros del Lab. de Biología Molecular de Bacterias por todo lo que me enseñaron.

A mis padres, hermanos y mi sobrina.

A todos mis amigos tanto en CIAD como en CINVESTAV.

A Sara, Abraham, Xaviera, Rosy, Elsa y Jackeline por haber sido mi familia estos dos años.

Y en general, a todas las personas que me brindaron su amistad y apoyo incondicional en todo momento.

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ÍNDICE DE FIGURAS | iv |
| ÍNDICE DE TABLAS | vi |
| I. RESUMEN..... | 1 |
| II. INTRODUCCIÓN..... | 3 |
| III. MARCO TEÓRICO..... | 4 |
| 3.1 Comunicación célula-célula: <i>quorum sensing</i> | 4 |
| 3.2 Péptidos señal implicados en el proceso de competencia en <i>Bacillus subtilis</i> | 5 |
| 3.3 Péptidos señal implicados en el proceso de esporulación en <i>Bacillus subtilis</i> | 6 |
| 3.4 Regulación del inicio de esporulación en <i>Bacillus subtilis</i> | 9 |
| 3.5 Etapas en el proceso de esporulación en <i>Bacillus subtilis</i> | 11 |
| 3.6 Esporulación y señales de comunicación célula-célula en <i>Bacillus thuringiensis</i> | 12 |
| IV. HIPÓTESIS | 15 |
| V. OBJETIVO GENERAL | 15 |
| VI. OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 15 |
| VII. MATERIALES Y MÉTODOS | 16 |
| 7.1 Análisis filogenético de los genes de inicio de la esporulación de <i>B. subtilis</i> y <i>B. thuringiensis</i> | 16 |
| 7.2 Cepas bacterianas | 16 |
| 7.3 Medios de cultivo empleados | 17 |
| 7.4 Construcción de plásmidos | 18 |
| 7.5 Manipulación de DNA..... | 18 |
| 7.6 Transformación de <i>B. thuringiensis</i> (HD73) y <i>B. subtilis</i> (PY79: pMLK83-2B) | 20 |
| 7.7 Cinéticas de crecimiento y esporulación en <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus thuringiensis</i> | 21 |

| | | |
|--------------|---|----|
| 7.8 | Expresión de <i>gusA</i> en <i>Bacillus subtilis</i> | 23 |
| VIII. | RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 24 |
| 8.1 | Similitud filogenética entre <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus thuringiensis</i> | 24 |
| 8.2 | Respuesta de <i>Bacillus thuringiensis</i> a los inductores de esporulación de <i>Bacillus subtilis</i> | 27 |
| 8.3 | Amplificación de los genes <i>rapA</i> y el cassette <i>rapAphrA</i> | 27 |
| 8.4 | Construcción de los plásmidos pHT315ΩXyl-KpnI- <i>rapA</i> y pHT315ΩXyl-KpnI- <i>rapAphrA</i> | 30 |
| 8.5 | Transformación de <i>Bacillus thuringiensis</i> (HD73) y <i>Bacillus subtilis</i> (PY79) (pMLK83-2B)..... | 32 |
| 8.6 | Efecto de la expresión de <i>rapA</i> y <i>rapAphA</i> y del péptido sintético PhrA en la esporulación de <i>Bacillus subtilis</i> | 34 |
| | Efecto de xilosa y del PhrA sintético sobre el crecimiento y esporulación en <i>Bacillus subtilis</i> | 34 |
| 8.7 | Efecto de la expresión de <i>rapA</i> y <i>rapAphA</i> y del péptido sintético PhrA en la esporulación de <i>Bacillus thuringiensis</i> | 41 |
| | Efecto de las construcciones y del PhrA sintético sobre el crecimiento <i>Bacillus thuringiensis</i> | 41 |
| | Eficiencia de esporulación en <i>Bacillus thuringiensis</i> | 43 |
| IX. | CONCLUSIONES | 46 |
| X. | PERSPECTIVAS | 47 |
| XI. | REFERENCIAS | 48 |
| XII. | ANEXOS | 55 |
| | A) Programa y mezcla de reacción de PCR para la amplificación de los genes <i>rapA</i> y <i>rapAphrA</i> | 55 |
| | B) Mapa del vector pCRII [®] TOPO [®] (Invitrogen [®]) | 55 |
| | C) Subclonación en el vector pCRII [®] TOPO [®] (Invitrogen [®]) | 56 |

| | |
|--|----|
| D) Transformación de <i>E. coli</i> Top10 y <i>E. coli</i> NK5772..... | 56 |
| E) Purificación de plásmidos por el método de lisis alcalina..... | 56 |
| F) Secuencia de los plásmidos pHT315 Ω Xyl- <i>KpnI</i> - <i>rapA</i> , - <i>rapA</i> <i>phrA</i> . | 57 |
| G) Transformación de <i>Bacillus thuringiensis</i> por electroporación | 58 |
| H) Estructura del plásmido pMLK83-2B | 59 |
| I) Transformación de <i>Bacillus subtilis</i> | 59 |
| J) Ensayo de resistencia térmica | 60 |
| K) Ensayo de β -glucuronidasa para <i>Bacillus subtilis</i> | 61 |
| L) Medios de cultivo empleados | 62 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | | |
|-------------------|---|----|
| Figura 1. | Papel de los péptidos señal en el proceso de competencia en <i>Bacillus subtilis</i> | 6 |
| Figura 2. | Modelo del mecanismo de producción, transporte y respuesta de los péptidos Phr..... | 9 |
| Figura 3. | Control genético de la esporulación y producción de proteína Cry en <i>Bacillus thuringiensis</i> | 13 |
| Figura 4. | Efecto de sobrenadantes del medio de cultivo diluido en un cultivo por lote de <i>Bacillus thuringiensis</i> | 14 |
| Figura 5. | Mapa del plásmido pHT315ΩXyl..... | 18 |
| Figura 6. | Cinética de crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> | 22 |
| Figura 7. | Dendograma de alineamiento de secuencias de las proteínas Rap de <i>Bacillus subtilis</i> frente a las proteínas Rap de <i>Bacillus thuringiensis</i> | 25 |
| Figura 8. | Productos de PCR: <i>rapA</i> y <i>rapAphrA</i> | 29 |
| Figura 9. | Subclonación de los genes <i>rapA</i> y <i>rapAphrA</i> en el vector pCRIITOPPO® | 29 |
| Figura 10. | Digestión doble del vector pCRIITOPPO® recombinante..... | 30 |
| Figura 11. | Mapa del plásmido pHT315ΩXyl- <i>KpnI-rapA</i> | 31 |
| Figura 12. | Mapa del plásmido pHT315ΩXyl- <i>KpnI-rapAphrA</i> | 31 |
| Figura 13. | Comprobación de la clonación de los genes <i>rapA</i> y <i>rapAphrA</i> en los diferentes plásmidos | 33 |
| Figura 14 | Cinética de crecimiento y expresión de <i>cry1Aa</i> de <i>Bacillus subtilis</i> GOB141 (PY79 pMLK83-2B pHT315ΩXyl- <i>KpnI</i>) en medio de Schaeffer con o sin xilosa (20 μM) y con o sin el péptido sintético PhrA (100 nM) | 35 |
| Figura 15 | Cinética de crecimiento y expresión de <i>cry1Aa</i> de <i>Bacillus subtilis</i> GOB142 (PY79 pMLK83-2B pHT315ΩXyl- <i>KpnI-rapA</i>) | 36 |

| | | |
|-------------------|---|----|
| | en medio de Schaeffer con o sin xilosa (20 μ M) y con o sin péptido sintético PhrA (100 nM)..... | |
| Figura 16 | Cinética de crecimiento y expresión de <i>cry1Aa</i> de <i>Bacillus subtilis</i> GOB143 (PY79 pMLK83-2B pHT315 Ω Xyl-KpnI- <i>rapAphrA</i>) en medio de Schaeffer con o sin xilosa (20 μ M) | 37 |
| Figura 17. | Cinética de crecimiento GOB17 (PY79 pMLK83-2B) en medio Schaeffer (DSM) a diferentes condiciones | 38 |
| Figura 18 | Actividad β -glucuronidasa de la cepa GOB 17 (PY79 pMLK83-2B) | 39 |
| Figura 19 | Cinética de crecimiento de <i>Bacillus subtilis</i> en medio harina de soya diluido | 40 |
| Figura 20. | Cinética de crecimiento de de las cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> en medio TrisG con o sin xilosa (20 μ M) y con o sin péptido señal sintético PhrA (100 nM) | 42 |
| Figura 21. | Cinética de crecimiento de <i>Bacillus thuringiensis</i> en medio harina de soya diluido | 44 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Péptidos señal responsables del <i>quorum sensing</i> en <i>Bacillus subtilis</i> | 7 |
| Tabla 2. Genes involucrados en el inicio del proceso de esporulación en <i>Bacillus subtilis</i> | 10 |
| Tabla 3. Cepas utilizadas en este estudio | 17 |
| Tabla 4. Medios de cultivo empleados | 17 |
| Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos o iniciadores..... | 20 |
| Tabla 6. Análisis comparativo de las proteínas de inicio de esporulación entre <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus thuringiensis</i> | 26 |
| Tabla 7. Eficiencia de esporulación a las 17 horas de incubación en medio LB de <i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Bacillus subtilis</i> al adicionar inductores de esporulación al medio | 28 |
| Tabla 8. Eficiencia de transformación de <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Bacillus thuringiensis</i> | 32 |
| Tabla 9. Tamaños esperados al digerir los plásmidos con <i>EcoRI</i> | 33 |
| Tabla 10. Eficiencia de esporulación de <i>Bacillus subtilis</i> | 41 |
| Tabla 11. Eficiencia de esporulación de <i>Bacillus thuringiensis</i> | 45 |

I. RESUMEN

La comunicación célula-célula mediante el intercambio de péptidos señal coordina el inicio de la esporulación en *Bacillus subtilis*. Hasta el momento, se han identificado siete péptidos siendo, CSF, PhrA y PhrE los más estudiados. Estos ejercen un control negativo sobre las proteínas RapB, RapA y RapE, respectivamente y sus genes se encuentran organizados en pares, fosfatasa-péptido, cada uno con su promotor. Los péptidos son procesados hasta alcanzar su tamaño funcional de cinco aminoácidos.

El interés de este trabajo fue determinar si *B. subtilis* y *Bacillus thuringiensis* tenían un control similar en la regulación de la iniciación de la esporulación a nivel fisiológico y particularmente a nivel de la fosfatasa RapA y el péptido PhrA. El análisis de la conservación de los genes involucrados en la señalización del inicio de la esporulación entre *B. subtilis* y *B. thuringiensis*, reveló la presencia de todos los genes centrales en la transducción de señales que regulan el nivel de fosforilación de Spo0A, lo que sugiere que el péptido señal PhrA de *B. subtilis* podría tener un efecto en el inicio de la esporulación en *B. thuringiensis*. Sin embargo, se observaron diferencias fisiológicas importantes ya que inductores de esporulación en *B. subtilis*, como decoyina y ácido micofenólico no tuvieron efecto en *B. thuringiensis*.

En el caso de *B. subtilis*, se obtuvo algo inesperado, que fue la fuerte inhibición del crecimiento en la cepa que contiene al plásmido pHT315 Ω Xyl-Kpnl. Pudimos probar que el efecto dependía de xilosa pero no era causado por efecto del carbohidrato solamente, pues la cepa parental en ausencia del plásmido no muestra este comportamiento. La razón parece ser la expresión de la proteína XylA truncada. Curiosamente este efecto no se observó en *B.*

thuringiensis. La diferencia en el crecimiento entre las cepas de *B. subtilis* y *B. thuringiensis* que incluyan el plásmido pHT315 Ω Xyl-KpnI, pudiera deberse a varias causas, por ejemplo, un procesamiento diferencial de péptidos entre microorganismos.

Por otra parte, la expresión de RapA_{PhrA} en *B. thuringiensis* incrementó la eficiencia de esporulación. Este efecto no fue observado en *B. subtilis*, señalando el alto nivel de control en el inicio de la esporulación que no se modifica por el incremento de alguno de los elementos que participan en la coordinación del mismo. La adición de péptido señal sintético no incremento la eficiencia de esporulación en ambas especies. Las diferencias en respuesta observadas indican una regulación del inicio del proceso de esporulación diferente en ambas especies.

II. INTRODUCCIÓN

Las células bacterianas presentan una amplia variedad de mecanismos de adaptación fisiológica y morfológica en respuesta a cambios químicos y físicos en su ambiente. Estas respuestas no sólo involucran la producción de metabolitos sino también de señales químicas que les permiten monitorear su densidad celular (*quorum sensing*) y establecer la comunicación célula-célula. Muchas funciones bacterianas son reguladas mediante esta vía, incluyendo simbiosis, virulencia, producción de antibióticos, formación de biopelículas y esporulación (Taga y Blassler, 2003).

En *Bacillus subtilis* se ha descrito ampliamente el proceso de esporulación y en su inicio se han identificado señales químicas que participan en el establecimiento de esta etapa. Para *Bacillus thuringiensis*, el proceso de esporulación no se ha descrito a detalle pero por su cercanía filogenética a *B. subtilis*, se sugiere que la regulación del proceso de esporulación es coordinada de manera similar; de ahí el interés de estudiar si el péptido señal sintético de *B. subtilis* (PhrA) ejerce un efecto en el inicio del proceso de esporulación de *B. thuringiensis*, además de expresar los genes que codifican el péptido y su fosfatasa en *B. thuringiensis* para evaluar si el transporte y procesamiento se realizan de forma similar.

La estrategia experimental fue clonar los genes *rapA* y el cassette *rapAphrA* de *B. subtilis* en el plásmido pHT315 Ω Xyl-*KpnI*, que presenta un promotor inducible con xilosa, transformar con el vector las cepas de *B. thuringiensis* HD73 y *B. subtilis* PY79 (pMLK83-2B) y evaluar los efectos en las cinéticas de crecimiento, esporulación y expresión de Cry1Aa, así como en la eficiencia de esporulación.

III. MARCO TEÓRICO

3.1 Comunicación célula-célula: *quorum sensing*

La comunicación en bacterias se lleva a cabo mediante el intercambio de moléculas o señales químicas nombradas autoinductores. Este proceso denominado como *quorum sensing* permite a la bacterias monitorear su densidad de población celular, regular la expresión de factores de virulencia (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*), formar biopelículas (*Pseudomonas aeruginosa*), esporular en *B. subtilis* o volverse competentes como en *Streptococcus pneumoniae* y *B. subtilis* (Taga y Bassler, 2003; Federle y Bassler, 2003; Bassler, 2002).

La naturaleza química de los autoinductores depende del tipo de bacteria, por ejemplo, en bacterias Gram negativas, los autoinductores son principalmente derivados de lactonas mientras que en Gram positivas los autoinductores son oligopéptidos. Los oligopéptidos presentan una estructura variable y son sintetizados en el ribosoma produciendo un péptido precursor que posteriormente es escindido, modificado y exportado. La concentración de los péptidos señal aumenta en función de la densidad celular (DeLisa, y Bentley, 2002). En nichos donde las bacterias están compitiendo con otras especies bacterianas por nutrientes y fuentes de energía limitadas, la habilidad para inactivar, remover o sintetizar un autoinductor antagonista les proporciona una ventaja a una especie con respecto a otra permitiendo la ocupación de un nicho en particular (Schauder y Bassler, 2001; Federle y Bassler, 2003).

3.2 Péptidos señal implicados en el proceso de competencia en *B. subtilis*

Bajo ciertas condiciones de crecimiento, *B. subtilis* expresa un conjunto de proteínas involucradas en la incorporación e integración de DNA extracelular. La expresión de estas proteínas está regulada por *quorum sensing* (Tortosa *et al.*, 2001). Este sistema de competencia permite a la bacteria incrementar su adaptación al ambiente además de proporcionarle ventajas competitivas (Sturme *et al.* 2002). *B. subtilis* utiliza para este fin dos péptidos, la feromona ComX y el factor de competencia y esporulación CSF, para monitorear y responder a alta densidad de población. Cambios en la expresión genética en respuesta a la falta de nutrientes en el medio son mediados por la forma fosforilada del factor de transcripción ComA (ComA~P) (Bijlsma y Groisman, 2003) dirigiendo la síntesis de ComX a partir de dos genes: *comX* y *comQ*, el primero codifica un precursor de 55 aminoácidos, el cual es posteriormente escindido hasta una cadena de 10 aminoácidos (ADPITRQWGD) (Bacon-Schneider *et al.*, 2002).

La feromona ComX activa la histidina cinasa ComP, dirigiendo la autofosforilación de ComP y la transferencia de un grupo fosfato al regulador de respuesta ComA (Figura 1) (Dunny y Leonard, 1997). La cantidad de feromona ComX en el sobrenadante aumenta conforme se incrementa la población microbiana. Bacon-Schneider *et al.* (2002) encontraron que la concentración de la feromona ComX en el medio extracelular determina la expresión de los genes implicados en el *quorum sensing* (*srfA*).

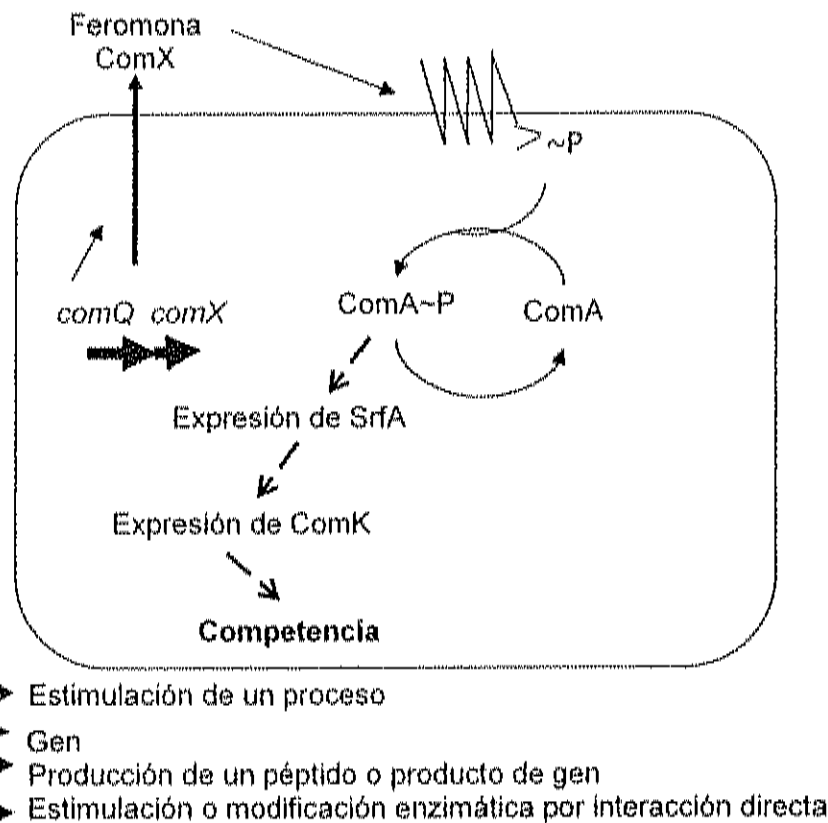


Figura 1. Papel de los péptidos señal en el proceso de competencia en *Bacillus subtilis* (tomada de Dunny y Leonard, 1997).

3.3 Péptidos señal implicados en el proceso de esporulación en *B. subtilis*

Cuando los nutrientes en el medio son escasos, *B. subtilis* dirige su metabolismo y fisiología a la producción de esporas, éstas son metabólicamente menos activas y muy resistentes a ambientes adversos y condiciones hostiles (Phillips y Strauch, 2002). En *B. subtilis* el proceso de esporulación ha sido ampliamente descrito, es mediado por *quorum sensing* y hasta ahora han sido identificados siete péptidos señal agrupados en la familia Phr, cada uno de ellos asociado a su correspondiente fosfatasa Rap (Tabla 1) (Lazzazera *et al.*, 1997, Jiang *et al.*, 2000, Tjalsma *et al.*, 2004).

Tabla 1. Péptidos señal responsables del *quorum sensing* en *B. subtilis*

| Nombre | Secuencia | Proceso |
|-----------|-----------|----------------------------|
| CSF(PhrC) | ERGMT | Esporulación y Competencia |
| PhrA | ARNQT | Esporulación |
| PhrE | SRNVT | Esporulación |
| PhrF | QRGMI | Esporulación |
| PhrG | EKMIG | Esporulación |
| PhrI | DRVGA | Esporulación |
| PhrK | ERPVG | Esporulación |

(Tomada de Lazazzera, 2001).

Los péptidos Phr son transcritos y procesados, se considera que una secuencia de alrededor de 11-15 aminoácidos es secretada al medio extracelular a través del sistema SecA, pero aún no ha sido establecido como llega a procesarse a una secuencia de 5 aminoácidos (Lazazzera, 2001). La identidad de las proteasas responsables de la modificación extracelular de estos oligopéptidos se desconoce aunque los probables sitios de corte, se han sugerido y probado mediante mutagénesis dirigida (Stephenson *et al.*, 2003). Los péptidos son subsecuentemente importados por una oligopéptido permeasa (Opp; Grandvalet *et al.*, 2001). Los péptidos Phr pueden activar su propia producción y esto constituye una autorregulación, característica en los sistemas de *quorum sensing* (Sturme *et al.*, 2002).

Los pentapéptidos Phr inactivan a las fosfatasa Rap por su unión con éstas (Lazazzera, 2001). Los detalles del mecanismo de unión no han sido del todo elucidados, pero se considera que motivos repetidos tipo tetratricopéptidos en la secuencia de la proteína son los que le permiten a estas proteínas defosforilar al regulador de respuesta Spo0F y aceptar la unión con el péptido señal (Pottathil y Lazazzera, 2003). Para el PhrA se ha determinado un porcentaje de inhibición de la fosfatasa del 50% cuando se encuentran en una relación 40:1 (Perego, 1997).

Un caso especial es el del péptido PhrC o CSF que juega un papel tanto en la competencia como en la esporulación. Al igual que otros autoinductores, la concentración de CSF aumenta en función de la densidad celular. A baja concentración interna, este péptido promueve la competencia por el incremento indirecto de la actividad de ComA. Sin embargo, con alta concentración interna, CSF indirectamente incrementa la actividad de la proteína Spo0A~P (Shauder y Bassler, 2001). La estructura de CSF es resultado de la escisión de un propéptido de 40 aminoácidos, denominado PhrC, el cuál presenta una secuencia señal para su exportación y una secuencia putativa para el reconocimiento por una peptidasa. Después de ser importado, CSF puede interactuar con al menos dos receptores intracelulares. Sólo uno de estos receptores ha sido identificado, la fosfatasa RapC, la cuál regula negativamente la actividad de ComA. A bajas concentraciones CSF (1-5 nM) estimula la actividad de ComA a través de la inhibición de RapC, mientras que a altas concentraciones (>20 nM), inhibe la expresión de los genes de ComA. CSF puede realizar esta función por estimulación de la actividad de un represor transcripcional, o por la inhibición de ComA (Figura 2).

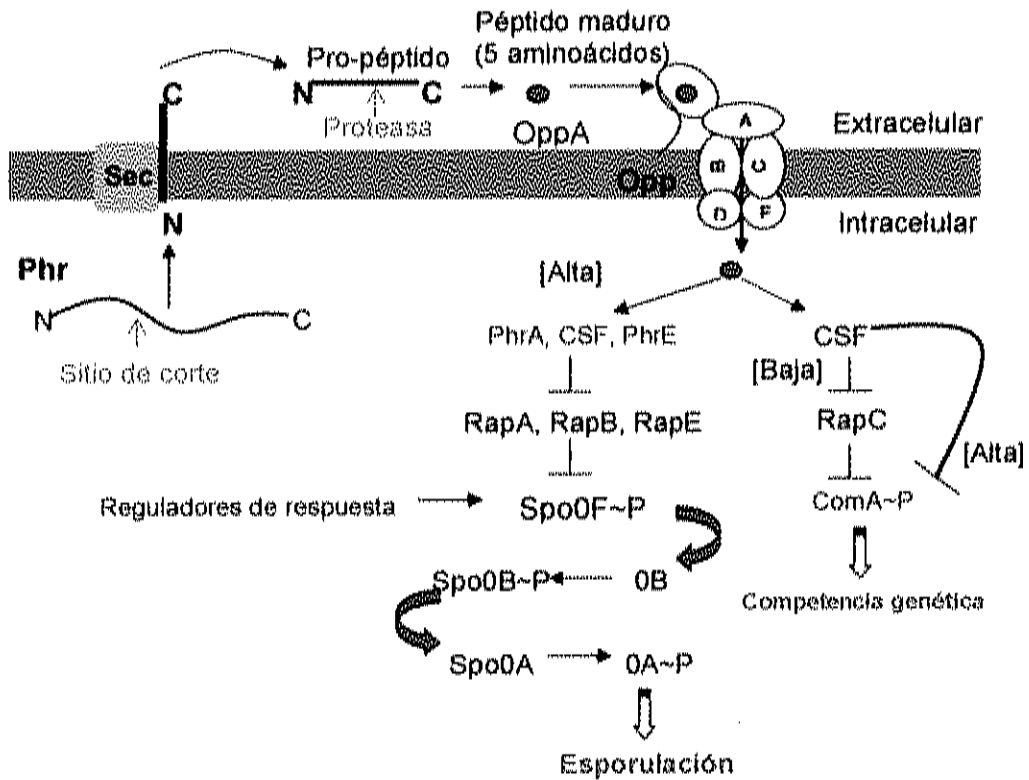


Figura 2. Modelo del mecanismo de producción, transporte y respuesta de los péptidos Phr (Lazazzera, 2001).

3.4 Regulación del inicio de la esporulación en *B. subtilis*

El proceso inicial de esporulación en *B. subtilis* es controlado por un sistema multicomponente de transducción de señales (Tabla 2), sujeto a regulación espacial y temporal por una cascada de fosforilación, cuyo regulador central es el factor de transcripción Spo0A (Jiang *et al.*, 2000; Kanamaru *et al.*, 2002). El proceso de esporulación inicia con la acumulación de una cantidad considerable de Spo0A~P, la cuál controla directamente la transcripción de diversas proteínas reguladoras y de los factores sigma,

requeridos para el establecimiento de la segunda etapa en el proceso de esporulación (Hoch, 1993). Entre los controles que existen sobre los niveles de Spo0A~P destaca la proteína CodY, que se une GTP. Para eliminar la regulación por CodY se utilizan inhibidores de la GMP-sintasa (Mitani *et al.*, 1977).

Tabla 2. Genes involucrados en el inicio del proceso de esporulación en *B. subtilis*

| Locus | Producto de gen (PM, Da) | Función |
|--------------|--------------------------|---|
| <i>Spo0A</i> | 29,691 | Regulador de respuesta, represor transcripcional y activador. |
| <i>Spo0F</i> | 14,286 | Regulador de respuesta |
| <i>Spo0B</i> | 22,542 | Fosfotransferasa |
| <i>Spo0H</i> | 25,447 | Factor sigma |
| <i>Spo0K</i> | Operon de 5 genes | Oligopéptido permeasa |
| <i>Spo0E</i> | 9,791 | Regulador negativo |
| <i>Obg</i> | 47,668 | Proteína G, esencial para el desarrollo de la bacteria |
| <i>Kin A</i> | 69,170 | Cinasa citoplasmática |
| <i>Kin A</i> | 47,774 | Cinasa de membrana |
| <i>abrB</i> | 10,773 | Represor multifuncional |
| <i>Hpr</i> | 23,718 | Represor multifuncional |

(Tomada de Hoch, 1993)

La fosforilación de Spo0A es mediada por al menos cuatro histidina cinasas (KinA, KinB, KinC y KinD) además de dos proteínas, Spo0F y Spo0B (Fujita y Losick, 2003; Quisel *et al.*, 2001). Las distintas histidina cinasas tienen diferentes papeles en la activación de Spo0A y responden a diferentes estímulos. La KinA es la cinasa más importante en el proceso de esporulación en un medio o caldo nutritivo para este fin, KinB juega un papel importante cuando el medio de cultivo es deficiente en glucosa y tanto KinC como KinD contribuyen poco al proceso de esporulación bajo cualquier condición de

crecimiento probada, pero regulan la actividad de Spo0A durante el crecimiento vegetativo (Quisel *et al.*, 2001). Dos familias de aspartil fosfatasas controlan el flujo de grupos fosfato; las de la familia Rap (RapA, RapB y RapE) que específicamente defosforilan Spo0F (Figura 2), y las fosfatasas Spo0E, YnzD y YisI que actúan sobre Spo0A. La actividad de RapA y RapE está sujeta a la inhibición directa por PhrA y PhrE (Kanamaru *et al.*, 2002, Bijlsma y Groisman, 2003).

La expresión de las fosfatasas RapA y RapB es activada de manera diferente por los procesos fisiológicos alternos a la esporulación como la competencia y el crecimiento, permitiendo de ese modo el reconocimiento de una variedad de señales negativas e influyendo directamente en la transferencia de grupos fosfatos hasta Spo0A. El gen de *rapA* está transcripcionalmente acoplado a un segundo gen, *phrA*, cada uno con su promotor independiente, de la misma manera que los genes de los otros péptidos señal de la familia Phr hasta ahora identificados. La transcripción del gen *rapE* es promovida durante el crecimiento vegetativo, para asegurar que la esporulación no se lleve a cabo cuando las condiciones de crecimiento son óptimas (Jiang *et al.*, 2000).

3.5 Etapas en el proceso de esporulación de *B. subtilis*

El proceso de esporulación en *B. subtilis* procede a través de una serie de cambios morfológicos bien definidos que involucran la conversión de una célula en crecimiento en dos compartimentos y se divide en siete etapas. En la etapa 0 se ubican las células que no han entrado en esporulación, la etapa I incluye células con un filamento axial, dentro de las etapas II y III se forma un septo que separa a la célula madre y al esporangio, el resto de las etapas comprenden etapas más avanzadas de morfogénesis que llevan a la

maduración de la espora y a su posterior liberación. La transcripción temporal y espacial es controlada por proteínas de unión al DNA y cinco factores sigma de transcripción, y más de 150 genes participan en este proceso, (Stragier y Losick, 1996). El inicio del proceso es coordinado por los niveles de Spo0A~P que regula la transcripción de varios genes, entre los que destacan factores sigma específicos de esporulación, σ^H en principio y la sucesiva activación de los factores σ^E y σ^K en la célula madre, y σ^F y σ^G en la pre-espora (Lereclus *et al.*, 2000) (Figura 3). Por otra parte, estudios recientes sugieren que al entrar a la esporulación un cultivo de *B. subtilis* puede presentar 2 subpoblaciones, una de las cuales se desfasa en la entrada a la esporulación con respecto a la primera. Este comportamiento bifásico muestra la complejidad en el control del inicio de la esporulación, donde una misma población celular puede tener diferente respuesta (Veening *et al.*, 2005).

3.6 Esporulación y señales de comunicación célula-célula en *B. thuringiensis*

El proceso de esporulación de *B. subtilis* es un proceso ampliamente descrito y se considera que por la cercanía filogenética con *B. thuringiensis*, la regulación de este proceso en esta bacteria puede ser similar (Aronson, 2002). La relevancia del proceso de esporulación en *B. thuringiensis* radica en que durante este proceso se sintetizan proteínas que forman cristales y son liberadas al medio a la par con la espora madura al final del proceso de esporulación (Figura 3). Estas proteínas (δ -endotoxinas) son insecticidas y tienen gran interés comercial como biopesticidas (Ellar, 1997).

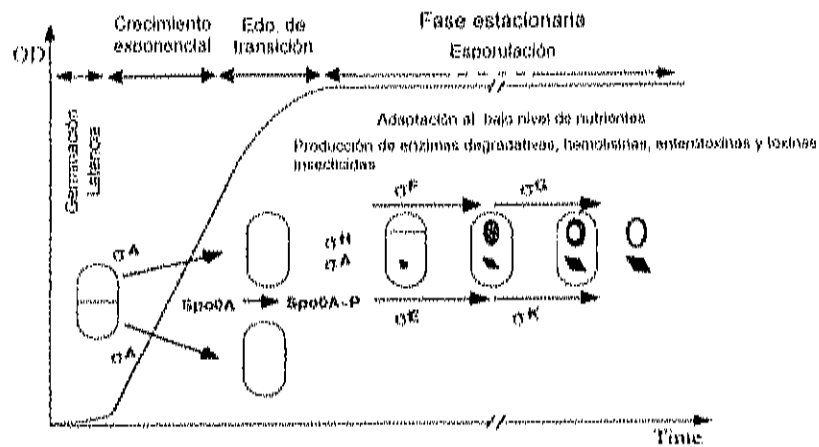


Figura 3. Control genético de la esporulación y producción de proteína Cry en *B. thuringiensis* (Modificada de Lereclus *et al.*, 2000).

Hasta ahora no se ha definido experimentalmente la secuencia de péptidos señal de *B. thuringiensis* involucrados en el establecimiento del inicio de esporulación. Sin embargo, estudios realizados por López-y-López y de la Torre (2005) mostraron que al añadir sobrenadante de la fase de transición a otros cultivos durante la fase exponencial temprana, se retardó la esporulación y expresión de *cry1Aa* sugiriendo que factores extracelulares solubles pudieron ser excretados durante la fase de transición y funcionar como señales de comunicación (Figura 4). Evidencia de señales químicas que participan en el proceso de esporulación para bacterias Gram positivas se han encontrado también en *Clostridium perfringens* (Shih y Labbé, 1996).

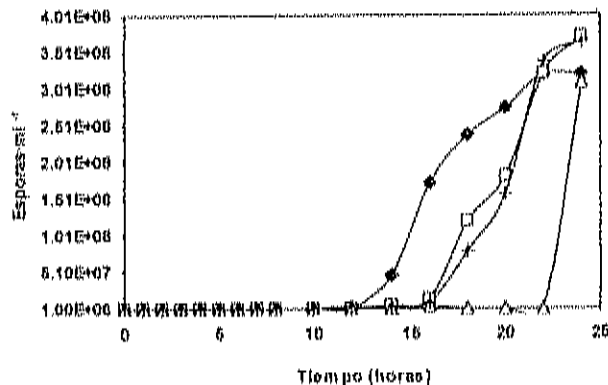


Figura 4. Efecto sobre la liberación de esporas de la adición de sobrenadantes de cultivos de diferentes estadios metabólicos a un cultivo por lote de *B. thuringiensis* en crecimiento exponencial temprano: ◆ control, □ 3 h (fase exponencial), Δ 5 h (fase de transición) y + 7 h (fase estacionaria).

Por otra parte, Pottathil y Lazazzera (2003) realizaron un análisis bioinformático de regiones de su genoma que presentan motivos comunes a los de las proteínas *rap* de *B. subtilis* y que están acoplados a secuencia de péptidos putativos tipo *phr* de 42 aminoácidos de extensión. La similitud en secuencia con las fosfatasa Rap es baja y la señalan como un factor de transcripción de respuesta a péptidos señal. Al mismo tiempo establecen la secuencia del péptido putativo señal maduro (NprRB) en *B. thuringiensis* con una extensión de 5 aminoácidos (SKPDT). Este péptido fue probado por Aceves (2005) en *B. thuringiensis* encontrándose un aumento en la esporulación, así como en la expresión de *cry1Aa* a partir del promotor tardío y la liberación de esporas, mientras que en *B. subtilis* no fue observado ningún incremento en la esporulación, sugiriendo la especificidad de dicho péptido.

De igual manera, se han determinado secuencias pentapeptídicas que controlan la expresión de factores de virulencia siguiendo un mecanismo tipo *quorum sensing* en *Bacillus cereus* (Slamti y Lereclus, 2005). Sin embargo, este mecanismo es diferente al sistema Rap-Phr de *B. subtilis*, ya que en *B. cereus*, el péptido señal activa la unión de reguladores de unión a DNA y es específico para cada cepa (Slamti y Lereclus, 2002).

IV. HIPÓTESIS

El sistema RapA_{PhrA} y el péptido señal sintético PhrA tienen un efecto similar en la esporulación de *B. thuringiensis* y *B. subtilis*.

V. OBJETIVO GENERAL

Comparar la respuesta de *B. thuringiensis* y *B. subtilis* al sistema RapA_{PhrA} y al péptido señal sintético PhrA.

VII. OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar la similitud de los genes de inicio de esporulación entre *B. subtilis* y *B. thuringiensis* mediante un análisis bioinformático.
2. Evaluar si *B. thuringiensis* responde a los inductores de esporulación empleados en *B. subtilis*.
3. Amplificar los genes *rapA* y el casete *rapA_{PhrA}* de *B. subtilis*.
4. Construir el plásmido pHT315 Ω Xyl-KpnI-*rapA* y pHT315 Ω Xyl-KpnI-*rapA_{PhrA}*.
5. Transformar *B. thuringiensis* HD73 y *B. subtilis* PY79 (pMLK83-2B).
6. Evaluar el efecto de la expresión de *rapA* y *rapA_{PhrA}* y del péptido sintético PhrA en la eficiencia de esporulación de *B. thuringiensis* y de *B. subtilis*.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Análisis filogenético de los genes de inicio de la esporulación de *B. subtilis* y *B. thuringiensis*

Se realizó un análisis de las secuencias de los genes que participan en el establecimiento del inicio del proceso de esporulación disponibles en el banco de genes del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi>) para *B. thuringiensis* serovar. *konkukiani* y *B. subtilis* 168 (<http://genolist.pasteur.fr/Subtilist>), para determinar el grado de similitud e identidad entre los genes de las diferentes especies (ClustalX[®] dentro del programa DNA star[®]).

7.2 Cepas bacterianas

Las cepas que se emplearon en este estudio se resumen en la Tabla 3. Las de *B. subtilis* derivan de la cepa PY79 (pMLK83-2B) (GOB18) y las de *B. thuringiensis* de la cepa HD73 var. *kurstaki*.

Tabla 3. Cepas utilizadas en este estudio

| Código | Cepa ^a | Genotipo | Resistencia antibiótico ^b | Procedencia |
|--------|--|--|---|--------------------------------|
| | <i>E. coli</i> Top10 | F'(lacI ^q , Tn10(Tet ^R)) | | • Invitrogen [®] |
| GOE138 | <i>E. coli</i> NK5772 | <i>dam⁻ dcm⁻</i> | | • Ringquist & Smith, 1992. |
| GOB18 | <i>B. subtilis</i> PY79 (pMLK83-2B) | <i>amyE</i> | Km | • Prado-Rodríguez, 2004. |
| GOB281 | <i>B. subtilis</i> PY360 | <i>spo0A⁻</i> | | • Olmedo <i>et al.</i> , 1990. |
| GOB13 | <i>B. thuringiensis</i> HD73 | | | • Zeigler, 1999. |
| GOB137 | <i>B. thuringiensis</i> HD73 pHT315ΩXyl-KpnI | | Er | • Este estudio |
| GOB138 | <i>B. thuringiensis</i> HD73 pHT315ΩXyl-KpnI- <i>rapA</i> | | Er | • Este estudio |
| GOB139 | <i>B. thuringiensis</i> HD73 pHT315ΩXyl-KpnI- <i>rapAphrA</i> | | Er | • Este estudio |
| GOB141 | <i>B. subtilis</i> PY79 pMLK83-2B, pHT315ΩXyl-KpnI | <i>amyE</i> | Km, Er; | • Este estudio |
| GOB142 | <i>B. subtilis</i> PY79 pMLK83-2B, pHT315ΩXyl-KpnI- <i>rapA</i> | <i>amyE</i> | Km, Er; | • Este estudio |
| GOB143 | <i>B. subtilis</i> PY79 pMLK83-2B, pHT315ΩXyl-KpnI- <i>rapAphrA</i> | <i>amyE</i> | Km, Er | • Este estudio |

^a Las cepas se conservaron a -80°C. Las cepas de *B. thuringiensis* y *B. subtilis* además se conservaron en discos con esporas con una concentración aproximada de 2.8x10⁶ esporas/disco.

^b Km, kanamicina y Er, eritromicina.

7.3 Medios de cultivo empleados

Los medios de cultivo empleados en este estudio se resumen en la Tabla 4.

Tabla 4. Medios de cultivo

| Cepas | Medio de cultivo* | Referencia |
|-------------------------|--------------------|-------------------------------------|
| <i>E. coli</i> | Luria-Bertani (LB) | Sambrook y Russell, 2001. |
| <i>B. subtilis</i> | Luria-Bertani (LB) | Sambrook y Russell, 2001. |
| | Schaeffer (DSM) | Harwood y Cutting, 1990. |
| <i>B. thuringiensis</i> | TrisG | Aronson <i>et al.</i> , 1971. |
| | Harina de soya | López- y- López y de la Torre, 2005 |

* Composición de los medios de cultivo (ver anexos).

7.4 Construcción de plásmidos

El plásmido empleado fue el pHT315 Ω Xyl (Arantes y Lereclus, 1991), presenta un promotor inducible con xilosa que es reprimido por el represor XylR, el cual se expresa constitutivamente. El mapa de pHT315 Ω Xyl se muestra en la Figura 5.

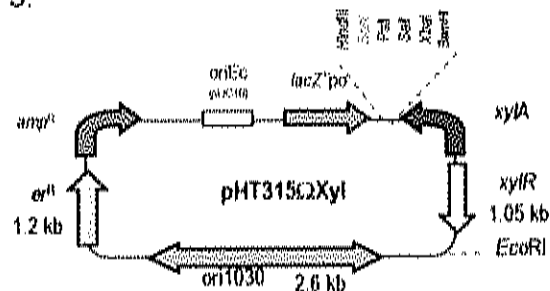


Figura 5. Mapa del plásmido pHT315 Ω Xyl.

7.5 Manipulación de DNA

En el plásmido pHT315 Ω Xyl se insertó una pequeña secuencia de DNA que funciona como adaptador pues lleva los sitios de restricción para *KpnI*-*XhoI*. La Tabla 5 muestra las secuencias de los adaptadores empleados (1713 y 1714). Para ello, se diseñaron dos oligonucleótidos de DNA con las secuencias para estos sitios de restricción y se hibridaron a fin de producir la doble cadena de DNA. Esto se hizo calentando ambos oligonucleótidos a 70°C por un minuto y dejando enfriar la mezcla a temperatura ambiente. Este fragmento de DNA de doble cadena se clonó en el plásmido pHT315 Ω Xyl en el sitio *SphI* perdiéndose este último y obteniéndose el plásmido pHT315 Ω Xyl-*KpnI*.

Tanto el gen *rapA* como el cassette *rapA-phrA* fueron amplificados de una colonia de *B. subtilis* (PY79) por PCR (Programa: 94°C/2 min., 94°C/30 s., 50°C/40s, 72°C/2 min., durante 29 ciclos; 72°C/5 min. y 16°C), los

oligonucleótidos o iniciadores fueron sintetizados por Sigma[®] (la Tabla 5 muestra las secuencias de los iniciadores empleados). La reacción de PCR se realizó en un termociclador MiniCycler (MJ Research). Ambos genes se subclonaron en el vector pCRII[®]-TOPO[®] siguiendo las indicaciones del fabricante (Invitrogen[®]). Para la liberación del gen *rapA*, se utilizaron los sitios de restricción *Bam*HI y *Xba*I, mientras que para el cassette *rapAphrA* se utilizaron las enzimas *Spe*I/*Xba*I. Los fragmentos fueron purificados de banda (Gel extraction purification kit Qiagen[®]) y ligados al plásmido pHT315 Ω Xyl-*Kpn*I. Las enzimas de restricción y la DNA ligasa se utilizaron según recomendaciones de los fabricantes (Invitrogen[®] y New England Biolabs[®]).

La transformación y selección de células recombinantes de la cepa *E. coli* Top10 y *E. coli* NK5772 se realizó por crecimiento selectivo en medio LB con carbenicilina a una concentración de 100 μ g/mL (Sambrook y Russell, 2001). Los diferentes plásmidos se purificaron mediante lisis alcalina utilizando las soluciones amortiguadoras y de lavado de Qiagen[®]. La secuencia de los genes *rapA* y *rapAphrA* se verificó utilizando los oligonucleótidos PHT315 y M13 reverso (Tabla 5), mediante secuenciación en el equipo ABIPRISM 3700 (Applied Biosystem), con la técnica de Sanger o de dideoxinucleótidos (Sanger *et al.*, 1977) en el Lab. de Genómica y Secuenciación de CINVESTAV-Unidad Irapuato.

Tabla 5. Secuencia de oligonucleótidos o iniciadores

| Nombre | Secuencia (5'-3') | Sitios de Restricción |
|--------------------------|--|-----------------------|
| Reverso RapA-PhrA (1634) | ACAACAGGTACCCTGGTGGCAAGTGGATCTTCT GA | KpnI |
| Reverso RapA (1635) | ACAAAAGGTACCGCAACGAGCAACAAACCTGACAT | KpnI |
| Directo RapA (1636) | CAAACCTCTAGATAAGGAGAATTGAGGATGAAGCAGACGATT | XbaI |
| Adaptador directo (1713) | ACTCGAGGGTACCCATG | XhoI, KpnI, SphI |
| Adaptador reverso (1714) | GGTACCCTCGAGTCATG | XhoI, KpnI, SphI |
| RapA-PhrAReverso (1715) | CTGGTGGCAAGTGGATCTTCTGA | |
| RapA directo (1716) | TAAGGAGGAATTGAGGATGAAGCAGACGATT | |
| RapA reverso (1717) | GCAACGAGCAACAAACCTGACAT | |
| M13 directo | GTAAAACGACGGCCAG | |
| M13 reverso | CAGGAAACAGCTATGAC | |
| PHT315 (1726) | TAGGTGATGTACTIONACTA T | |

7.6 Transformación de *B. thuringiensis* (HD73) y *B. subtilis* (PY79 pMLK83-2B)

Los diferentes plásmidos (pHT315 Ω Xyl-KpnI, pHT315 Ω Xyl- KpnI - rapA y pHT315 Ω Xyl-KpnI-rapAphrA) se introdujeron por electroporación (2.3 kV, 475 Ω , 25 μ F) a la cepa de *B. thuringiensis* HD73 (BAF Laboratory Methodology). Esto se realizó en el laboratorio del Dr. Eleazar Barbosa del Instituto de Ciencias Agrícolas utilizando un electroporador BTX-ECM630. A su vez se transformó *B. subtilis* PY79 (pMLK83-2B) por el método de dos pasos (Harwood y Cutting, 1990). Las células recombinantes de ambas especies se seleccionaron por su crecimiento en medio LB con eritromicina a una concentración de 10 μ g/mL. La comprobación de la inserción de los plásmidos se hizo mediante PCR de colonia, empleando los oligos 1715-1717 (pHT315 Ω Xyl-KpnI-rapA, pHT315 Ω Xyl- KpnI-rapAphrA), 1726 y M13

reverso (pHT315 Ω Xyl-KpnI) (Tabla 5) y por patrón de digestión con la enzima *EcoRI*.

7.7 Cinéticas de crecimiento y esporulación en *B. subtilis* y *B. thuringiensis*

Se evaluó el crecimiento de *B. thuringiensis* y *B. subtilis* en los medios descritos en la Tabla 4, a una temperatura de incubación de 30°C y 37°C respectivamente. Para *B. thuringiensis* el crecimiento en medio TrisG se evaluó en principio siguiendo el esquema que se presenta en la Figura 6.

Las cepas transformadas de *B. subtilis* se inocularon en cajas con medio LB con kanamicina a una concentración de 5 μ g/mL, se incubaron por 18 hrs. a 37°C, posteriormente se resuspendieron colonias típicas aisladas en 40 mL de medio líquido Schaeffer (DSM) en matraces nefelométricos, se incubaron a 37°C y 200 rpm (Harwood y Cutting, 1990). En este caso, el crecimiento de *B. subtilis* y *B. thuringiensis* fue monitoreado en un colorímetro Klett-Summerson equipado con filtro rojo.

La eficiencia de esporulación se determinó a su vez, por el método de resistencia térmica (Harwood y Cutting, 1990), tras la adición de ácido micofenólico (100 μ M) y Decoyinina (1.8 mM). El inductor se añadió a un cultivo en medio LB en la mitad de la fase logarítmica (~100 UK) y tras 17 horas del inicio de la incubación se determinó la eficiencia de esporulación por el método antes señalado.

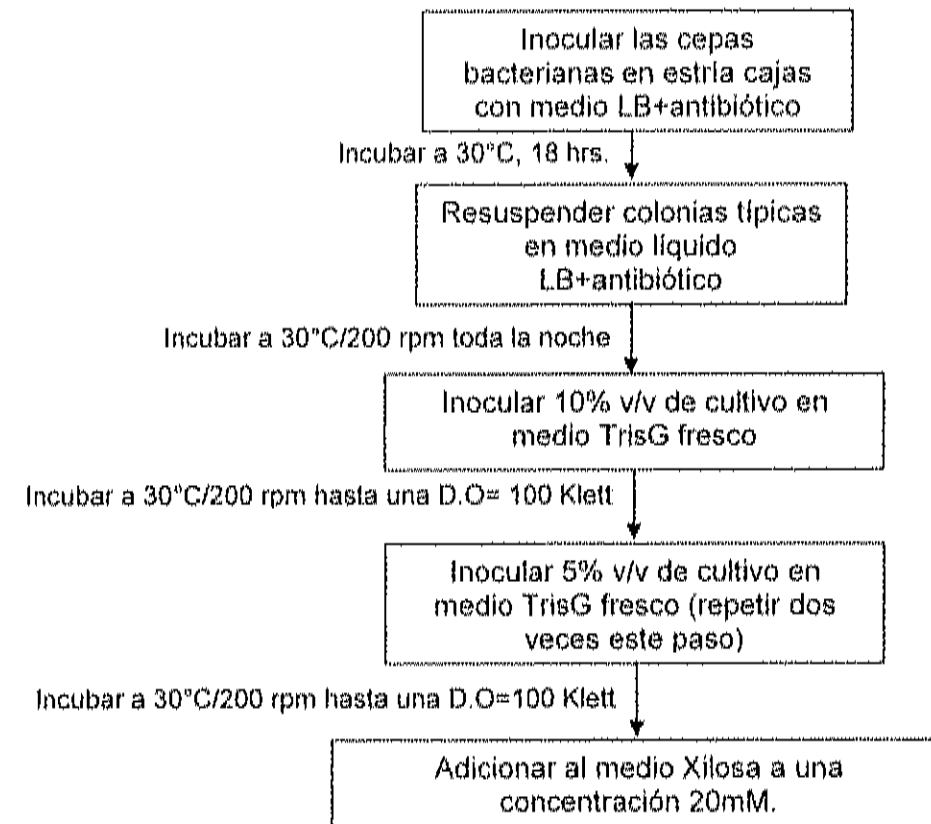


Figura 6. Metodología utilizada para analizar el efecto de diferentes tratamientos sobre el crecimiento de *B. thuringiensis*.

Por otra parte, se evaluó el crecimiento y esporulación de las cepas silvestres y transformadas de *B. subtilis* y de *B. thuringiensis* en medio harina de soya diluido (López y López y de la Torre, 2005). En este caso, se prepararon matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio adicionado de xilosa a una concentración final de 20 mM para la activación del promotor *xyIA* (Grandvalet *et al.*, 2001). A cada matraz se le añadió un disco con esporas de *B. thuringiensis* o *B. subtilis* con aproximadamente 2.9×10^8 y 2.9×10^7 esporas, respectivamente. Posteriormente se incubaron a 30° C en una agitadora-

incubadora (Environ-Shaker, Lab-Line) a 200 rpm. En este caso, la cuantificación de bacilos, bacilos esporulados y esporas libres se determinó microscópicamente en una cámara de Neubauer por duplicado. La eficiencia de esporulación se determinó de la manera siguiente:

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

7.8 Expresión del gen *gusA* en *B. subtilis*

El inicio de la esporulación en *B. subtilis* se evaluó determinando la expresión del gen reportero *gusA* acoplado al promotor del gen *cry1Aa* través de la cuantificación de la actividad de β -glucuronidasa por la conversión de 4-metilumbeliferil- β -D-galactopiranosido a 4-metilumbeliferona en un equipo VersaFluor™ BIO-RAD a una longitud de onda de excitación de 366 nm y de emisión 445 nm.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

8.1 Similitud de los genes de inicio de esporulación entre *B. subtilis* y *B. thuringiensis*

A fin de poder comparar los sistemas de transducción de señales involucrados en el inicio de la esporulación entre *B. subtilis* y *B. thuringiensis*, se realizó un análisis de similitud entre los principales genes de inicio de la esporulación de estas especies. Sin embargo, en el análisis bioinformático (Tabla 6), se observó que existe gran variabilidad en la secuencia de estos genes, ya que algunos están altamente conservados pero otros no lo están. Por ejemplo, las proteínas Spo0A y Spo0F, de *B. thuringiensis* var. *konkukiani* y *B. subtilis* 168 presentan una identidad alta de casi el 90% (Tabla 6). Esto hace posible suponer que funcionarán de manera muy similar en ambas especies. En cambio RapA, RapC y RapE tienen apenas una similitud de un 43 a 45% con las Rap de *B. thuringiensis*. Esta baja similitud hace dudar de si realmente son ortólogos, y en ese caso, si el péptido de *B. subtilis* PhrA, tendría efecto sobre la fosfatasa Rap de *B. thuringiensis*. Sin embargo, no se tiene acceso a la secuencia del genoma *B. thuringiensis* *kurstaki*, y no se puede descartar que ésta si tenga genes *rap* con mayor similitud, además en *B. subtilis* tres fosfatasas Rap distintas actúan sobre Spo0F~P, lo que sugiere que no se requiere una gran conservación a nivel de aminoácidos, pues es suficiente con que las proteínas posean motivos de tetratricopéptidos (Pottathil y Lazazzera, 2003). Si este es el caso, podría pensarse que al tener RapA este motivo de tetratricopéptido pueda actuar sobre Spo0F de *B. thuringiensis*.

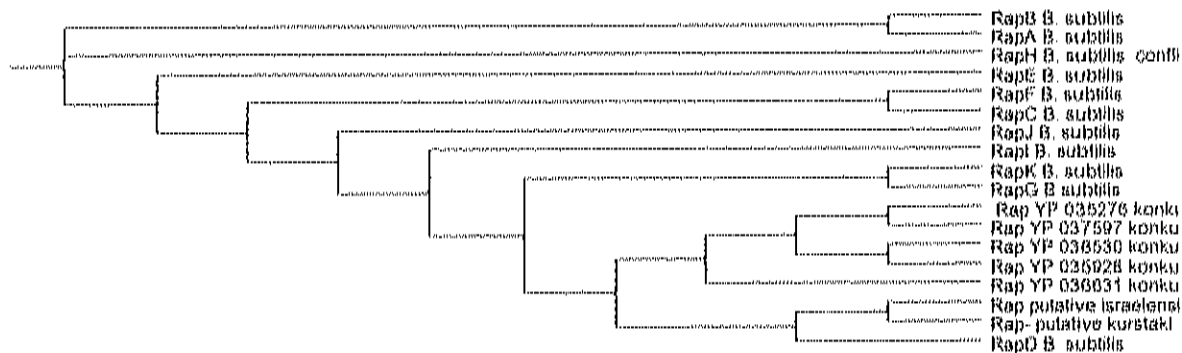


Figura 7. Dendograma de alineamiento de secuencias de las proteínas Rap de *B. subtilis* y *B. thuringiensis* var. *konkukiani*, *israeliensis* y *kurstaki* reportadas. Para este análisis se emplearon los programas de alineamiento ClustalX[®] y Treeview[®].

En la Figura 7, se muestra el resultado del alineamiento de secuencias Rap de *B. subtilis* contra las proteínas del banco de datos (Gen Bank) NCBI que presentan similitud con éstas. Puede observarse que únicamente la RapD se asocia con las secuencias Rap reportadas de *B. thuringiensis*. Aunque RapD se aparece dentro del grupo de las fosfatasas implicadas en el inicio del proceso de esporulación por su control sobre Spo0F (Kunst *et al.*, 1997), Tjalsma *et al.* (2004) señalan que su control no es por medio de *quorum sensing* por carecer de una secuencia de péptido señal acoplada a la misma. Por otra parte, en el intento de alinear las secuencias de los péptidos Phr putativos reportados para *B. thuringiensis* var. *konkukiani* encontramos que el tamaño se ubica en el rango de 140-144 aminoácidos con respecto a los 40-44 aminoácidos que comprenden los péptidos señal de *B. subtilis* y se dificulta su comparación. Sin embargo, Pottathil y Lazzazera (2003), logran un alineamiento a partir del análisis de regiones del genoma que presentan homología con los casetes *rap-phr* y proponen una secuencia para el péptido putativo de 42 aminoácidos de extensión en *B. thuringiensis* NprR.

Tabla 6. Análisis comparativo de las proteínas de inicio de esporulación entre *B. subtilis* y *B. thuringiensis*

| Proteína | Similitud (%) | Identidad (%) | Función |
|-----------------------|---------------|---------------|---|
| Spo0A | 87 | 80 | Regulador central de respuesta de dos componentes |
| Spo0B | 58 | 35 | Fosfotransferasa |
| Spo0F | 87 | 76 | Regulador de respuesta de dos componentes |
| Spo0E | 61 | 50 | Fosfatasa de regulación negativa de la esporulación |
| RapC | 47 | 26 | Fosfatasas que ejercen control negativo de la fosfotransferasa |
| RapA | 45 | 24 | Spo0B |
| RapE | 43 | 24 | |
| KinA | 55 | 35 | Histidina cinasa sensora de dos componentes |
| Spo0K (<i>oppA</i>) | 57 | 38 | Oligopéptido-permeasa. La más parecida de las 19 proteínas transportadoras tipo ABC |
| CodY | 87 | 75 | Represor transcripcional pleiotrópico |
| YizI | 64 | 40 | Fosfatasa Fam Spo0E |
| YnzD | | | Fosfatasa Fam Spo0E |

Esta baja similitud entre los genes que participan en el proceso de esporulación también se han encontrado entre *B. thuringiensis* y *B. anthracis*, principalmente en genes que codifican para proteínas cinasas, involucradas en el inicio del proceso y algunos otros que codifican proteínas estructurales de la corteza de la espora, que sugieren que *B. anthracis* responde a señales químicas diferentes que *B. subtilis* (Aronson, 2002). Otro trabajo reciente en este sentido es del de Brunsing *et al.* (2005) quienes intentaron identificar en *Bacillus cereus* (especie muy cercana a *B. thuringiensis*) las cinasas que sensan el metabolismo e inducen la esporulación y determinaron que no sólo es muy pobre su conservación, sino que algunas presentan mutaciones en *B. cereus* lo que sugieren que ha habido una selección para atenuar el inicio de la esporulación y favorecer la adquisición del plásmido pX01 incrementando de esta manera la patogenicidad de la cepa.

8.2 Respuesta de *B. thuringiensis* a los inductores de esporulación utilizados en *B. subtilis*

En *B. subtilis*, se ha determinado que la disminución de GTP dispara el cambio del programa genético para el inicio de la esporulación. De hecho, los inhibidores de la GMP sintasa, decoyinina y ácido micofenólico, pueden inducir el inicio de la esporulación aún cuando no exista limitación de nutrientes. Para determinar si la respuesta de ambas especies frente a los inductores de esporulación ácido micofenólico y decoyinina eran similares, se incubó ambas especies en medio LB y se probó el efecto de la adición de estos inhibidores. En *B. subtilis* PY79, tanto la decoyinina como el ácido micofenólico tuvieron efecto, aunque la primera tuvo un efecto cuatro veces mayor, sin embargo, en *B. thuringiensis* los dos compuestos prácticamente no tuvieron efecto, tal y como paso con la cepa PY360 que es Spo0A⁻ (Tabla 7). Esto es inesperado pues la proteína CodY de *B. thuringiensis* presenta una identidad del 87% con CodY de *B. subtilis*, por lo que se esperaba que respondiera frente a ambos inductores, especialmente frente a decoyinina. Estos resultados son similares a los que obtuvo Petranovic *et al.* (2004) en *Lactococcus lactis*, quienes no observan un efecto de la decoyinina sobre la proteína CodY, a pesar de comprobar que el inhibidor produce una reducción en la concentración intracelular de GTP de 0.5 mM a 0.1 mM tras 5 minutos de la adición de dicho sustrato, sugiriendo que existe una diferencia fisiológica entre *B. subtilis* y *L. lactis* y que hay otros reguladores de la proteína CodY. Por estos resultados, se descartó el empleo de la decoyinina y del ácido micofenólico en los ensayos posteriores.

Tabla 7. Eficiencia de esporulación a las 17 horas de incubación en medio LB de *B. thuringiensis* y *B. subtilis* al adicionar inductores de esporulación al medio

| Inductor | <i>B. thuringiensis</i> (pHT308/Bz) | <i>B. subtilis</i> (PY79) | <i>B. subtilis</i> (PY360) <i>spo0A</i> ' |
|----------------------------------|--|------------------------------|--|
| Sin inductor | 0% | 0% | 0% |
| Decoyinina (1.8 mM) | 0% | 80.67% | 0% |
| Ácido micofenólico (100 μ M) | 0.28% | 22.55% | 0% |

8.3. Amplificación de los genes *rapA* y el cassette *rapAphrA*

A fin de determinar si era posible modular la esporulación en *B. subtilis* y *B. thuringiensis* mediante la expresión controlada de la fosfatasa RapA y del par RapA PhrA, se procedió a su amplificación por PCR y a su clonación bajo el control del promotor inducible *p_{xyIA}*. Para la amplificación del gen *rapA* y del cassette *rapAphrA* se emplearon los tres primeros oligonucleótidos que se señalan en la Tabla 5, sin embargo, no fue posible obtener los productos de PCR con ese conjunto de oligonucleótidos. Por lo cual, ambos genes se amplificaron con los oligonucleótidos (1715-1717) que no presentan sitios de restricción en los extremos. En la Figura 8, se aprecian las bandas correspondientes al gen *rapA* y el casete *rapAphrA*, las cuales se ubican entre las bandas del marcador de peso molecular de 1 Kb y 1.6 Kb.

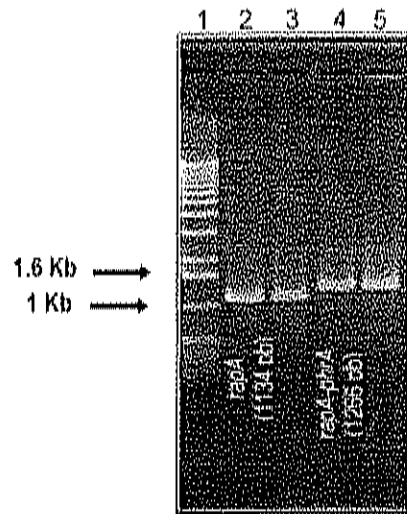


Figura 8. Productos de PCR. Gel de agarosa (0.75%), Carril 1: Marcador de peso molecular (DNA Ladder 1 Kb, Invitrogen®); 2 y 3: gen *rapA*; 4 y 5: *rapA-phrA*.

Lo anterior, obligó a subclonar ambos productos de PCR en el vector comercial pCRII-TOPO® (Figura 9). La ligación de ambos genes en el vector comercial se verificó por digestión doble con las enzimas *KpnI* y *XbaI*, los resultados se muestran en la Figura 10, comprobándose de esta manera el tamaño de los genes clonados.

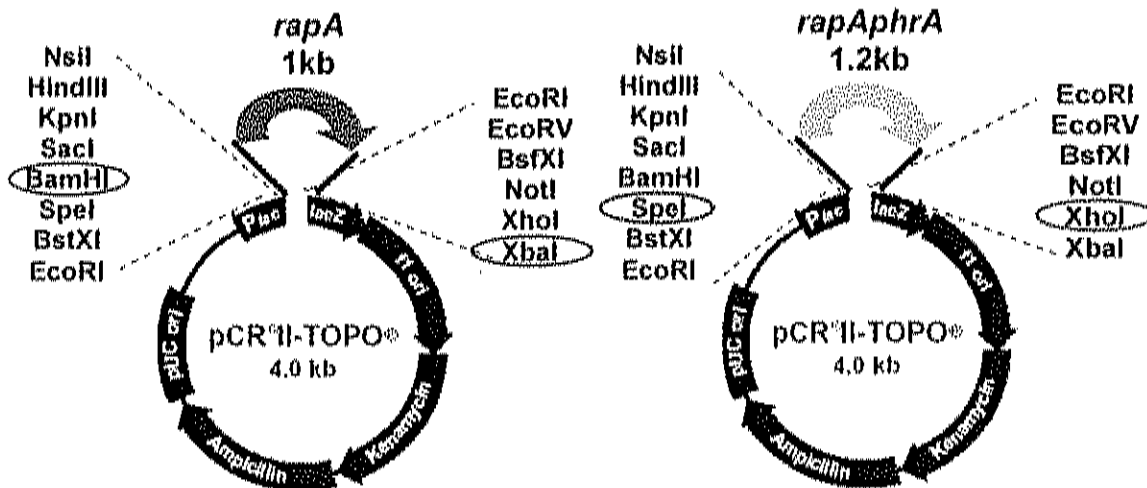


Figura 9. Subclonación de los genes *rapA* y *rapA-phrA* en el vector pCRII-TOPO®. La orientación de los genes que se muestra fue seleccionada para fines de clonación en el vector (pHT315ΩXyl-*KpnI*); se indican los sitios de corte para cada caso.

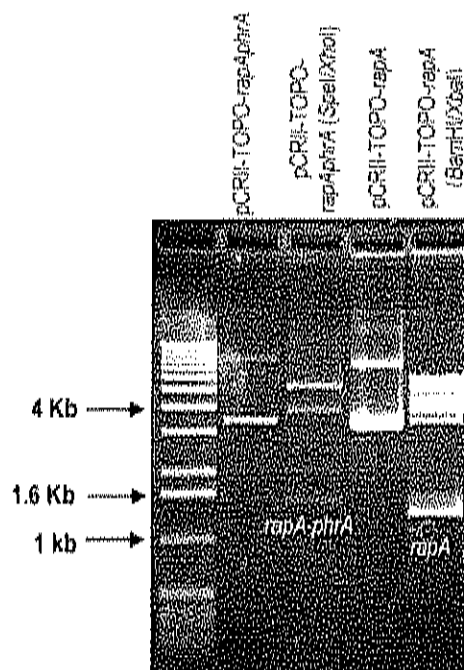


Figura 10. Digestión doble del vector pCRIITOPO[®] recombinante. Para confirmar la clonación de los genes *rapA* y *rapAphrA* en el vector. Una vez digeridos los plásmidos fueron separados en gel de agarosa al 0.75%. El marcador de peso molecular utilizado fue DNA Ladder 1 Kb (Invitrogen[®]).

8.4 Construcción de los plásmidos pHT315ΩXyl-KpnI-*rapA* y pHT315ΩXyl-KpnI-*rapAphrA*

Se diseñaron y construyeron los plásmidos pHT315ΩXyl-KpnI-*rapA* y pHT315ΩXyl-KpnI-*rapAphrA*, a partir de la ligación de los genes *rapA* y *rapAphrA* (previamente purificados de la banda procedente de la doble digestión del vector pCRIITOPO[®] con *XbaI/BamHI* y *XhoI/SpeI*, respectivamente; Figura 10) en el vector pHT315ΩXyl-KpnI. Tanto el tamaño como la secuencia de los genes ligados se comprobó por análisis de restricción y por secuenciación (Lab. de Genómica y Secuenciación, CINVESTAV-Irapuato); además por PCR, confirmando la orientación adecuada y tamaño de los genes clonados en el plásmido pHT315ΩXyl-KpnI (Figuras 11 y 12).

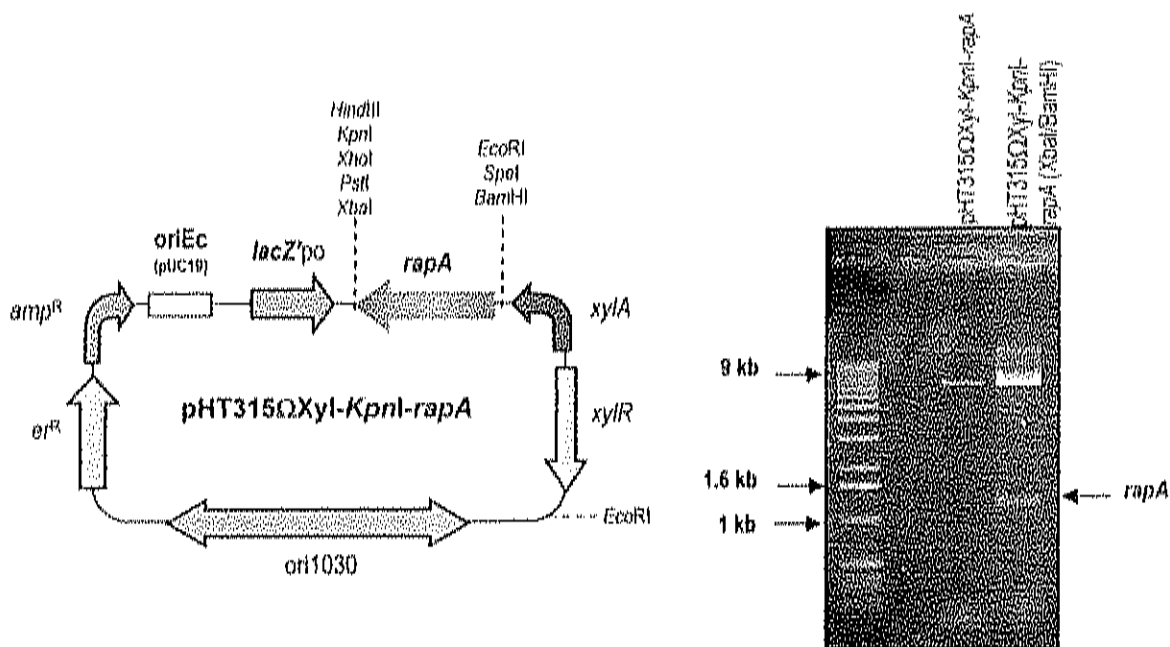


Figura 11. Mapa del plásmido pHT315ΩXyl-KpnI-rapA y análisis por electroforesis en gel de agarosa (0.75%), Carril 1: Marcador de peso molecular (1 Kb, Invitrogen[®]); 3: plásmido sin digerir; 4: digestión doble del plásmido con XbaI/BamHI (confirmación de la clonación del gen).

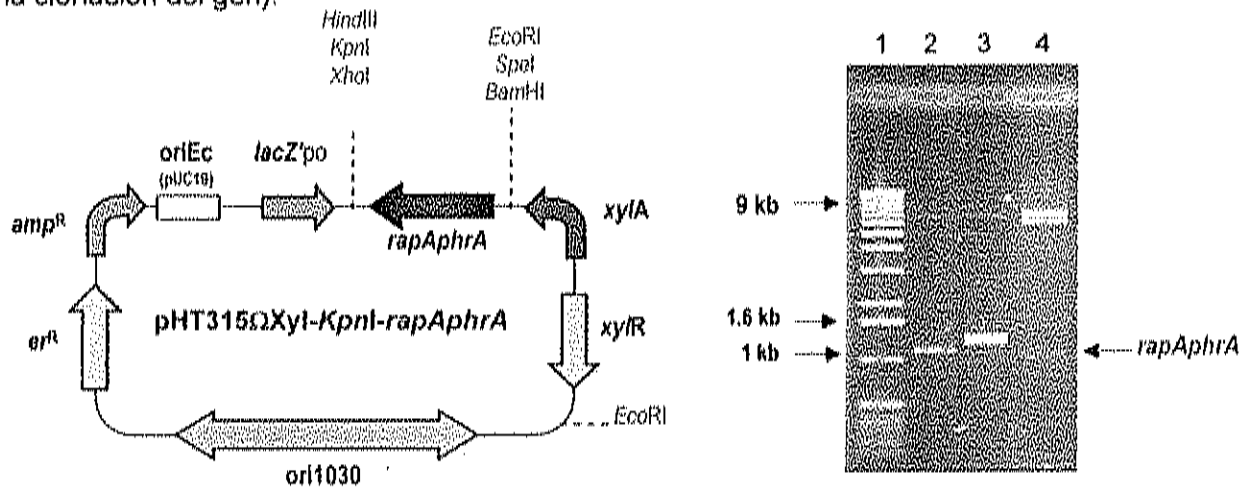


Figura 12. Mapa del plásmido pHT315ΩXyl-KpnI-rapAphrA y análisis por electroforesis en gel de agarosa (0.75%). Carril 1: Marcador de peso molecular (DNA Ladder 1 Kb, Invitrogen[®]); 2: producto de PCR del gen rapA; 3: producto de PCR del cassette rapAphrA; 4: digestión doble del plásmido con BamHI/XhoI (confirmación de la clonación del gen).

8.5 Transformación de *B. thuringiensis* (HD73) y de *B. subtilis* (PY79 pMLK83-2B)

La eficiencia de transformación para ambas especies se muestra en la Tabla 8. Los niveles de transformación en *B. thuringiensis* obtenidos se ubican dentro del rango de eficiencia de transformación reportado que es de 10^5 - 10^7 UFC/ μ g de DNA (Bone y Ellar, 1989; Masson *et al.*, 1989 y Schurter *et al.*, 1989). Por otra parte, los niveles de transformación obtenidos para *B. subtilis* se ubica un log por debajo del rango que se reporta para el método de transformación empleado (Harwood y Cutting, 1990). Sin embargo, la eficiencia de transformación en *B. subtilis* depende en gran medida de si el DNA que se introduce es recombinado al cromosoma o si se utilizan vectores de replicación autónoma, como en este caso.

Tabla 8. Eficiencia de transformación de *B. subtilis* y *B. thuringiensis*

| Cepas | Plásmido | Eficiencia de transformación (UFC/ μ g DNA) |
|------------------------------------|-----------------------------------|---|
| <i>Bacillus thuringiensis</i> HD73 | pHT315 Ω Xyl-KpnI | 1.51×10^5 |
| | pHT315 Ω Xyl-KpnI-rapA | 1.15×10^5 |
| | pHT315 Ω Xyl-KpnIrapAphrA | 4.2×10^5 |
| <i>Bacillus subtilis</i> pMLK83-2B | pHT315 Ω Xyl-KpnI | 2.5×10^4 |
| | pHT315 Ω Xyl-KpnI-rapA | 1.4×10^4 |
| | pHT315 Ω Xyl-KpnI-rapAphrA | 1.3×10^4 |

Para comprobar la transformación de las cepas de *B. subtilis* y de *B. thuringiensis*, se verificó en cada cepa la presencia de los genes clonados por medio de PCR de colonia y patrón de digestión del producto. La Figura 13 (paneles A y B) muestra los oligonucleótidos empleados en las reacciones de PCR para la amplificación de los genes *rapA* y *rapAphrA* y el tamaño comprobado en el gel de corrida. La Figura 13C y la Tabla 9 muestran el patrón de digestión con *EcoRI* de los plásmidos pHT315 Ω Xyl-KpnI-rapA y pHT315 Ω Xyl-KpnI-rapAphrA y tamaños esperados en cada caso.

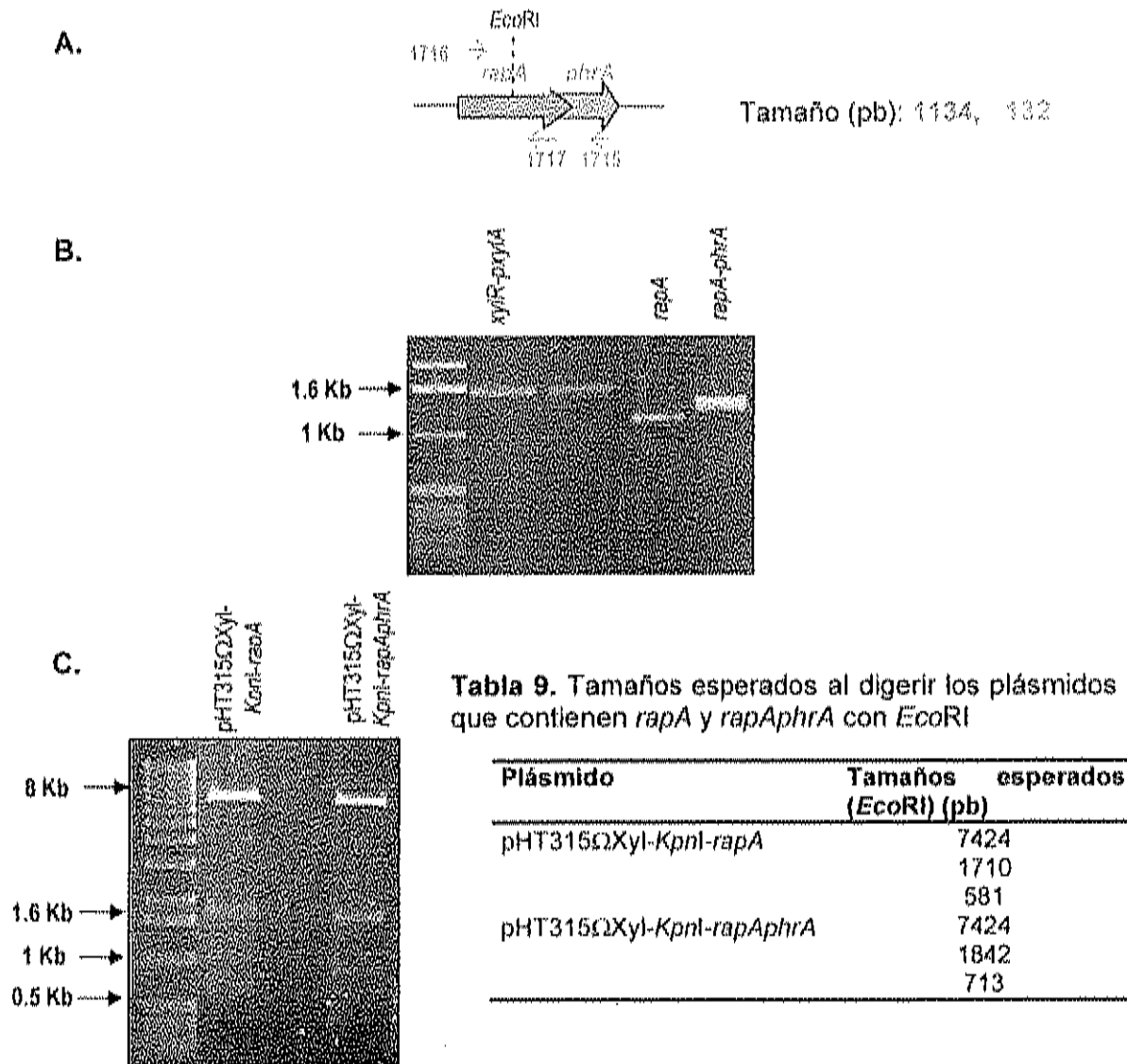


Figura 13. Comprobación de la transformación de *B. thuringiensis* y *B. subtilis* con plásmidos recombinantes; **A.** Oligonucleótidos empleados para la comprobación de la clonación de los genes *rapA* y *rapAphrA* en los diferentes plásmidos. **B.** Productos de PCR. Carril 1: Marcador de peso molecular (DNA Ladder 1 Kb, Invitrogen®); 2: producto de PCR del gen *xyIR* y el promotor del gen *xyIA*; 3: producto de PCR del gen *rapA*; 4: producto de PCR del cassette *rapAphrA*. **C.** Patrón de digestión de los plásmidos pHT315ΩXyl-KpnI-rapA y pHT315ΩXyl-KpnI-rapAphrA con la enzima *EcoRI*. Carril 1: Marcador de peso molecular (1 kb, Invitrogen®); 2: digestión de pHT315ΩXyl-KpnI-rapA; 4: digestión del plásmido pHT315ΩXyl-KpnI-rapAphrA.

8.6 Efecto de la expresión de *rapA* y *rapA-phrA* y del péptido sintético PhrA en la esporulación de *B. subtilis*

Efecto de xilosa y del PhrA sintético sobre el crecimiento y esporulación en *B. subtilis*.

Para *B. subtilis*, además de evaluar si las construcciones o la adición de xilosa tenían algún efecto en el crecimiento de las bacterias, se estudió si había un efecto sobre la expresión del promotor *cry1Aa*, ya que las cepas empleadas tienen una fusión del promotor de *cry1Aa-gusA* integrada al cromosoma. Por tanto, se determinó actividad de β -glucuronidasa antes de que el cultivo entrara a fase estacionaria y al menos 5 horas después de iniciada.

En *B. subtilis* GOB 141: PY79 (pMLK83-2B pHT315 Ω Xyl-*KpnI*) la adición de xilosa y del péptido sintético PhrA al medio no tuvieron efecto sobre el crecimiento en las primeras 4 horas, pero la adición de xilosa disminuyó ligeramente la población durante la fase estacionaria (Figura 14a). Esto se debe a la agregación de las células, que fue observada al microscopio y que afecta la determinación de turbidez. En los cultivos sin xilosa hubo una actividad basal de β -glucuronidasa de 20 unidades Youngman y comenzó a aumentar cuatro horas después del establecimiento de la fase estacionaria. En los cultivos con xilosa la actividad de β -glucuronidasa se mantuvo por debajo del nivel basal (Figura 14b). Es posible que esto se deba a la expresión de un péptido de 30 aminoácidos a partir del extremo NH₂ del promotor *xylA* en el plásmido pHT315 Ω Xyl-*KpnI*, ya que al incorporar el adaptador al plásmido pHT315 Ω Xyl se generó un terminador, este péptido de manera fortuita puede estar interfiriendo con la iniciación de la esporulación y de esta manera evitar la activación del promotor *cry1Aa*.

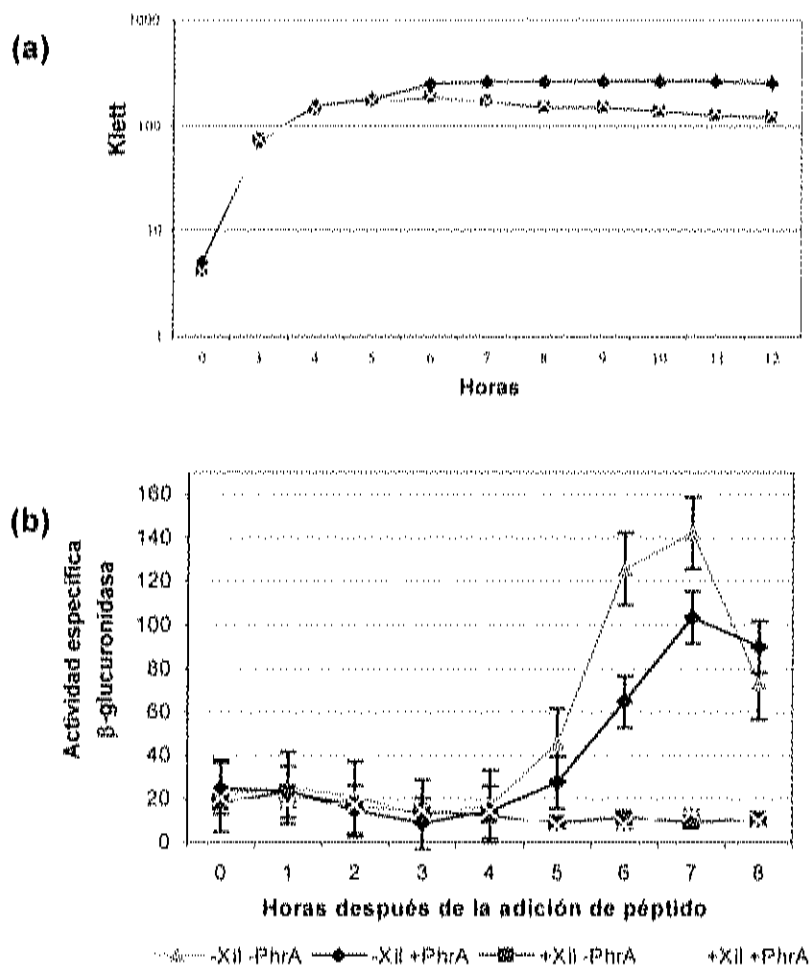


Figura 14. (a) Cinética de crecimiento y (b) expresión de *cry1Aa* de *B. subtilis* GOB 141 (PY79 pMLK83-2B pHT315 Ω Xyl-*KpnI*) en medio de Schaeffer con o sin xilosa (20 μ M) y con o sin el péptido sintético PhrA (100 nM). La actividad específica de β -glucuronidasa está expresada en unidades Youngman=pM/mL cultivo•min.

Para la cepa GOB142 (PY79 pMLK83-2B pHT315 Ω Xyl-*KpnI*-*rapA*) ni la adición de xilosa y ni del PhrA sintético, con la subsecuente expresión de RapA tuvieron efecto en el crecimiento (Figura 15a). Al evaluar la actividad de β -glucuronidasa en esta cepa, tanto en presencia como en ausencia del péptido señal sintético en el medio con xilosa (Figura 15b), se observó que la sobreexpresión de *rapA* no afectó el tiempo en el cuál se inició la esporulación.

Esto concuerda con los resultados obtenidos por Fujita y Losick (2005), en donde la sobreexpresión de la KinA no modificó significativamente los niveles de Spo0A~P, sugiriendo de esta manera un alto nivel de coordinación en el inicio del proceso de esporulación, que no se ve alterado a pesar de la sobreexpresión de algunos de los factores que intervienen dentro de esta red reguladora. Por otra parte, nuestros resultados contrastan con lo señalado por Veening *et al.* (2005), acerca del efecto de RapA en la regulación temporal de esta proteína en el inicio de la esporulación.

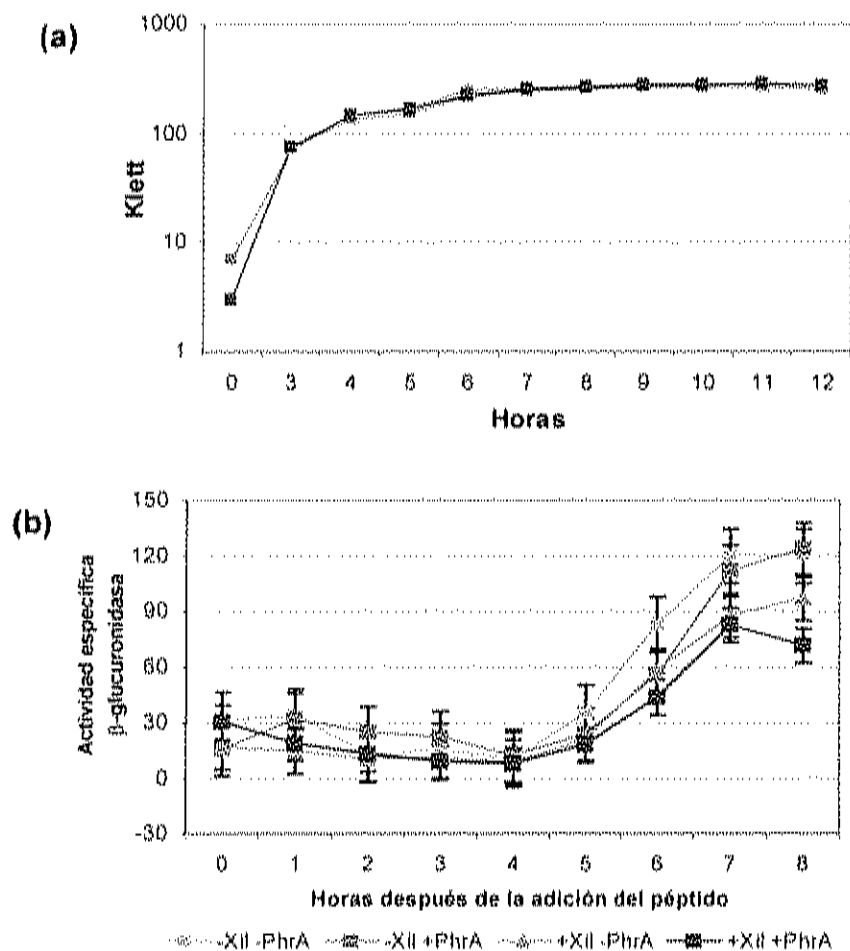


Figura 15. (a) Cinética de crecimiento y (b) expresión de *cry1Aa* de *B. subtilis* GOB142 (PY79 pMLK83-2B pHT315 Ω Xyl-*KpnI*-*rapA*) en medio de Schaeffer con o sin xilosa (20 μ M) y con o sin el péptido sintético PhrA (100 nM). La actividad específica de β -glucuronidasa está expresada en unidades Youngman = pM/mL cultivo \cdot min.

La cepa de *B. subtilis* (GOB143) conteniendo *rapAphrA* alcanzó en todos los casos una densidad celular similar al resto de las cepas evaluadas (Figura 16), aunque la actividad específica de la β -glucuronidasa fue mayor. Este comportamiento es propio de la cepa pues los perfiles de actividad mostrados por la enzima son similares con la adición o no de xilosa al medio; sin embargo, se observa que la inserción del cassette en el plásmido parental rompe el marco de lectura que este presenta y por lo tanto la cepa esporula. En esta cepa no se probó el efecto de la adición de PhrA sintético.

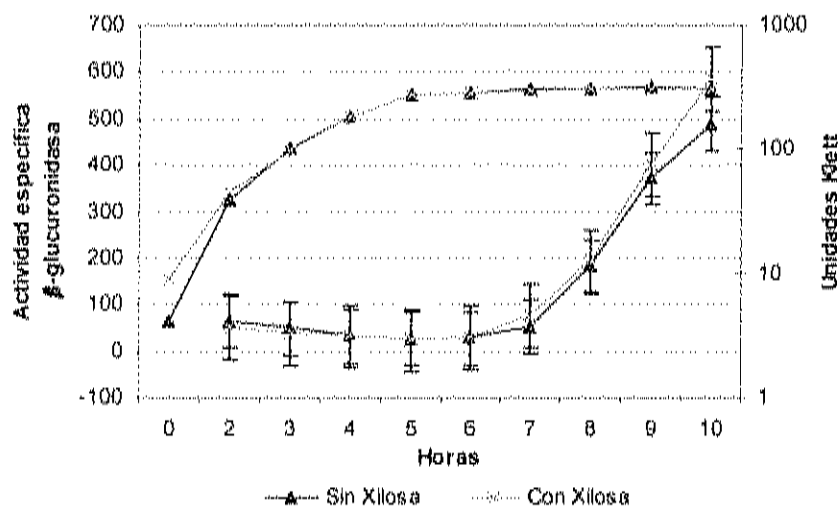


Figura 16. Cinética de crecimiento y expresión de *cry1Aa* de *B. subtilis* GOB143 (PY79 pMLK83-2B pHT315 Ω Xyl-*Kpnt-rapAphrA*) en medio de Schaeffer con o sin xilosa (20 μ M). La actividad específica de β -glucuronidasa está expresada en unidades Youngman = pM/mL cultivo•min.

En la cepa parental (GOB18), libre del plásmido pHT, la adición de xilosa, glucosa, PhrA sintético o la combinación de xilosa y PhrA tampoco modificó el crecimiento (Figura 17).

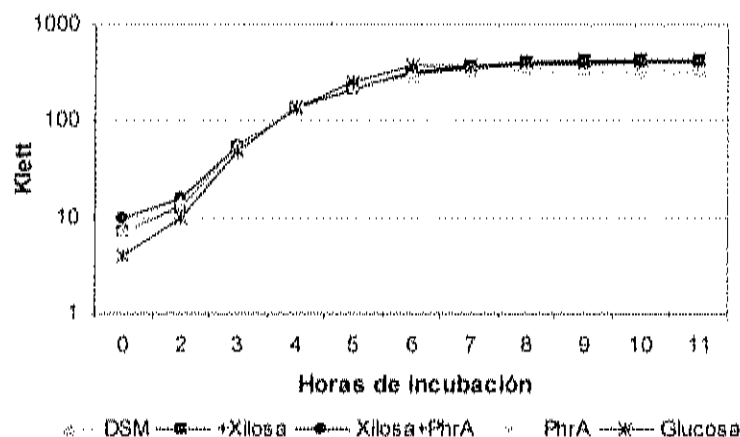


Figura 17. Cinética de crecimiento GOB 17 (*B. subtilis* PY79 pMLK83-2B) en medio Schaeffer (DSM), con xilosa, 20 mM; con xilosa, 20 mM y PhrA sintético, 100 nM; con PhrA sintético, 100 nM y con glucosa, 20 mM.

Al evaluar la actividad de β -glucuronidasa en esta cepa, encontramos que a diferencia de la cepa GOB141, la xilosa no afectó la actividad de β -glucuronidasa. Lo anterior refuerza la suposición de que la cepa GOB141 en presencia de xilosa está expresando algún compuesto que bloquea el inicio del proceso de esporulación e influye directamente en los niveles de expresión del gen reportero (Figuras 14b y 18). En el medio con glucosa se presentan niveles de actividad que no rebasan el nivel basal, sugiriendo la utilización de este carbohidrato por parte de la cepa favoreciendo su crecimiento y retrasando el inicio del proceso de esporulación (Uratani *et al.*, 1983). Por otra parte, la adición de péptido sintético en presencia y ausencia de xilosa incrementa la expresión de β -glucuronidasa; sin embargo, este aumento no es significativo probablemente por una baja actividad del péptido sobre la RapA. Esto coincide con estudios realizados por Core *et al.* (2001), donde al evaluar la adición de péptido PhrA sintético al medio de crecimiento a una concentración de hasta 10 μ M en una cepa PhrA⁻, no fue capaz de alcanzar los niveles de esporulación de la cepa silvestre.

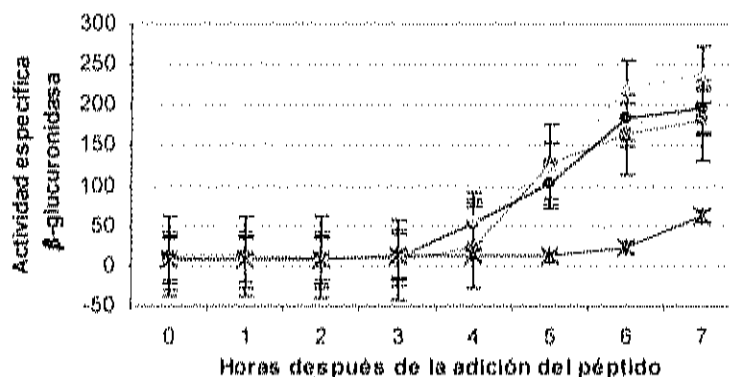


Figura 18. Actividad β -glucuronidasa de la cepa GOB 17 (*B. subtilis* PY79 pMLK83-2B). En medio Schaeffer (DSM \blacktriangle); xilosa, 20 mM (\blacksquare); xilosa, 20 mM y PhrA sintético, 100 nM (\bullet); con PhrA sintético, 100 nM (\blacklozenge); con glucosa, 20 mM (\ast). La actividad específica de β -glucuronidasa está expresada en unidades Youngman = pM/mL cultivo \cdot min.

Eficiencia de esporulación de *B. subtilis*

Para evaluar y comparar el crecimiento y eficiencia de esporulación de las cepas transformadas de *B. thuringiensis* y *B. subtilis* se empleó medio harina de soya diluido (López-y-López y de la Torre, 2004). Se siguieron las cinéticas de crecimiento y la aparición de bacilos esporulados por cuenta directa de las cepas de *B. subtilis*: GOB141 (PY79 pMLK83-2B pHT315 Ω Xyl-Kpnl) y GOB143 (PY79 pHT315 Ω Xyl-Kpnl-rapAphrA) con la adición de xilosa (20 mM) y del péptido señal sintético (Figura 19, Tabla 10). En este caso, se observó nuevamente una agregación de los cultivos a partir del establecimiento de la fase estacionaria, como en el medio Schaeffer (DSM) (Figura 14a), lo que dificultó la cuenta directa de bacilos.

En la cepa GOB141, se comenzaron a observar bacilos esporulados hasta las 20 horas de incubación (bajo las condiciones evaluadas, Figura 19) y la eficiencia de esporulación fue baja con respecto a la que presenta la cepa parental en medios específicos para esporulación (90% en medio DSM).

además el péptido señal sintético adicionado no tuvo efecto (Tabla 10). Estos resultados refuerzan nuevamente la hipótesis de la expresión de un fragmento en el extremo amino del *pxylA* que está interfiriendo con el proceso de esporulación (Figura 14b). Esto contrasta con lo obtenido por Aceves (2005) en donde al determinar la aparición de bacilos esporulados (bajo las mismas condiciones de crecimiento) en la cepa silvestre de *B. subtilis* (PY79) los observa a partir de las 10 hrs. de incubación y la proporción de éstos se incrementa hasta 1.94 veces al adicionar el péptido señal sintético PhrC. Para la cepa GOB143, la sobreexpresión del cassette *rapAphrA* no tuvo efecto sobre la eficiencia de esporulación (Tabla 10). Este hecho contrasta con el comportamiento observado en medio de esporulación para esta cepa (Figura 16) donde la interrupción en el marco de lectura del plásmido restablece el proceso de esporulación, lo que sugiere que el efecto de esta interrupción depende del medio de cultivo empleado.

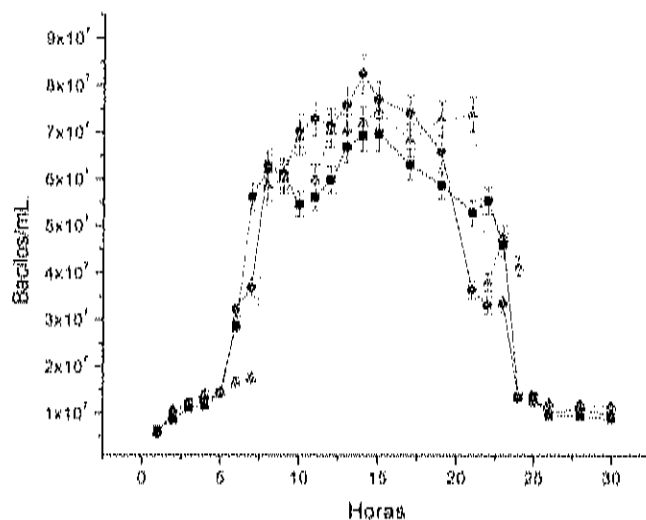


Figura 19. Cinética de crecimiento de *B. subtilis* en medio Harina de soya diluido. (—■—) GOB141 (PY79 pMLK83-2B pHT315Ωxyl-*Kpnl*) con xilosa; (—●—) GOB141 (PY79 pMLK83-2B pHT315Ωxyl-*Kpnl*) con xilosa y péptido; (—▲—) GOB143 (PY79 pMLK83-2B pHT315ΩXyl-*Kpnl-rapAphrA*) con xilosa.

Tabla 10. Eficiencia de esporulación de *B. subtilis*

| Cepa | Condición | % Esporulación |
|--------|-------------|---------------------------|
| GOB141 | + Xil | 10.44 ^a ± 1.24 |
| GOB141 | + Xil +PhrA | 7.64 ^a ± 0.11 |
| GOB143 | + Xil | 9.05 ^a ± 0.26 |

a. Análisis de medias (Prueba de Tukey-Kramer).
Letra igual indica que no existe diferencia significativa a un $\alpha=0.05$.

8.7 Efecto de la expresión de *rapA* y *rapA-phrA* y del péptido sintético PhrA en la esporulación de *B. thuringiensis*

Efecto de las construcciones y de PhrA sintético en el crecimiento de *B. thuringiensis*

En primer lugar se evaluó si las construcciones o la adición de xilosa tenían algún efecto en el crecimiento de las bacterias, para lo cual se realizaron tres pases de cada cepa en su medio de cultivo. La transferencia se hizo cuando el bacilo estaba en fase logarítmica de crecimiento, con el propósito de sincronizar el cultivo. Los resultados para las cepas de *B. thuringiensis* en medio TrisG se muestran en la Figura 20. En ningún caso se presentó una fase lag y ni la adición de xilosa o del péptido sintético PhrA afectaron la cinética de crecimiento de las cepa GOB137 (HD73 pHT315 Ω Xyl-Kpnl) y GOB138 (HD73 pHT315 Ω Xyl-Kpnl-*rapA*) (Figura 20a y 20b). La adición de xilosa tampoco tuvo efecto en GOB 139 (HD73 pHT315 Ω Xyl-Kpnl-*rapAphrA*) (Figura 20c).

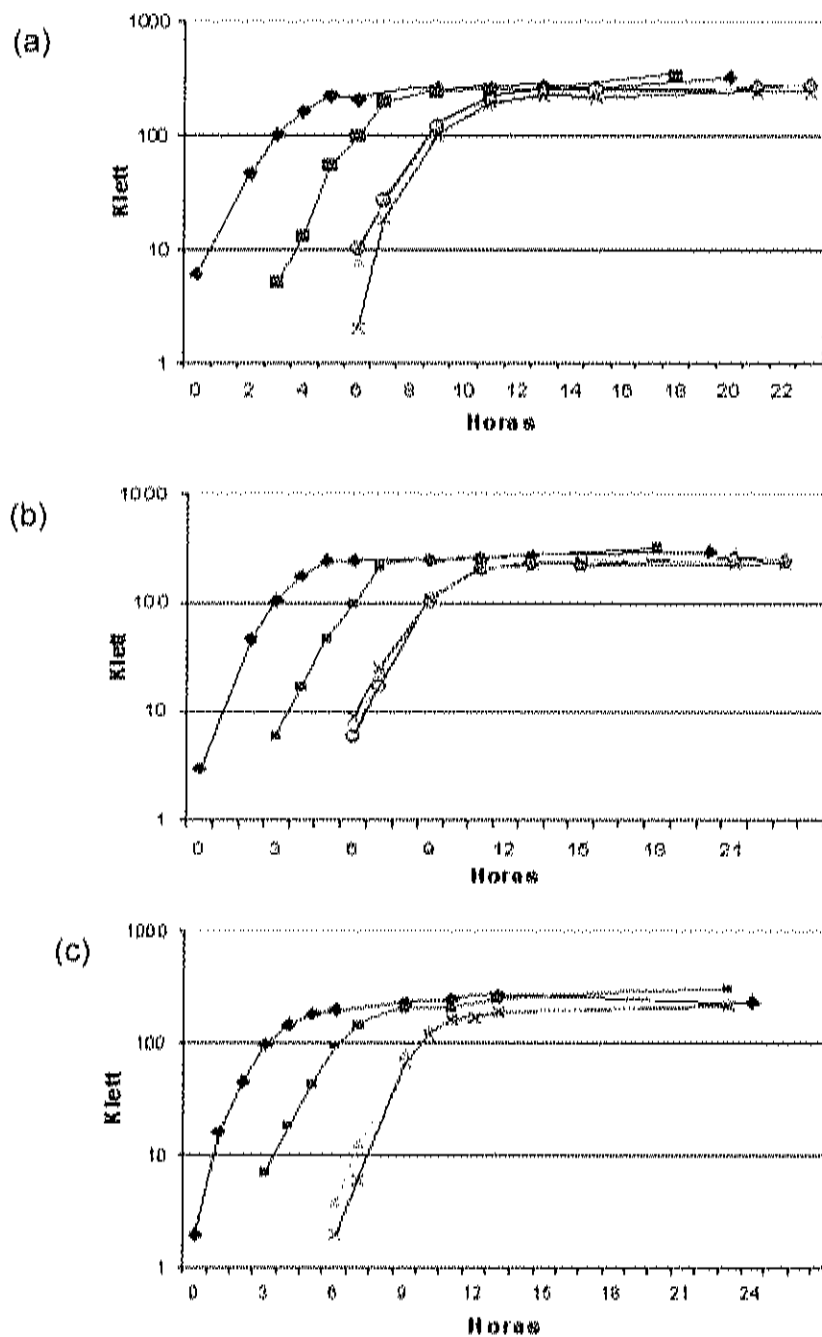


Figura 20. Cinética de crecimiento de las cepas de *B. thuringiensis* en medio TrisG con o sin xilosa (20 μ M) y con o sin péptido señal sintético PhrA (100 nM). (a) GOB137 (HD73 pHT315 Ω Xyl-Kpnl); (b) GOB138 (HD73 pHT315 Ω Xyl-Kpnl-rapA); (c) GOB139 (HD73 pHT315 Ω Xyl-Kpnl-rapAphrA).

- ◆ 1er. pase
- 2do. pase
- ▲ 3er. pase -Xil -PhrA
- 3er. pase -Xil +PhrA
- × 3er. pase +Xil -PhrA
- ◇ 3er. pase +Xil +PhrA

No hay reportes sobre el efecto de la sobreexpresión de proteínas implicadas en la cascada de fosforilación que dirigen el inicio del proceso de esporulación en *B. thuringiensis*. Sin embargo, estudios realizados por Fujita y Losick (2005) en *B. subtilis*, donde inducen la expresión de KinA (proteína implicada también en la cascada de fosforilación) por medio de la adición de IPTG al medio a dos diferentes densidades celulares, el crecimiento de la cepa se modifica. Nosotros no observamos ese efecto a pesar de que la xilosa se adiciona al medio desde el inicio de la incubación del tercer pase.

Eficiencia de esporulación de *B. thuringiensis*

El crecimiento de las cepas de *B. thuringiensis* se evaluó mediante cuenta al microscópio con la adición de xilosa (20 mM) y del péptido señal sintético (100 nM) al medio. Para la cepa GOB137 (HD73 pHT315ΩXyl-Kpnl) no se observó una agregación de células en el cultivo a lo largo del crecimiento bajo las condiciones evaluadas. Sin embargo, la eficiencia de esporulación de esta cepa fue baja (Tabla 11). Este comportamiento sugiere una respuesta similar por parte de *B. thuringiensis* y *B. subtilis* a la expresión del plásmido parental (Figura 21). Al mismo tiempo, la adición de péptido al medio de cultivo no incrementó significativamente el porcentaje de esporulación, sugiriendo que el péptido PhrA sintético no encuentra una proteína Rap ortóloga sobre la cuál actuar. Este efecto es similar al encontrado por Aceves (2005), al evaluar el péptido PhrC (CSF) y encontrar que este no incrementa el porcentaje de esporulación pero sí la liberación de esporas probablemente por la acción de CSF a otros niveles de control, mismos que no podrían ser compartidos por PhrA. En el presente trabajo, la liberación de las esporas se logró hasta las 36 horas de incubación bajo todas las condiciones evaluadas en todas las cepas, 18 hrs. después de lo observado por Aceves (2005). Por su parte, López-y-López y de la Torre (2004), advierten una liberación de esporas en cultivos por lote alimentado para esta misma cepa a las 14 hrs. de incubación.

Para la cepa GOB139 (HD73 pHT315 Ω xyl-*Kpnl*-*rapAphrA*), la interferencia en el marco de lectura del plásmido por la inserción del cassette *rapAphrA* restablece la eficiencia de esporulación en esta cepa y al parecer la expresión de *rapAphrA* no altera el crecimiento, lo que sugiere que el procesamiento y su modo de acción podrían ser similares a los que se presentan en *B. subtilis*. Por otra parte, se apreciaron bacilos esporulados hasta después de las 18 horas de incubación (Figura 21). Este resultado difiere de lo reportado por Aceves (2005) en donde al evaluar la eficiencia de esporulación en *B. thuringiensis* HD1 pHTcry1A2 bajo las mismas condiciones de crecimiento, observó bacilos esporulados a partir de las 10 hrs. de incubación. Las diferencia en tiempo de aparición de los bacilos esporulados y esporas libres sugiere el tiempo en el cual se inicia la esporulación es distinto en ambas cepas probablemente por los plásmidos que contienen.

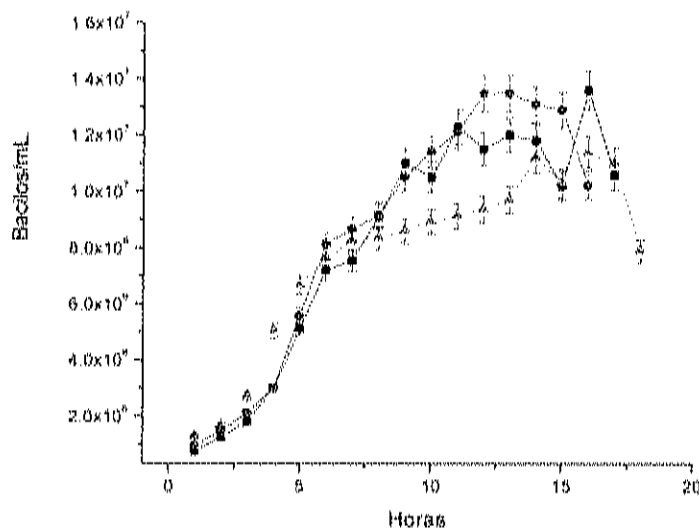


Figura 21. Cinética de crecimiento de *B. thuringiensis* en medio harina de soya diluido. (—■—) GOB137 (HD73 pHT315 Ω Xyl-*Kpnl*) con xilosa; (—●—) GOB137 (HD73 pHT315 Ω Xyl-*Kpnl*) con xilosa y péptido; (—▲—) GOB139 con xilosa (HD73 pHT315 Ω Xyl-*Kpnl*-*rapAphrA*).

Tabla 11. Eficiencia de esporulación de *B. thuringiensis*

| Cepa | Condición | % Esporulación |
|--------|-------------|---------------------------|
| GOB137 | + Xil | 19.33 ^a ± 2.22 |
| GOB137 | + Xil +PhrA | 30.11 ^a ± 2.99 |
| GOB139 | + Xil | 67.29 ^b ± 8.61 |

a, b. Análisis de medias (Prueba de Tukey-Kramer). Letra diferente señala la existencia de diferencia significativa a un $\alpha=0.05$.

Las diferencias en el crecimiento y en la eficiencia de esporulación, así como en la respuesta a inductores de esporulación como decoyinina observado entre *B. subtilis* y *B. thuringiensis*, nos sugiere que el sistema de transducción de señales que intervienen en el establecimiento del proceso de esporulación presenta diferentes niveles de control en ambas especies. Por otra parte, el comportamiento observado en las cepas de *B. subtilis* y *B. thuringiensis* que inclúan el plásmido pHT315 Ω Xyl-*Kpnt*, pudiera deberse a varias causas, por ejemplo, un procesamiento diferencial de péptidos entre microorganismos. Estas diferencias fisiológicas, refuerzan los análisis bioinformáticos realizados por Anderson *et al.* (2005), en donde señalan que tanto las proteínas involucradas en el procesamiento de información como el sistema de transducción de señales del grupo *cereus* en donde se incluye *B. thuringiensis* presenta diferencias importantes con *B. subtilis*.

IX. CONCLUSIONES

El análisis filogenético de las fosfatasa que participan en el inicio de esporulación en *B. subtilis* y *B. thuringiensis* mostró diferencias importantes que sugieren una coordinación diferente a este nivel entre especies.

La decoyinina y el ácido micofenólico, inductores de la esporulación en *B. subtilis* no tuvieron efecto en *B. thuringiensis* poniendo en evidencia diferencias fisiológicas entre especies.

Tanto en *B. thuringiensis* como en *B. subtilis*, la eficiencia de esporulación no aumentó por la adición de PhrA sintético al medio sugiriendo que en *B. subtilis* un incremento de los niveles de PhrA no tiene efecto y que en *B. thuringiensis* probablemente no existe una Rap ortóloga sobre cual pueda actuar.

La baja eficiencia de esporulación observada en las cepas de *B. thuringiensis* y *B. subtilis* que inclulan el plásmido parental (pHT315 Ω Xyl-Kpnl) interfirió con el efecto de los genes clonados y del PhrA sintético tanto en *B. thuringiensis* como en *B. subtilis* por lo cuál las conclusiones obtenidas están sujetas a confirmación en construcciones que no expresen el fragmento corriente abajo del promotor de *xyIA*. Por lo anterior, no fue posible aceptar o rechazar la hipótesis planteada.

X. PERSPECTIVAS

- Evaluar la secuencia del plásmido pHT315 Ω Xyl-KpnI y determinar que se está expresando corriente abajo del promotor de xilosa que está provocando que se bloquee el inicio en la esporulación de la cepa GOB141.
- Establecer las condiciones para evaluar el procesamiento y acción de péptidos señal de *B. thuringiensis*, es decir, trabajar con cepas mutantes, carentes de los genes que codifican para los diferentes controles que actúan al inicio del proceso de esporulación.

X. REFERENCIAS

- Aceves, Angel E., M. 2005. Aislamiento de péptidos señal putativos de *Bacillus thuringiensis* y estimulación de la esporulación por los pentapéptidos NprRB y CSF. Tesis Maestría. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo.
- 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. e Ivanova, N. 2005. Comparative genome analysis of *Bacillus cereus* group genomes with *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol. Lett. **250**:175-184.
- Arantes, O. y Lereclus, D. 1991. Construction of cloning vectors of *Bacillus thuringiensis*. Gene. **108**:115-119.
- Aronson, A. I., Angelo, N. y Holt, S. C. 1971. Regulation of extracellular protease production in *Bacillus cereus* T: Characterization of mutants producing altered amounts of protease. J. Bacteriol. **106**:1016-1025.
- Aronson, A. 2002. Sporulation and δ -endotoxin synthesis by *Bacillus thuringiensis*. Cell. Mol. Life Scien. **59**:417-425.
- Bacon-Schneider, K., Palmer, T. M. y Grossman, A. D. 2002. Characterization of *comQ* and *comX*, two genes required for production of ComX pheromone in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. **184**:410-419.
- Bassler, B. L. 2002. Small talk: Cell-to-cell communication in bacteria. Cell. **109**:421-424.

-
- Bijlsma, J. J. E. y Groisman, A. E. 2003. Making informed decisions: regulatory interactions between two-component systems. *Trends in Microbiology*. **11**:359-366.
- Bone, E. J. y Ellar, D. J. 1989. Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **58**:171-178.
- Brunsing, R. L., La Clair, C., Tang, S., Chiang, C., Hancock, L. E., Perego, M. y Hoch, J. A. 2005. Characterization of sporulation Histidine Kinases of *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* **187**:6972-6981.
- Core, L. J., Ishikawa, S. y Perego, M. 2001. A free terminal carboxylate group is required for PhrA pentapeptide inhibition of RapA phosphatase. *Peptides*. **22**:1549-1553.
- DeLisa, M. P. y Bentley, W. E. 2002. Bacterial autoinduction: looking outside the cell for new metabolic engineering targets. *Microbial Cell Factories*. **1**:5.
- Dunny, G. M. y Leonard, B. A. B. 1997. Cell-cell communication in Gram-positive bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**:527-564.
- Ellar, D. J. 1997. The structure and function of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins and prospects for biopesticide improvement. In BCPC Symposium Proceedings. No. 68: Microbial Insecticides: Novelty or Necessity? The British Crop Protection Council.
- Federle, M. J. y Bassler, B. L. 2003. Interspecies communication in bacteria. *J. Clin. Invest.* **112**:1291-1299.
- Fujita, M. y Losick, R. 2003. The master regulator for entry into sporulation in *Bacillus subtilis* becomes a cell-specific transcription factor after asymmetric division. *Genes & Development*. **17**:1166-1174.
- Fujita, M. y Losick, R. 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**:2236-2244.

-
- Glare, T. R., y O'Callaghan, M. 2000. *Bacillus thuringiensis*: Biology, ecology and safety. John Wiley and sons, Ltd. New York,
- Grandvalet, C., Gominet, M. y Lereclus, D. 2001. Identification of genes involved in the activation of the *Bacillus thuringiensis inhA* metalloprotease gene at the onset of sporulation. *Microbiol.* **147**:1805-1813.
- Harwood, C. R. y Cutting, S. M. 1990. Molecular Biological Methods for *Bacillus*. John Wiley and sons, West Sussex, England. 391-419.
- Hoch, J. A. 1993. Regulation of the phosphorelay and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**:441-465.
- Jiang, M., Grau, R. y Perego, M. 2000. Differential processing of propeptide inhibitors of Rap phosphatases in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **182**:303-310.
- Kanamaru, K., Stephenson, S. y Perego, M. 2002. Overexpression of PepF oligopeptidase inhibits sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **184**:43-50.
- Karow, M. L. y Piggot, P. J. 1995. Construction of *gusA* transcriptional fusion vectors for *Bacillus subtilis* and their utilization for studies of spore formation. *Gene.* **163**:69-74.
- Kunst, F., Ogassawara, N., Moszer, I., Albertini, A. M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M. G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., Borris, R., Etc. 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature.* **390**:249-256.
- Lazazzera, B., Solomon, J. M. y Grossman, A. D. 1997. An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *B. subtilis*. *Cell.* **89**:917-925.
- Lazazzera, B. 2001. The intracellular function of extracellular signaling peptides. *Peptides.* **22**:1519-1527.

-
- Lecadet, M., Blondel, M. O. y Ribier, J. 1980. Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. *berliner* 1715 using bacteriophage CP54Ber. *J. Gen. Microbiol.* **121**:203-212.
- Lereclus, D., H. Agaisse, M. Gominet, and J. Chhaufaux. 1995. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* *spoA* mutant. *Biotechnology* **13**:67-71
- Lereclus, D., Agaisse, H., Grandvalet, C., Salmitou, S. y Gominet. 2000. Regulation of toxin and virulence gene transcription in *Bacillus thuringiensis*. *Int. J. Med. Microbiol.* **290**:295-299.
- López-y-López, V. E. y de la Torre, M. 2005. Redirection of metabolism during nutrient feeding in fed-batch cultures of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**:254-60.
- Masson, L. Préfontaine, G. y Brousseau, R. 1989. Transformation of *Bacillus thuringiensis* vegetative cells by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **60**:273-280.
- Mitani, T., Heinze, J. E. y Freese, E. 1977. Induction of sporulation in *Bacillus subtilis* by decoyinine or hadacidin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **77**:1118-1125.
- Olmedo, G., Gottlin Ninfa, E., Stock, J. and Youngman, P. 1990. Novel mutations that alter the regulation of sporulation in *Bacillus subtilis*: Evidence that phosphorylation of regulatory protein Spo0A controls the initiation of sporulation. *J. Mol. Biol.* **215**:359-372.
- Perego, M. 1997. A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**:8612-8617.
- Petranovic, D., Guédon, E., Sperandio, B., Delorme, C., Ehrlich, D. y Renault, P. 2004. Intracellular effectors regulating the activity of the *Lactococcus lactis* CodY pleiotropic transcription regulator. *Mol. Microbiol.* **53**:613-621.

-
- Phillips, Z. E. V. y Strauch, M. A. 2002. *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cell. Mol. Life Sci.* **59**:392-402.
- Pottathil, M. y Lazazzera, B. 2003. The extracellular Phr peptide-*rap* phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Bioscience*, **8**: 32-45.
- Priest, F. G. 1993. Systematics and Ecology of *Bacillus*. En *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. Biochemistry, Physiology and Molecular Genetics. American Society for Microbiology. Washington, D. C.
- Quisel, J. D., Burkholder, W. F. y Grossman, A. D. 2001. In vivo effects of sporulation kinases on mutant Spo0A proteins in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **183**:6573-6578.
- Ringquist, S. y Smith, C. L. 1992. The *Escherichia coli* chromosome contains specific, unmethylated *dam* and *dcm* sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**:4539-4543.
- Ramírez-Prado, J. H. 2004. Análisis de los elementos que actúan en *cis* para modular la estabilidad del gen *cry1Aa* de *Bacillus thuringiensis* en *Bacillus subtilis*. Tesis de doctorado, Cinvestav-Unidad Irapuato. (En prensa).
- Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**:5463-5467.
- Sambrook, J. y Russell, D. W. 2001. Molecular cloning. A Laboratory Manual. 3rd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schauder, S. y Bassler, B. L. 2001. The languages of bacteria. *Genes & Development.* **15**:1468-1480.
- Schurter, W., Geiser, M. y Mathé, D. 1989. Efficient transformation of *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* via electroporation: transformation

-
- of acrySTALLIFEROUS strains with a cloned delta-endotoxin gene. *MGG*. **218**:177-181.
- Shih, N. y Labbé, R. G. 1996. Sporulation-promoting ability of *Clostridium perfringens* culture fluids. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**:1441-1443.
- Slamti, L. y Lereclus, D. 2002. A cell-cell signaling peptide activates the PlcR virulence regulon in bacteria of the *Bacillus cereus* group. *The EMBO Journal*. **21**:4550-4559.
- Slamti, L. y Lereclus, D. 2005. Specificity and polymorphism of PlcR-PapR quorum-sensing system in the *Bacillus cereus* group. *J. Bacteriol.* **187**:1182-1187.
- Solomon, J. M., Lazazzera, B. A. y Grossman, A. D. 1996. Purification and characterization of an extracellular peptide factor that affects two different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes & Development*. **10**:2014-2024.
- Sthephenson, S., Mueller, C., Jiang, M. y Perego, M. 2003. Molecular analysis of Phr peptide processing in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **185**:4861-4871.
- Stragier, P. y Losick, R. 1996. Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Genet.* **30**:297-341.
- Sturme, M. H. J., Kleerebexem, M., Nakayama, J., Akkermans, A. D. L., Vaughan, E. E. y de Vos, W. M. 2002. Cell to cell communication by autoinducing peptides in Gram-positive bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. **81**:233-243.
- Taga, M. E. y Bassler, B. L. 2003. Chemical communication among bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**:14549-14554.
- Tjalsma, H., Kiewiet, R., Kuipers, O. P., Kolkman, M., van der Laan, J., Daskin, R., Ferrari, E. y Bron, S. 2004. Engineering of quorum-sensing systems for improved production of alkaline protease by *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Microbiol.* **96**:569-578.

-
- Tortosa, P., Logsdon, L., Kraigher, B., Itoh, Y., Mulec, M. I. y Dubnau, D. 2001. Specificity and genetic polymorphism of the *Bacillus* competence quorum-sensing system. *J. Bacteriol.* **183**:451-460.
- Uratani, B., López, J. M. y Freese, E. 1983. Effect of decoyinine on peptidoglycan synthesis and turnover in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **154**:261-268.
- Veening, J.-W., Hamoen, L. W. y Kuipers, O. P. 2005. Phosphatases modulate the bistable sporulation gene expression pattern in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **56**:1481-1494.
- Zeigler, D. R. 1999. *Bacillus* genetic stock center catalog of strains. 7th Ed. Part 2: *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. The *Bacillus* Genetic Stock Center Department of Biochemistry. The Ohio State University. 6.

C) *Subclonación en el vector pCRII[®] TOPO[®] (Invitrogen[®])*

Mezcla de reacción:

- 1 μ L de producto de PCR
- 1.5 μ L de H₂O estéril
- 1 μ L de solución salina
- 0.5 μ L de vector pCRII[®] TOPO[®] (10 ng/ μ L)

1. Incubar a temperatura ambiente por 5 min y colocar en baño de hielo.
2. Transformar 2 μ L de cada reacción en tubos eppendorf con células competentes (*E. coli* Top10).
3. Incubar en baño de hielo de 5 a 30 min.
4. Aplicar tratamiento térmico 2 min a 42°C. Inmediatamente transferir a baño de hielo.
5. Adicionar 1 mL de medio LB e incubar a 37°C con agitación suave (200 rpm) durante 1 hr.
6. Sembrar con varilla de vidrio 100 μ L de cultivo en cajas con medio LB con X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosido) más el antibiótico de selección.
7. Incubar toda la noche a 37°C.

D) *Transformación de E. coli Top10 y E. coli NK5772 dam⁻ dcm⁻ recA⁺ (Sambrook y Russell, 2001)*

1. Transferir 200 μ L de suspensión de células competentes tratadas con CaCl₂ (0.1 M). Adicionar el DNA plasmídico (en una concentración no mayor de 50 ng en un volumen de 10 μ L o menor). Mezclar el contenido del tubo invirtiendo el tubo eppendorf suavemente. Almacenar los tubos en baño de hielo por 30 min.
2. Someter a choque térmico de 42°C por 1.5 min.
3. Rápidamente incubar nuevamente en baño de hielo por 2 minutos
4. Adicionar 800 μ L de medio LB. Incubar por 45 minutos a 37°C con agitación continua (50 ciclos/ minuto).
5. Transferir un volumen apropiado (de hasta 200 μ L por placa de 90 mm) de las células transformadas en medio de cultivo conteniendo el antibiótico de selección a la concentración que se requiera.

E) *Purificación de plásmidos por el método de lisis alcalina (Birnboim-Doly modificada)*

| Solución I Birnboim-Doly | Conc. final |
|--------------------------|-------------|
| Tris-HCl (pH 8.0) | 25 mM |
| EDTA | 10 mM |

| | |
|---------|----------|
| Glucosa | 50 mM |
| RNasa A | 20 µg/mL |

Conservar esta solución a 4°C.

Solución II

| | |
|------------|-------|
| NaOH 1N | 0.2 N |
| SDS al 10% | 1.0% |

Preparar esta solución al momento de utilizarse.

Solución III

| | |
|--------------------------|-------------|
| Acetato de potasio | 3 M, pH 5.2 |
| Ácido acético glacial | 11.5 mL |
| Agua desionizada estéril | 28.5 mL |

Conservar esta solución a 4°C.

1. Se estría la cepa deseada en cajas con medio LB más antibiótico y se incuba a 37°C toda la noche.
2. Se toma una colonia y se siembra en 3 mL de LB líquido más antibiótico y se incuba toda la noche a 37°C a 200 rpm.
3. Se toman 1.5 mL del cultivo y se centrifuga a 13000 rpm por 2 minutos a temp. ambiente.
4. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el paquete celular en 150 µL de la solución I.
5. Adicionar 300 µL de la solución II. Mezclar el contenido del tubo por inversión aproximadamente 10 veces o hasta que se lisen eficientemente las bacterias y la suspensión sea transparente.
6. Dejar incubar en hielo por 3 minutos y adicionar 300 µL de la solución III.
7. Se agita suavemente y se precipita el DNA adicionando 0.7 volúmenes de isopropanol frío.
8. Centrifugar a 13000 rpm por 20 minutos.
9. La pastilla se lava con etanol frío al 75% y se seca a 65°C durante 3 minutos.
10. Resuspender en una cantidad considerable de agua desionizada estéril o solución amortiguadora TE.

F) Secuencia de los plásmidos *pHT315ΩXyl-KpnI-rapA*, *pHT315ΩXyl-KpnI-rapAphrA*.

pHT315ΩXyl-KpnI-rapA

Parte del ORF *xylA*

atg gct caa tct cat tcc agt tca atc aac tat ttt ccg agc gca aac aaa gtg gtt tac gaa gga tcc

| | | |
|------------------------|----|------|
| Parte del PCRIT@ TOPO@ | SD | rapA |
|------------------------|----|------|

act agt aac ggc cgc cag tgt gct gga att cgc cct tta agg agg aat tga gg atg ttg agg atg aag cag
 acg att ccg tcc tct tat gtc ggg ctt aaa att aat gaa tgg tat act cat atc cgg cag ttc cac gtc gct gaa
 . nnn...acc ttt caa ttt ctt gas gas cat aig ctg tat cct tat att gaa gag ctg gcg cat gat gct gcc caa
 ttc tat ata gaa aac gga cag ccc gaa aaa gca ctt tca ttt tat gag aaa atg gtg cac gca caa aaa caa
 atc cag aga gga gal tgt tta tat gaa atc taa atg gal gtc agg ttt gtt gct cgt tgc

| |
|------------------------|
| Parte del PCRIT@ TOPO@ |
|------------------------|

pHT315QXyl-KpnI-rapAphrA

| |
|--------------------|
| Parte del ORF XvIA |
|--------------------|

atg gct caa tct cat tcc agt tca atc aac tat ttt ccg agc gca aac aaa gtg gtt tac gaa gga tcc

| | | |
|------------------------|----|------|
| Parte del PCRIT@ TOPO@ | SD | rapA |
|------------------------|----|------|

act agt aac ggc cgc cag tgt gct gga att cgc cct tta agg agg aat tga gg atg ttg agg atg aag cag
 ata gaa aac gga cag ccc gaa aaa gca ctt tca ttt tat gag aaa atg gtg cac gca caa aaa caa atc

| | |
|-------------|------|
| Fin de rapA | shrA |
|-------------|------|

cag aga gga gal tgt tta tat gaa atc taa atg gal gtc agg ttt gtt gct cgt tgc ggt cgg gtt cag ctt tac

tca ggt gat ggt tca tcc agc taa aac agc aaa cac aas agc gaa aac att tca tat tcc gcc aca caa

| |
|------------------------|
| Parte del PCRIT@ TOPO@ |
|------------------------|

tca aac atg atg cat aaa aaa aga ccc tta ggg gtc ttt ttt att tct tca gct tcc att ctt tta tgg tca gct cag

| |
|----------------------|
| Parte del pHT315QXyl |
|----------------------|

aag atc cac ttg cca cca g

G) Transformación de *B. thuringiensis* por electroporación (BAF Laboratory)

Preparación de células competentes.

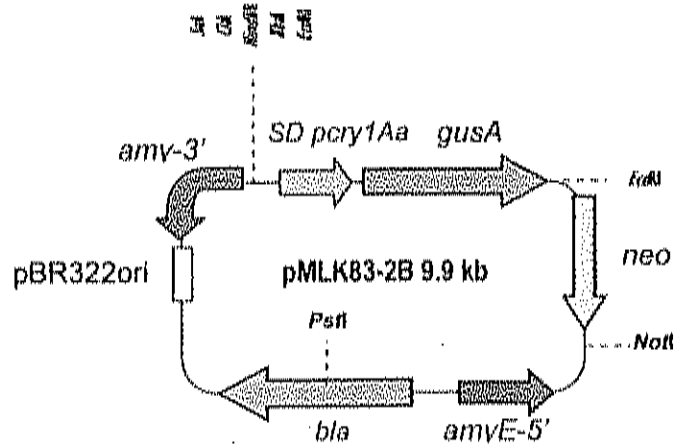
1. De un cultivo de *B. thuringiensis* incubado a 30°C toda la noche en caja con medio infusión cerebro corazón (BHI), tomar una colonia aislada y resuspender en 10 mL de medio líquido BHI.
2. Deje crecer el cultivo por 12 horas a 30°C/250 rpm.
3. Incubar el cultivo en hielo por 10 min.
4. Centrifugar las células a 1000 x g por 10 min. a 4°C.
5. Lavado: 1000 x g por 10 min. (tres veces) a 4°C usando H₂O fría bidestilada estéril.
6. Resuspender el pellet en 1 mL de PEG 6000 (polipropilenglicol) al 40% (w/v) frío.
7. Incubar las células por 10 min. en baño de hielo.

- Hacer alícuotas de 300 μ L usando tubos eppendorf de 1.5 mL. Congelar rápidamente en N₂ líquido o mediante inmersión en baño de hielo seco/etanol y almacenar a -70°C.

Transformación

- Descongelar en baño de hielo las células y adicionar de 2 a 5 μ L de DNA plasmídico y mezclar.
- Transferir la mezcla en una cubeta de electroporación de 0.2 cm.
- Aplicar un pulso: 2.3 kV, 475 Ω , 25 μ F.
- Adicionar la mezcla en 3 mL de medio BHI líquido e incubar a 1 h a 37°C con agitación suave.
- Dividir el cultivo en partes iguales y centrifugar a 3000 rpm por 3 min.
- Decantar el sobrenadante y salvar 200 μ L en cada tubo.
- Plaquear toda la muestra en cajas con medio BHI más el antibiótico.
- Incubar por al menos 24 hrs. a 28°C.
- Rescatar las colonias transformantes en medio BHI más el antibiótico.

H) Estructura del plásmido pMLK83-2B de la cepa de *Bacillus subtilis* (Karow & Piggot, 1995; Ramírez-Prado, 2004).



I) Transformación de *Bacillus subtilis* (Harwood y Cutting, 1990) (Procedimiento en dos pasos)

Preparación de células competentes

- Estriar en cajas con medio LB o TBAB la cepa de *Bacillus subtilis* e incubar toda la noche a 30°C.
- Tomar por asada varias colonias aisladas e inocular 20 mL de medio SpC fresco precalentado, para alcanzar una DO₆₀₀ de 0.5.

-
3. Incubar el cultivo a 37°C con vigorosa agitación y determinar su DO₆₀₀ a diferentes periodos de tiempo.
 4. Cuando la velocidad de crecimiento no presente diferencia en densidad celular en un período de 20-30 min (por lo general, cuando se ha alcanzado la fase exponencial), inocular 200 mL de medio SpII precalentado con 2 mL de cultivo y continuar la incubación a 37°C y baja aeración.
 5. Después de 90 minutos de incubación (que cuando se trabaja con cepas sensibles a temperatura, el tiempo de incubación es mayor), centrifugar el paquete celular (8000g, 5 min) a temperatura ambiente.
 6. Decantar el sobrenadante en un contenedor estéril y guardar.
 7. Resuspender el paquete celular con 18 mL del sobrenadante rescatado en el paso anterior y adicionar 2 mL de glicerol y mezclar cuidadosamente.
 8. Alicuotar las células competentes (0.5 mL) en tubos eppendorf estériles, congelar rápidamente en N₂ líquido o mediante inmersión en baño de hielo seco/etanol y almacenar a -70°C.

Transformación

1. Alicuotar en tubos eppendorf 250 µL de células competentes.
2. Inmediatamente, adicionar un volumen de SpII + EGTA y mezclar.
3. Adicionar el DNA plasmídico (concentración no mayor de 20 ng/mL) e incubar a 37°C/200 rpm/25 min.
4. Transferir un volumen apropiado (de hasta 200 µL por placa de 90 mm) de las células transformadas en medio de cultivo conteniendo el antibiótico de selección a la concentración que se requiera.

J) Ensayo de resistencia térmica (Harwood & Cutting, 1990)

1. Remover una muestra a partir del cultivo a intervalos de tiempos a lo largo del proceso de esporulación y diluya serialmente en solución amortiguadora de fosfato de potasio (10 mM) conteniendo 50 mM de KCl y 1mM de MgSO₄. Sembrar por duplicado 0.1 mL de las diluciones en agar LB.
2. Someter a tratamiento térmico las diluciones de 80°C por 20 min.
3. Volver a sembrar 0.1 mL de las diluciones en agar LB.
4. Incubar ambos juegos de cajas por toda la noche a 37°C. Determinar la cuenta viable.

Nota: las condiciones que se señalan en esta técnica fueron modificadas para el crecimiento óptimo de *B. thuringiensis*.

K) Ensayo de β -glucuronidasa para *Bacillus subtilis*

Obtención de los paquetes celulares

1. Estriar la(s) cepa(s) en cajas con medio LB con el antibiótico de resistencia correspondiente. Incubar a 37°C de 12 a 18 horas.
2. Usar estas cepas para inocular medio DSM (en matraces nefelométricos a una densidad de 5-10 unidades Klett. Incubar a 37°C, con agitación
3. Cada hora, tomar una alícuota de los cultivos y congelarlas inmediatamente en N₂ líquido. (Para fusiones de baja expresión tomar 500 μ L y para fusiones de alta expresión 100 μ L).

Ensayo de actividad de β -glucuronidasa.

(VersaFluor™ BIO-RAD No. 170-2420)

Nota: realizar los ensayos en lotes de 12-16 muestras.

1. Descongelar las alícuotas justo antes de ser utilizada, en agua fría. Empaquetar las células por centrifugación (máxima velocidad 30-60 s en una microcentrifuga de mesa). Cuidadosamente eliminar el sobrenadante por succión con una micropipeta (no decantar).
2. Resuspender los paquetes en regulador AB, de acuerdo a la actividad esperada.
 - Para baja actividad resuspender un quinto del volumen original.
 - Para actividad moderada resuspender en el volumen original.
 - Para alta actividad diluir resuspendiendo en un décimo del volumen original.
3. Transferir 50 μ L de las muestras celulares resuspendidas a tubos eppendorf. Iniciar los ensayos adicionando a cada tubo 10 μ L de solución de 4-metilumbeliferona- β -glucuronido (0.4 mg/mL de MUG, disuelto en DMSO). Como blanco, procesar una muestra usando 50 μ L de buffer AB.
4. Después de incubar por 100 min. a 37°C, detener la reacción tomando 50 μ L de cada ensayo y colocándolos en tubos eppendorf, cada uno con 980 μ L de regulador AB frío. Mezclar bien en vórtex e inmediatamente leer su fluorescencia. Mantener en hielo y obscuridad.

Regulador AB

| | |
|--------|---------------------------------|
| 60 mM | K ₂ HPO ₄ |
| 40 mM | KH ₂ PO ₄ |
| 100 mM | NaCl |

$$U = \frac{(\text{lectura del fluorómetro})(1000)(2/1000)(60/50)}{(\text{Densidad óptica})(\text{ml. de alícuota})(100 \text{ min.})}$$

Densidad óptica = Unidades Klett/500 (para *Bacillus sp.*)

$\lambda_{excitación} = 366 \text{ nm}$

$\lambda_{emisión} = 445 \text{ nm}$

L.) Medios de cultivo empleados

Medio LB (Luria-Bertrani)

Por litro:

A 950 mL de H₂O desionizada, adicionar:

| | |
|----------------------|--------|
| Triptona | 10.0 g |
| Extracto de Levadura | 5.0 g |
| NaCl | 10.0 g |

Medio Schaeffer (DSM)

(para un litro de medio)

| | |
|---|-----------|
| 16 g. Difco | |
| 2.0 g. KCl | |
| 0.5 g. MgSO ₄ •H ₂ O | |
| 1.0 mL. Ca (NO ₃) ₂ | [1M] |
| 1.0 mL MnCl ₂ •4H ₂ O | [0.1M] |
| 1.0 mL FeSO ₄ | [1mM] |
| 2.0 mL. Glucosa | [50% w/v] |

Medio TrisG

(Para un litro de medio)

| | |
|---|---------|
| H ₂ O | 865 mL. |
| CaCl ₂ •H ₂ O(0.8%) | 10 mL. |
| Mezcla de sales (0.5 X) | 20 mL. |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ (20%) | 10 mL. |
| Glucosa (20%) | 10 mL. |
| Tris pH 7.5 (1M) | 50 mL. |
| K ₂ HPO ₄ (5%) | 10 mL. |
| Extracto de levadura (10%) | 15 mL. |
| pH _{final} = 7.4 | |

Mezcla de sales 1X (10 mL)

| | |
|--------------------------------------|--------|
| FeSO ₄ •7H ₂ O | 0.025% |
| CuSO ₄ •5H ₂ O | 0.05% |
| ZnSO ₄ •7H ₂ O | 0.05% |
| MnSO ₄ •H ₂ O | 0.5% |
| MgSO ₄ | 2% |

Medio Harina de Soya diluido

(para un litro)

| | |
|-------------------------------|----------|
| Glucosa | 2.35 g. |
| Harina de soya | 1.375 g. |
| Extracto de levadura | 0.35 g. |
| Sólidos de cocimiento de maíz | 0.45 g. |

| | |
|--|-----------|
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 0.1 mg. |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | 0.375 mg. |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 0.25 mg. |
| MnSO ₄ ·H ₂ O | 2 mg. |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 10 mg. |
| CoCl ₂ | 1.5 mg. |
| KCl | 150 mg. |
| H ₃ PO ₄ (85% w/v) | 0.35 mL. |
| Antiespumante Mazu DF | 0.15 mL. |
| pH _{final} = | 7.4 |

Medio Harina de Soya diluido

(para un litro)

| | |
|-------------------------------|----------|
| Glucosa | 2.35 g. |
| Harina de soya | 1.375 g. |
| Extracto de levadura | 0.35 g. |
| Sólidos de cocimiento de maíz | 0.45 g. |

| | |
|--|-----------|
| FeSO ₄ •7H ₂ O | 0.1 mg. |
| CuSO ₄ •5H ₂ O | 0.375 mg. |
| ZnSO ₄ •7H ₂ O | 0.25 mg. |
| MnSO ₄ •H ₂ O | 2 mg. |
| MgSO ₄ •7H ₂ O | 10 mg. |
| CoCl ₂ | 1.5 mg. |
| KCl | 150 mg. |
| H ₃ PO ₄ (85% w/v) | 0.35 mL. |
| Antiespumante Mazu DF | 0.15 mL. |
| pH _{final} | = 7.4 |