

00346

8  
21



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

## ANALISIS GENETICO DE LA CITOCROMO OXIDASA $caa_3$ DE BACILLUS THURINGIENSIS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)

P R E S E N T A

FERNANDO HERNANDEZ SANCHEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOSE EDGARDO ESCAMILLA MARVAN

MEXICO, D.F.

1999.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

27741A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**Este trabajo se realizó en el laboratorio 101 oriente del Instituto de Fisiología Celular  
de la Universidad Nacional Autónoma de México.  
Bajo la dirección del Dr. José Edgardo Escamilla Marván y  
con el apoyo económico de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico.**

*Dedicado  
a todos los que han depositado en mi su confianza*

## **CONTENIDO**

Resumen.	1
1. Introducción.	2
2. Materiales y Métodos.	21
3. Resultados.	26
4. Discusión y conclusiones.	40
5. Referencias.	48
Agradecimientos.	52

## RESUMEN

En el género *Bacillus* se expresan diversas oxidasas terminales en respuesta a las condiciones de cultivo o a la etapa de desarrollo. La citocromo oxidasa  $caa_3$  es una enzima peculiar; en primer lugar porque se ha relacionado con la esporulación en *Bacillus cereus* o con el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables en *Bacillus subtilis*, y en segundo lugar porque presenta un dominio protéico que corresponde a un citocromo del tipo C, al cual no se le ha encontrado alguna relación con la fisiología bacteriana.

En este trabajo se analizó la expresión del gen *ctaD* (que codifica para la enzima  $caa_3$ ) en *Bacillus thuringiensis*, haciendo uso de una sonda obtenida mediante amplificación por PCR. Los resultados mostraron que el gen *ctaD* de *Bacillus thuringiensis* no es dependiente de la esporulación sino que se induce a partir de la etapa estacionaria y aún desde la etapa logarítmica de crecimiento. Se discute también, la posibilidad de que esta oxidasa sea regulada por represión catabólica.

## 1. INTRODUCCION.

### Las oxidasas terminales.

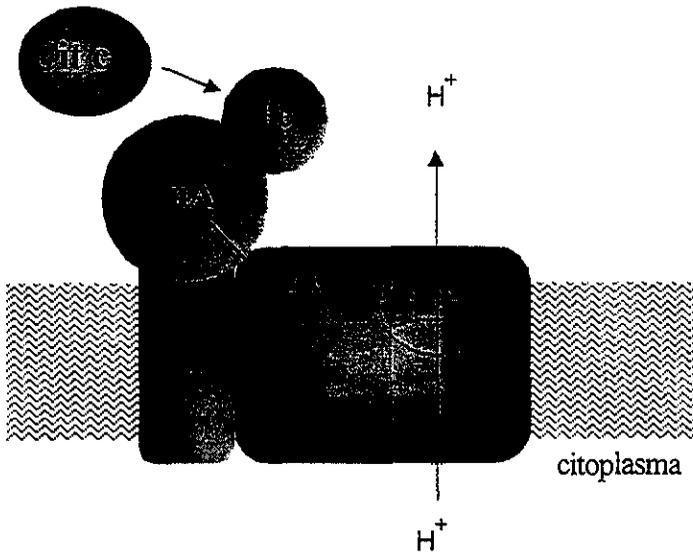
La generación de energía metabólica por medio de la fosforilación oxidativa ocurre en dos fases acopladas. La primera consiste en la oxidación de sustratos orgánicos provenientes del ciclo de los ácidos tricarbóxicos, y la segunda en la fosforilación del ADP. Durante la oxidación de los sustratos, los electrones viajan a través de diversos complejos membranales que en su conjunto reciben el nombre de cadena respiratoria. El transporte de electrones a través de los diversos intermediarios de la cadena respiratoria se utiliza para acarrear protones desde el interior celular y con esto generar un gradiente electroquímico que aporta la energía para la síntesis del ATP en otro complejo membranal que se conoce como ATP sintetasa.

En los organismos aerobios el aceptor final de los electrones que provienen de la cadena respiratoria es el  $O_2$ ; y las enzimas que catalizan esta transferencia se conocen como oxidasas terminales. En las bacterias se encuentran diferentes tipos de cadenas respiratorias que se distinguen por el número y las características de los acarreadores de electrones y oxidasas terminales que presentan. Esta diversidad refleja las múltiples estrategias bioenergéticas que usan los procariotes para adaptarse a las distintas condiciones ambientales que les rodean.

Las oxidasas terminales pueden tomar los electrones del citocromo c, y se denominan citocromo c oxidasas, o bien del quíno, en cuyo caso se conocen como quíno oxidasas. Ambos tipos de oxidasas se agrupan dentro de la superfamilia de oxidasas hemo-cobre que también incluye a las oxidasas terminales mitocondriales (Castresana et al. 1994).

Las enzimas que forman parte de la familia de las oxidasas hemo-cobre, se caracterizan por presentar una alta similitud de secuencia en una de sus tres subunidades principales: la subunidad I. En esta subunidad se presenta un centro bimetalico único en donde se une el  $O_2$  para ser reducido. El centro bimetalico o binuclear, está compuesto de un grupo hemo de alto spin (ligado en uno solo de los sitios de coordinación a una histidina del

polipéptido) y un sitio de cobre (CuB) que participa en la catálisis. Además del grupo hemo del centro binuclear, estas oxidasas poseen un segundo grupo hemo de bajo spin (ligado en ambas posiciones de coordinación) que no participa directamente en la catálisis pero que facilita la transferencia de los electrones hasta el sitio catalítico. También es en esta misma subunidad donde se encuentra el canal conductor de los protones, que se utiliza para la generación del gradiente electroquímico.



**Figura 1.1. Esquema de la citocromo c oxidasa  $caa_3$ .** Con flechas se indica el flujo de los electrones desde el citocromo c libre hacia el Fe del hemo C de la subunidad II, de aquí pasan al primer cobre (A), y luego pasan por el hemo A de la subunidad I para llegar al centro binuclear formado por el Fe del hemo A de alto spin ( $a_3$ ) y el segundo cobre B. La subunidad I tiene capacidad de bomba de protones (Tomado de García-Horsman et al. 1994).

Aunque cada oxidasa se distingue por sus propiedades catalíticas propias, como la afinidad por sustrato o la velocidad de recambio, la forma tradicional de diferenciarlas se basa en el tipo de grupo hemo que presentan y en las características espectroscópicas que éstos les confieren. Gran parte de la variación observada se debe a las distintas combinaciones en que se pueden encontrar a los hemos A, B, O y D, presentes en la subunidad I en cualquiera de los dos sitios: el de bajo o el de alto spin. Dadas todas las combinaciones posibles, no se ha encontrado una correlación clara entre la especificidad por sustrato de las oxidasas (o alguna otra característica funcional) y el tipo de hemos que contienen. Es el ambiente protéico que rodea a los centros hemo-cobre el que define principalmente las propiedades catalíticas (Basu et al, 1994).

Sin embargo, es común distinguir a las oxidasas por su contenido de hemos en los sitios de alto y bajo spin. Así, una oxidasa que posee hemo tipo A en ambos sitios, se conoce como aa<sub>3</sub> o aa'. El sufijo o las comillas señalan cual es el hemo localizado en el sitio de alto spin.

La segunda subunidad en importancia es la subunidad II. La comparación de la secuencia de esta subunidad en distintas especies muestra que la proteína tiene un nivel de conservación menor al 16%, entre los cerca de 400 aminoácidos que la componen (Arredondo-Peter, et al, 1993). No obstante, mantiene una orientación en la membrana y una conformación tridimensional que le permite interactuar con la subunidad I y servir de puente durante el paso de electrones desde el donador (citocromo C o quinol) hacia el centro bimetalico. Su papel es proveer a la enzima del sitio de unión al sustrato. En las citocromo c oxidasas la subunidad II presenta residuos conservados que son necesarios para la unión de un cobre tipo CuA, el cual, es el aceptor inicial de los electrones que provienen del citocromo c. El sitio de unión al CuA no está presente en las quinol oxidasas, en las cuales existen otros sitios conservados que probablemente tienen que ver con el reconocimiento del sustrato; es decir, con la unión del quinol a la oxidasa (Laureaus et al, 1993). El extremo carboxilo de la subunidad II de algunas citocromo c oxidasas presenta una extensión que

contiene un hemo C, unido covalentemente, pero no se conocen diferencias funcionales entre la oxidasa que contienen hemo C y las que carecen de él (García-Horsman et al, 1991).

Los genes de las subunidades de la oxidasa, se arreglan normalmente en un operón que en la mayor parte de los casos tiene un orden definido: Subunidad II, I y III, acompañada de genes asociados que se encuentran hacia cualquiera de los extremos 5' o 3'. Esta organización génica la comparten los operones para las oxidasas *caa*<sub>3</sub> y *aa*<sub>3</sub> de *Bacillus subtilis* (operón *cta*ABCDEF y *qox* ABCD) y *Bacillus steaothermophilus* (operón *caa*ABCDEF) con la oxidasa *bo*<sub>3</sub> de *Escherichia coli* (operón *cyo*ABCDE). Los genes que corresponden a las subunidades catalíticas para el caso de *Bacillus* son: CdyE, en el orden indicado anteriormente.

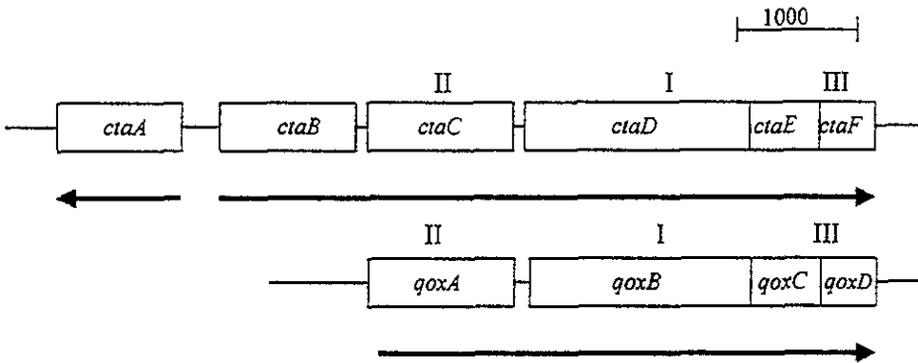
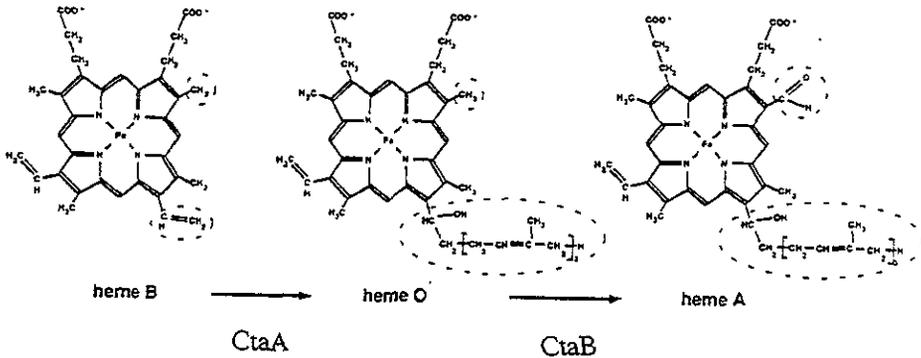


Figura 1.2. Arreglo génico de los operones Cta y Qox de *Bacillus subtilis*. El operón Cta codifica para la citocromo oxidasa *caa*<sub>3</sub> y el operón Qox para la quinol oxidasa *aa*<sub>3</sub>. Las flechas indican la dirección de la transcripción, y los números romanos indican la subunidad para la cual codifican los distintos genes. Este arreglo genético se conserva en *Bacillus firmus* y *Bacillus steaothermophilus*. La barra superior señala la escala de la figura y representa un tamaño de 1000 pares de bases.

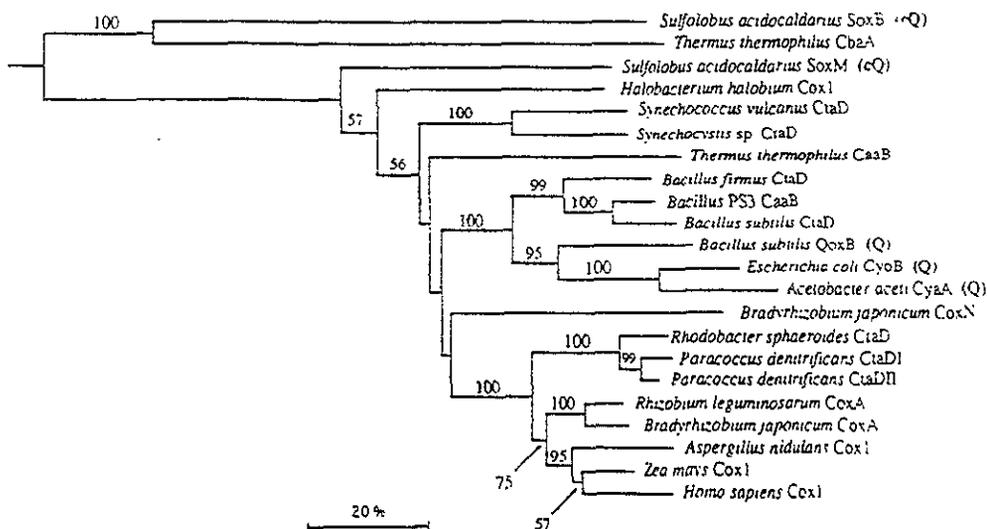
Los dos primeros marcos de lectura *ctaA* y *ctaB* codifican las para enzimas que participan en la biosíntesis de los grupos hemo a partir del protohemo IX, que es el grupo precursor (Wachenfeldt y Hederstedt, 1992). El gen *ctaB* de *Bacillus* es homólogo al gen *cyoE* de *E. coli* y codifica para una farnesil transferasa que convierte al protohemo IX en

hemo O, mediante la adición de un grupo hidroxietil farnesil. Por otra parte, el gen *ctaA* codifica para una enzima que reemplaza al grupo metilo, en el carbono 8 del hemo B, por un grupo formilo que lo convierte así en un hemo de tipo A. Esta modificación de los hemos altera también sus propiedades espectroscópicas (Svensson et al, 1993) (FIGURA 1.3).



**Figura 1.3. Biosíntesis del hemo A.** La ruta de síntesis del hemo A comienza con el hemo B (protohemo IX) como grupo precursor del hemo tipo O. En este paso interviene el producto del gen *ctaA*. El siguiente paso consiste en la conversión del hemo O a hemo A, por medio del producto del gen *ctaB*

Al comparar a las oxidasa bacterianas con las mitocondriales, queda claro que ambas comparten al menos las tres subunidades catalíticas principales. No obstante, en los procariontes el número de subunidades catalíticas asociadas puede variar. En algunos casos se carece de la subunidad II y se puede prescindir de la subunidad III, y las enzimas siguen siendo completamente funcionales. El resto de las subunidades de la enzima mitocondrial (hasta 10), no tienen contraparte bacteriana, pero se consideran como adquisiciones posteriores al fenómeno de endosimbiosis que originó a las mitocondrias. El grupo bacteriano más cercano a las mitocondrias es la subdivisión alfa de las bacterias púrpura



**Figura 1.4. Genealogía de las oxidasas terminales hemo-cobre.** Se muestra una comparación de los genes que codifican para la subunidad I de las oxidasas terminales. Las abreviaturas que acompañan al nombre de cada especie en comparación corresponden al gen que codifica para la subunidad I de la oxidasa de esa especie, aunque todos ellos tengan nombres diferentes de acuerdo a su función. En algunos casos se comparan dos genes de la misma especie, dado que sus productos forman parte de enzimas distintas. Se observa que las oxidasas del tipo *caa3* del género *Bacillus* (*ctaD* y *caaB*) se diversificaron después de que se separaron de las quinol oxidasas del tipo *aa3* (*qoxB*), la cual es la probable precursora de las quinol oxidasas de las proteobacterias. La oxidasa *c<sub>1</sub>aa3* de *Thermus thermophilus* (gen *caaB*) pudo surgir como un fenómeno de fusión independiente. Tomado de Castresana et al. 1994.

fotosintéticas, al que pertenecen *Paracoccus* y *Rhodobacter*, por lo que se postula que estas bacterias y las mitocondrias comparten el mismo ancestro (Kadenbach et al, 1991).

Como se ha visto, la homología entre los miembros de esta familia de oxidasas hemo-cobre, se basa en la similitud de secuencia de la subunidad catalítica principal. El análisis filogenético, por comparación de secuencias de distintos tipos de oxidasas, ha mostrado que todas ellas comparten un origen común, aún cuando pertenecen a organismos sin relación filogenética cercana. Su origen se rastrea hasta antes de la separación de los grupos Arquea y Eubacteria, lo cual indica que la proteína ancestral de las oxidasas, apareció cuando la concentración del oxígeno atmosférico aún era baja. Esta afirmación se apoya en el hecho de que el primer fenómeno de duplicación génica, sucedió entre las oxidasas respiratorias y las oxidasas semejantes a las que participan en la fijación de nitrógeno, en el actual género *Rhizobium*. Por otra parte, este mismo tipo de análisis indica que existe una mayor relación entre las quinol oxidasas de *E coli* y *Acetobacter aceti*, con las oxidasas de las bacterias Gram positivas como *Bacillus*, que con otras oxidasas de bacterias pertenecientes al mismo grupo como *Rhodobacter* o *Paracoccus*, lo que sugiere un fenómeno de transferencia lateral de genes entre las quinol oxidasas de las bacterias Gram positivas y las proteobacterias (FIGURA 1.4) (Castresana et al, 1994).

El tipo y número de oxidasas que puede presentar una especie bacteriana dada está en función de su constitución genética, aunque el nivel de expresión de cada una de ellas depende de las condiciones de crecimiento y de las señales ambientales que se dan en cada momento. De esta forma, las distintas oxidasas respiratorias permiten a las células cubrir sus demandas energéticas en una gran variedad de condiciones ambientales (García-Horsman et al, 1994). *Bacillus stearothermophilus* es un caso típico; en esta bacteria se han detectado hasta cuatro oxidasas terminales distintas, las cuales se expresan de acuerdo con la tensión de oxígeno a la que se ve sujeta la población bacteriana. Así, por ejemplo, bajo condiciones de cultivo con aeración elevada, se expresa una oxidasa del tipo  $caa_3$ ; en condiciones microaerófilas, es decir de aeración limitada, se expresa una oxidasa del tipo  $bb_3$  o  $bo$  (Sone et al, 1990); mientras que en condiciones intermedias, se detecta una enzima del tipo  $cao$ .

Además de esto, algunas mutantes deficientes en la síntesis del hemo A, expresan una quinol oxidasa del tipo bd. En realidad, se trata únicamente de tres enzimas, pues las oxidasas  $caa_3$  y  $cao$ , comparten los mismos polipéptidos pero con una sustitución del hemo A por el O en el sitio catalítico (Sone et al, 1991). Esta sustitución confiere a la enzima una velocidad de recambio mayor y menor inhibición por cianuro. Lo anterior indica una gran adaptabilidad del aparato bioenergético de *Bacillus* a las modificaciones ambientales, y resalta la posible relevancia de contar con un tipo de hemo o con otro.

*Bacillus stearothermophilus* no es el único caso dentro del género en donde ocurre esta plasticidad de la cadena respiratoria. Otras especies como *Bacillus subtilis* o *Bacillus cereus* también modifican la composición de su cadena en respuesta a otras señales ambientales. Esta variabilidad fisiológica también se correlaciona con la diversidad genética del género y con su amplio intervalo de distribución ecológica. Todo esto ha hecho de *Bacillus* un modelo ideal para el estudio de la bioenergética bacteriana.

Las oxidasas terminales del tipo  $aa_3$  son las más ampliamente distribuidas y mejor estudiadas, por su semejanza con las citocromo oxidasas mitocondriales. En *Bacillus* se encuentran dos oxidasas que contienen hemo A: la  $aa_3$  y la  $caa_3$ . La primera se considera como una quinol oxidasa en todas las especies del género, excepto en *B. cereus*. La oxidasa  $caa_3$  es una enzima muy semejante a la del tipo  $aa_3$ , que se distingue de ésta por la presencia de un citocromo c unido covalentemente (codificado por la misma secuencia nucleotídica) y por utilizar al citocromo c como donador de electrones.

Los primeros reportes de oxidasas del tipo  $caa_3$  provienen de especies bacterianas que crecen a temperaturas elevadas, a saber: *Thermus thermophilus* (Mather et al, 1990) y *Bacillus stearothermophilus* PS3 (Sone et al, 1988), estos hallazgos llevaron a proponer a la fusión génica de c con  $aa_3$ , como un mecanismo para evitar la difusión del citocromo c libre fuera de la membrana plasmática de la bacteria (García-Horsman et al, 1991). Posteriormente, este mismo tipo de enzima fue descrita en otras especies mesófilas del género *Bacillus*, donde se encontró asociada a condiciones muy diversas. En el caso de *B. subtilis*, la presencia de  $caa_3$  se relaciona con la carencia de fuentes de carbono

fermentables (Lauraeus et al. 1991), mientras que en *B firmus*, la oxidasa se expresa cuando el pH del medio se vuelve muy alcalino (10 o más) (Quirk et al, 1993). Para *B cereus*, la enzima se ha detectado sólo en la etapa esporulante de crecimiento en medios fermentables (García-Horsman et al. 1991).

### **Características e importancia de *Bacillus***

Las bacterias del género *Bacillus* son bastones Gram positivos, aeróbicos y formadores de endosporas. Este género es uno de los más diversos y con mayores aplicaciones comerciales. Se distribuye en el suelo, aire y agua, y participa en diversas transformaciones químicas. Su gran diversidad metabólica permite que muchas de sus cepas se ubiquen en los márgenes de tolerancia de otras especies en cuanto la temperatura, el pH o la salinidad. Esta amplia diversidad, aunada a la baja patogenicidad reportada, hace que este grupo sea utilizado en una gran variedad de procesos industriales que incluyen la producción de antibióticos, enzimas hidrolíticas, insecticidas y suplementos alimenticios (Harwood, 1989). Esta misma diversidad los convierte en un modelo para el estudio de la fisiología microbiana y de la diferenciación celular a nivel bioquímico (Halvorson, 1969).

*Bacillus cereus* y *Bacillus thuringiensis* son especies muy cercanas entre sí que se distinguen, esencialmente, por la habilidad de la segunda para producir cristales de inclusión protéicos con actividad insecticida. A nivel genético ambas especies son muy similares, y presentan un mapa cromosómico que es prácticamente idéntico (Carlson et al, 1996). De hecho, estas especies alguna vez han sido clasificadas como variedades de una sola, y en trabajos recientes se ha propuesto que se agrupen nuevamente dentro de la misma especie junto con *B. anthracis* y *B. mycoides* (Keim et al, 1996). Los análisis de la secuencia del ARNr reiteran esta similitud y las ubican dentro del grupo I al que también pertenecen *B subtilis* y *B megaterium*, aunque en ramas más alejadas del árbol filogenético (Vary, 1994). La importancia del tal cercanía radica en la posibilidad de usar a *B thuringiensis* como modelo análogo de *B cereus* y viceversa; así se aprovecharía la caracterización genética del primero y el conocimiento más amplio del sistema respiratorio del segundo.

## **Respuestas fisiológicas en la etapa estacionaria**

Al agotarse los nutrientes en el medio de crecimiento, ocurren cambios fisiológicos que se reflejan en la desaceleración de la tasa de crecimiento de las poblaciones bacterianas en cultivo. En esta etapa, conocida como estacionaria, donde no se observa un crecimiento neto en el tamaño de la población, suceden diversos cambios fisiológicos en las bacterias aeróbicas entre los que se incluyen: el desarrollo de la competencia, la producción de antibióticos, un incremento en el transporte de aminoácidos y dipéptidos, la formación del flagelo, la síntesis de enzimas extracelulares y del ciclo de Krebs y, finalmente, la esporulación (Fisher et al. 1994). Todas estas respuestas parecen estar mediadas, de algún modo, por señales fisiológicas que convergen en el sistema *AbrB*, *Spo0A*, del cual se tratará posteriormente.

## **Competencia**

La competencia puede definirse como un estado fisiológico en el que la célula es capaz de unir, procesar e ingerir ADN exógeno de alto peso molecular. Si este ADN constituye un replicón, el proceso de ingestión puede originar transformantes. Aunque hasta el momento no queda claro cuál es el papel adaptativo de la competencia (si es que tiene alguno), se ha propuesto que lejos de representar un mecanismo de nutrición (ingestión de nitrógeno y fósforo), la competencia es un mecanismo que provee a la célula de moldes útiles en la reparación del ADN. Es sabido que el ADN puede sufrir alteraciones provocadas por los radicales libres que se generan durante el metabolismo oxidativo que se activa hacia el inicio de la fase estacionaria. Adicionalmente, la capacidad de integrar el ADN transformante, puede incrementar la adecuación de la bacteria, por la introducción de copias de formas alternativas de algún gen.

El desarrollo de la competencia está regulado por una red de genes cuya interacción precisa aún se desconoce. La transducción de señales ambientales, que desencadena la competencia, requiere de la participación de al menos tres sistemas de dos componentes

dísitintos: el sistema *comP/comA*, al parecer específico de la competencia; el *degS/degU* que participa en la expresión post-exponencial de las proteínas degradativas y el regulador de respuesta *Spo0A*.

La competencia se relaciona con la esporulación en diversos aspectos. En principio ambas son reprimidas por la proteína *AbrB*; también comparten como señal al factor *Spo0A* fosforilado y al menos una de las proteínas esenciales para la competencia, se transcribe desde un factor sigma de esporulación. Sin embargo, mientras que la esporulación se desencadena por una carencia de nutrientes, la competencia requiere la presencia de glucosa para iniciarse

### **Esporulación.**

La última de las respuestas inducidas por el agotamiento de nutrientes, al inicio de la fase estacionaria, es la inducción de una serie de cambios morfológicos y fisiológicos que dan como resultado la formación de una espora latente. La esporulación es un proceso de diferenciación inducido por el ayuno, y está ligado a variaciones en el estado metabólico de la célula (Bryan et al, 1996).

Los acontecimientos que dan lugar a la esporulación, constituyen una secuencia pleiotrópica en la que cada paso depende de los anteriores. El proceso en su conjunto está muy regulado al nivel genético, desde la inducción hasta la liberación de la espora y posteriormente la germinación.

Las etapas de la esporulación, se delimitan arbitrariamente de acuerdo a la aparición de algunas características morfológicas y a la presencia de marcadores bioquímicos propios de cada estado. Aunque la duración de cada uno de los estados del proceso es variable, de organismo a organismo, el orden de los sucesos, mediados por la activación y desactivación de genes específicos, es siempre el mismo. En el primer estado denominado I, que comienza al  $t_0$ , el material genético duplicado se arregla en un filamento axial que está fijo a la membrana por uno de sus extremos; posteriormente se divide y cada genóforo migra en dirección opuesta, hacia los polos del bacilo. Después de esto, se forma un septo asimétrico

que divide a la célula en dos compartimentos: el mayor, conocido como célula madre, engulle al menor y forma una célula hija, alrededor de la cual se integran una serie de cubiertas protectoras, que forman una estructura interna que se conoce como preespora. Conforme la cubierta de la preespora se engrosa, ésta se vuelve más resistente a los agentes químicos y al calor. Cuando la espora alcanza el grado máximo de resistencia, paralelamente en la célula madre ocurre un proceso de autólisis y la espora es liberada. La liberación de la espora representa el término de la diferenciación y ocurre alrededor de 15 horas después del  $t_0$ ; a partir de este momento, las esporas permanecen latentes en el ambiente en espera de las condiciones adecuadas que les permitan germinar e iniciar un nuevo ciclo.

El inicio de la esporulación es un fenómeno dependiente del ciclo celular que sólo puede ocurrir en una etapa particular de la curva de crecimiento. En este periodo la célula "decide" a partir de diversas señales metabólicas y ambientales, si continúa la división celular o comienza el proceso de diferenciación que la llevará a la esporulación. El reconocimiento de las señales debe ser un mecanismo complejo, ya que depende de la entrada de estímulos provenientes de fuentes muy variadas (Perego et al., 1994). Todavía se desconoce la naturaleza química de las señales (y sus receptores), que dan lugar al inicio de la esporulación; aunque se han propuesto como inductores a la glutamina y a los nucleótidos altamente fosforilados (Doi, 1993).

El regulador clave del inicio de la esporulación es la proteína Spo0A, la cual funciona como represora y activadora de diversos genes, cuyos productos son cruciales para "decidir" entre los dos estados de desarrollo: crecimiento vegetativo o esporulación. Algunos de los efectos de Spo0A están controlados por otros reguladores como AbrB, el cual es una proteína de unión al DNA que bloquea el reconocimiento del promotor por parte de la ARN polimerasa, de esta forma se impide la transcripción de la mayor parte de los genes de la esporulación (Perego et al., 1994).

La actividad transcripcional de Spo0A reside en su forma fosforilada: Spo0A-P, que se produce mediante un sistema de transducción de señales conocido como "phosphorelay". El phosphorelay es una adaptación del sistema de dos componentes típico, compuesto por

una histidina-cinasa que fosforila a un regulador de la respuesta. Los componentes de este sistema son: las cinasas KinA y KinB y el regulador de la respuesta Spo0F (Perego et al. 1994).

La estimulación de las cinasas por factores que promueven la esporulación se inicia por la vía de la transferencia de fosfatos. Las cinasas al captar la señal, fosforilan a Spo0F, el cual en su forma fosforilada es el sustrato de una fosfotransferasa que transfiere el fosfato desde SpoF-P hacia Spo0A. Este último se requiere para la represión de AbrB, para salir del estado vegetativo y para inducir la esporulación.

La regulación de los niveles de Spo0A fosforilado se puede dar a distintos niveles: por medio de la modulación de la actividad de las cinasas; por la presencia de algún efector; o por la acción de una fosfatasa específica de Spo0A-P, denominada Spo0E. Existen también otro tipo de fosfatasas que regulan la cantidad de Spo0A-P por medio de la desfosforilación de Spo0F-P, conocidas como RapA y RapB. La acción de estas fosfatasas incrementa las posibilidades de una regulación fina; pues dado que la esporulación de *Bacillus* depende de la interacción con fenómenos celulares complejos controlados por una multiplicidad de variables: es posible que si las señales superan la capacidad de las cinasas como sensores, la presencia de estas fosfatasas permita que intervengan en la regulación, las señales de procesos fisiológicos para los cuales la esporulación puede tener efectos negativos (Perego et al, 1996). Un ejemplo de esto es el regulador de la competencia ComA que tiene la capacidad de afectar a la esporulación al regular directamente otras fosfatasas.

La acumulación de Spo0A-P activa la transcripción de, cuando menos, siete genes que gobiernan la entrada a la esporulación y la formación de un esporangio de dos compartimentos en el cual la transcripción se regula diferencialmente (Straiger y Losick, 1996). Esta expresión diferencial depende de algunas modificaciones en la ARN polimerasa. Se conocen al menos cinco factores sigma que son esenciales para la esporulación de *Bacillus*, cuya síntesis y activación a diferentes tiempos y en distintos compartimentos, puede dar cuenta de la mayor parte de lo que se conoce como regulación espacial y temporal, durante la esporulación (FIGURA 1.5).

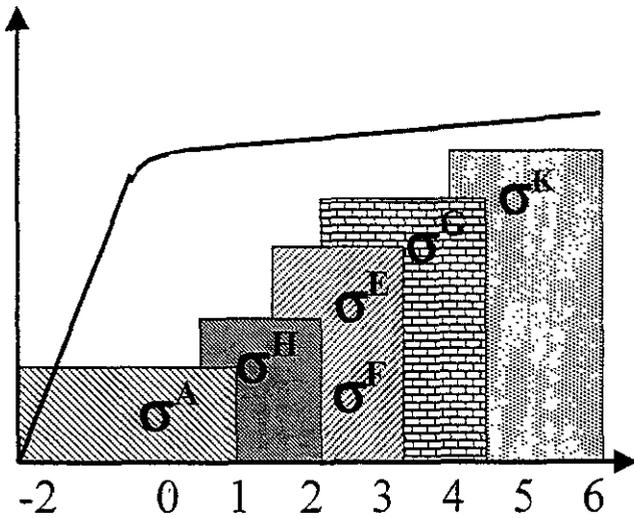


Figura 1.5. Cascada de factores sigma durante el ciclo de vida de *Bacillus subtilis*

La ARN polimerasa de la fase vegetativa (unida a sigma A), reconoce a los primeros genes de esporulación, con ayuda de Spo0A, y siempre que tales genes hayan sido relevados de la represión por AbrB. Uno de estos genes es *spo0H*, que codifica para el factor sigma H, que reconoce a la mayor parte de los genes tempranos de esporulación. En seguida, y antes de la formación de los dos compartimentos, se encuentra un factor pro-sigma F, el cual se vuelve activo hasta el momento de la septación. A partir de entonces la activación de genes particulares en ambos compartimentos depende del reconocimiento por factores sigma específicos, a saber: sigma E y sigma K en la célula madre, y sigma G en la preespora (Kroos, 1991).

Son muchos los genes que dependen de este sistema de regulación, aunque muy pocos de ellos han sido descritos a fondo. El ejemplo más estudiado se encuentra en la

producción de cristales insecticidas que se forman durante la esporulación de *Bacillus thuringiensis*.

Los cristales de inclusión paraesporales de *Bacillus thuringiensis* contienen a las proteínas cristalinas con actividad insecticida, denominadas Cry. Cuando el insecto ingiere el cristal, los ácidos intestinales disuelven a este cuerpo de inclusión y liberan a las proteínas Cry. Estas proteínas se intercalan en la membrana de las células del epitelio intestinal, donde forman poros iónicos que provocan un desbalance osmótico, turgencia de las células y finalmente lisis. Las larvas intoxicadas dejan de alimentarse y posteriormente mueren.

La mayor parte de los genes que codifican para estas toxinas (genes *cry*) se ubican en plásmidos que contienen del 10 al 20% de la capacidad codificante del organismo, aunque algunos pueden estar integrados al genóforo. Cada plásmido contiene uno o más tipos de genes *cry*, y cada cepa bacteriana puede tener uno (normalmente) o más plasmidos.

Para poder acumular la gran cantidad de proteína que se requiere para formar el cristal son necesarios niveles altos de transcripción, estabilidad del ARNm y un producto proteico muy estable. Se sabe que los genes *cry* presentan promotores muy fuertes, específicos para los distintos tipos de factores sigma que se presentan en *Bacillus*. Casi todos los genes *cry* contienen promotores que son reconocidos por los factores sigma E y sigma K, ambos específicos de la esporulación en las etapas intermedia y tardía (estados II y IV respectivamente), en el compartimento de la célula madre. El gen *cryIAa*, por ejemplo, presenta dos promotores: Btl y BtII, el primero de ellos es dependiente de sigma E y el segundo de sigma K, lo que le permite permanecer activo hasta etapas avanzadas de la esporulación.

A diferencia del resto de los genes *cry*, la expresión del gen *cryIIIA* se activa al inicio de la fase estacionaria y es independiente de los factores sigma específicos de la esporulación, pues se sobreexpresa sobre un fondo *Spo0A<sup>-</sup>* (que es una mutante completamente asporógena) (Agaisse y Lereclus, 1994). El análisis de la región promotora del gen *cryIIIA*, que se encuentra más de 500 pb por arriba del codón de inicio, revela semejanza con los promotores que son reconocidos por sigma A (Salamitou et al, 1996) y

origina un transcrito largo que se procesa en un fragmento menor más estable, además, en mutantes para los factores sigma: E, H, B, D, o L, la transcripción prosigue normalmente (Agaisse and Lereclus, 1994).

Como se puede apreciar, el inicio de la esporulación en *Bacillus* es un proceso finamente regulado, del que aún no se tiene un panorama completo. En razón de los numerosos cambios metabólicos que sufre la bacteria en esta etapa (especialmente al inicio), es importante analizar la relación que guarda la regulación de los genes con las distintas señales ambientales que se reciben y los diferentes procesos que se deben regular. Entre todos los procesos de la fase estacionaria, cabe resaltar la regulación catabólica, que aunque pareciera ser independiente del estado de crecimiento, su efecto se hace más notable al final de la fase exponencial de crecimiento y cada vez se encuentra más evidencia de su conexión con otros procesos de la transición entre el crecimiento logarítmico y la fase estacionaria

#### **Represión catabólica en *Bacillus*.**

Mientras exista una disponibilidad de fuentes de carbono de fácil asimilación, algunos genes que participan en el metabolismo de sustratos más complejos se mantienen reprimidos. A este efecto se le conoce como represión catabólica. La represión catabólica ha sido ampliamente estudiada en bacterias Gram negativas y hoy se conoce con gran detalle el mecanismo molecular que mantiene a los genes en niveles de expresión bajos (Hueck y Hillen, 1995). En las bacterias Gram positivas que carecen de AMPc el mecanismo es completamente diferente y de hecho opuesto, pues mientras que en *E coli* se trata de una regulación positiva (por activación de los genes), en *Bacillus* funciona un mecanismo negativo.

Al inicio de la fase estacionaria y la esporulación de *Bacillus subtilis*, comienzan a expresarse un gran número de genes que normalmente se encuentran reprimidos durante el crecimiento activo. Entre ellos se encuentran proteasas, enzimas degradativas de arginina, prolina e histidina; la  $\alpha$ -amilasa y las enzimas del ciclo del ácido cítrico; también se incrementa el transporte de aminoácidos y dipéptidos, además de la producción de

antibióticos protéicos, la formación del flagelo y el desarrollo de la competencia (Fisher et al. 1994).

Se reconocen dos elementos principales que actúan en la regulación de todos los genes sujetos a represión catabólica. El primero de ellos: Hpr, funciona como sensor de la actividad metabólica celular y representa el interruptor del circuito al interactuar con el segundo elemento: Ccp, que es un factor transcripcional protéico que reconoce una secuencia nucleotídica específica denominada CRE, a la cual se une, e impide la transcripción de los genes que presentan esta secuencia.

Hpr, es un elemento del sistema de fosfotransferasa que participa en el transporte de azúcares, tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. En *Bacillus* Hpr puede ser fosforilado, en la serina 46, por una proteína cinasa dependiente de ATP que se activa en presencia de fructosa 1,6-bisfosfato (intermediario metabólico de la glucólisis) y de esta manera se determina la disponibilidad de glucosa en el medio. Además puede desfosforilarse mediante una fosfatasa que se activa en presencia de fosfato inorgánico, lo que probablemente la convierte en un sensor del estado energético de la célula.

Se ha demostrado recientemente que Hpr puede interactuar con Ccp, con lo que se ha postulado que Hpr-Ser-P al unirse con Ccp, incrementa la afinidad de esta proteína por su sitio de unión al ADN. Se sabe por experimentos de protección enzimática (“footprinting”) que Ccp se une a una secuencia consenso localizada alrededor del sitio de inicio de la transcripción (SIT). Esta secuencia conocida como CRE (Cis responsive element) es un palíndromo de 14 pares de bases que muestra diferentes de posiciones con respecto al inicio de la transcripción y que al estar unida al complejo Ccp-Hpr-Ser-P, interfiere con el inicio de la transcripción, por enmascaramiento del promotor o modifica el crecimiento de la cadena (Hueck & Hillen, 1995).

En resumen, se puede decir que la concentración intracelular de fructosa 1,6 bifosfato (FBF) es la señal para la represión catabólica en *Bacillus*, tanto como el AMPc lo es para *E. coli*. La ausencia de fuentes de carbono fácilmente utilizables, puede disminuir la concentración de FBF, necesaria para la interacción de Hpr con Ccp, y dar lugar a la

estimulación de la fosfatasa dependiente de fosfato inorgánico, lo que origina la desfosforilación y la disociación del complejo con Ccp, desactivando así a la represión catabólica.

Recientemente, se encontró que AbrB (represor de los genes de esporulación) también participa activamente en la represión catabólica. Se ha observado que en mutantes deficientes en Spo0A, en los que la transcripción de AbrB no se reprime al inicio de la esporulación, se da una sobreactivación del operón *rbs* (transporte de la ribosa) mientras que la carencia de AbrB disminuye la expresión (Strauch, 1995). Lo mismo se ha reportado para el operón *hutPH* (degradación de la histidina) y para el gen de la lactato deshidrogenasa (Fisher et al, 1994). Como se ha visto que AbrB es capaz de unirse a CRE, es probable que la competencia con Ccp por los sitios de unión compartidos sea la responsable del incremento en los niveles de expresión que se observan en estos genes, a condición de que AbrB restrinja con menos eficiencia que Ccp, el avance de la polimerasa. AbrB, además, activa positivamente la transcripción de Hpr, lo que abre la posibilidad de que AbrB participe indirectamente en el mecanismo de represión de diversos genes, al afectar la cantidad de Hpr disponible.

Finalmente algunos genes sujetos a represión catabólica (*hut* y *bgI*) (Kruger et al, 1996 y Fisher et al, 1994), también mantienen bajos sus niveles de expresión, por un mecanismo alternativo que se denomina terminación temprana. En ausencia del inductor, la transcripción se detiene cuando se alcanza el terminador temprano, que se localiza a unas cuantas bases del SIT, mientras que en presencia de un antiterminador activo, por ejemplo LicT, la transcripción procede hasta completar el gen. Aunque no se conoce todavía el detalle de cómo interactúa el antiterminador con el inductor o con el sistema general de represión mediada por Hpr, se ha demostrado que diversos antiterminadores, entre ellos LicT requieren de Hpr-His-P, probablemente por medio de una transferencia de fosfatos (Kruger et al, 1996). Es pertinente aclarar que Hpr se fosforila en la histidina ubicada en la posición 15, en todas las bacterias, como parte de su función en el transporte de carbohidratos.

Como puede apreciarse, la represión catabólica es un mecanismo de suma importancia para el funcionamiento de la célula y para el control de genes en distintos estados fisiológicos; así mismo, se aprecia que los mecanismos de desrepresión están conectados de alguna forma con las señales que desencadenan la esporulación. Aunque también se ha encontrado que la represión catabólica puede actuar sobre genes dependientes de sigma E, es decir, propios de estados tardíos del desarrollo en la célula madre (Bryan et al, 1996).

### Objetivos.

El hallazgo de una expresión diferencial de *caa<sub>3</sub>*, dependiente de la etapa de crecimiento o de las condiciones de cultivo, invitó al análisis de la regulación de la actividad de esta enzima a lo largo del ciclo de vida de *Bacillus*, en vista de una posible relación entre el inicio de la esporulación y la regulación transcripcional de la cadena respiratoria. Se planteó entonces un proyecto de investigación cuyo objetivo es conocer la regulación y funcionalidad de la oxidasa terminal *caa<sub>3</sub>* en el género *Bacillus*.

Como intento inicial se llevó a cabo la detección del gen para la subunidad II de *caa<sub>3</sub>* con la intención de obtener la secuencia nucleotídica del *locus* donde se ubica el operón que codifica para esta enzima (Hernández, S. F, 1994. Tesis de licenciatura). Posteriormente se modificó la estrategia para intentar la clonación del mismo operón, por medio de la amplificación de un fragmento corto del gen *ctaD*, que codifica para la subunidad I; el cual se utilizó como sonda específica en los análisis moleculares que aquí se describen.

En este trabajo se buscó establecer un método confiable para el estudio de la regulación del gen *ctaD* en *Bacillus thuringiensis*, durante distintas fases de su ciclo de crecimiento, y así analizar la relevancia fisiológica de la enzima *caa<sub>3</sub>* dentro de este contexto.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material biológico*

En este estudio se utilizó la cepa de *Bacillus thuringiensis* var. kurstakii, y la cepa DH5 $\alpha$  de *Escherichia coli* para la clonación de los vectores.

### *Condiciones de Cultivo*

Se utilizaron diversos medios de cultivo para el crecimiento de las cepas bacterianas, de acuerdo con las necesidades de los protocolos. Para el crecimiento de *E coli* se utilizó siempre medio Luria Bertani (LB): triptona de caseína 1% p/v, extracto de levadura al 0.5 % p/v. NaCl 1% p/v. Para el cultivo de *B thuringiensis* se usó como medio general LB y para el crecimiento en esporulación se utilizó la mezcla de sales descrita por Hanson y colaboradores en 1963. Uno de los medios fermentables que se utilizó contuvo sacarosa al 0.1%, 0.1% de extracto de levadura y 0.1% de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; el segundo medio contuvo 0.2% de glucosa más 0.15% de extracto de levadura y 50 mM de Tris-HCl, pH 7.5. El medio de crecimiento no fermentable consistió de la misma mezcla de sales, adicionada con 0.8% de hidrolizado de caseína, 0.32% de ácido glutámico, 0.21% de DL-alanina y 0.12% de L-asparagina. El pH de los medios se ajustó a 7.1 con NaOH.

La temperatura de incubación fue de 30°C para *Bacillus*, en cultivos aeróbicos que se aerearon por agitación a 200 rpm, con una cama de aire 3 veces mayor al volumen del cultivo. La sincronía de los cultivos de *Bacillus* se consiguió por el método de diluciones seriadas (transferencias) y se obtuvieron las cinéticas de crecimiento mediante el registro de la densidad óptica a 540 nm, o con el uso de un colorímetro Klett.

La esporulación se consiguió mediante el método de agotamiento de nutrientes (Hanson et al. 1963), o por el método de resuspensión descrito por Sterlini y Mandelstam en 1969.

### *Obtención de membranas*

Los cultivos se cosecharon por centrifugación a 8000 x g por 10 minutos y se lavaron con amortiguador K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM pH 7.4, MgCl<sub>2</sub> 3mM. Posteriormente se resuspendieron en este mismo amortiguador y las células se rompieron mecánicamente.

mediante el uso de perlas de vidrio de 0.1 mm de diámetro a 4.500 rpm y a una temperatura de 4° C en un Dyno-mill (WAB Maschinen-Fabrik). Los restos celulares fueron eliminados por centrifugación a 8.000 x g durante 10 minutos, mientras que las membranas se recuperaron por centrifugación a 144,000 x g durante 40 minutos y fueron lavadas tres veces con el mismo amortiguador y recuperadas bajo las mismas condiciones.

#### *Análisis espectral*

El análisis espectral de los citocromos presentes en las membranas de *B thuringiensis* (resuspendidas en amortiguador de fosfatos pH 7.4 con glicerol al 50% v/v y congeladas con nitrógeno líquido) fue realizado con la ayuda de un espectrofotómetro de doble rayo modelo SLM DW2000de (Aminco) La presencia de citocromos fue determinada a partir de espectros diferenciales de persulfato de amonio como agente oxidante, y ascorbato de sodio (0.3 M en relación 1:50) o ditionita de sodio. como agentes reductores, según el caso.

#### *Electroforésis de proteínas*

Las proteínas membranales se extrajeron mediante digestión con SDS al 5%, glicerol al 15% y  $\beta$ -mercapto etanol al 3%, por incubación durante 4 minutos en baño maría. La concentración de proteínas en el sobrenadante de las membranas centrifugadas se realizó según la técnica de Lowry (Lowry et al, 1951).

Las proteínas membranales se separaron por electroforésis en geles de PAGE-SDS (Laemmli, 1970) en un gradiente de 10% a 16%, bajo una corriente de 3.5 mA de salida (dentro del gel resolvidor).

Los grupos hemo se revelaron por tinción. con 200 ml de una solución de tetrametil bencidina al 0.045% disuelta en acetato de sodio 0.25 M y metanol al 30% (Thomas, 1976). El gel se incubó en esta solución durante 2 horas a 30° C con agitación moderada y se reveló adicionando 300  $\mu$ l de peróxido de hidrógeno. durante 3 minutos.

#### *Obtención de ácidos nucleicos*

El ADN total de *B thuringiensis* se extrajo a partir de cultivos en etapa vegetativa. Las células se cosecharon por centrifugación a 8000 x g y se rompieron con

lisozima a una concentración de 2 mg por ml en NaCl 0.1 M, EDTA 50 mM, pH 7.5, y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. Posteriormente se adicionó SDS a una concentración final de 5% y se incubó a 65° C por 15 minutos. El ADN se extrajo con Fenol-Tris pH 8.0 y se precipitó con 1/10 de acetato de sodio 4 M más dos volúmenes de etanol frío.

Para la extracción del plásmido en pequeña escala, se siguió el método de lisis alcalina (minipreps) reportado por Maniatis en 1982. Para la purificación en mayor escala se utilizaron las columnas de intercambio de Quiagen, según las especificaciones del proveedor.

El ARN total de los cultivos bacterianos se extrajo por lisis con fenol-ácido e incubación a 60°C según el método descrito por Alba en 1981.

### PCR

Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR se diseñaron a partir de las secuencias utilizadas por Quirck y colaboradores en 1993, para la amplificación de un fragmento del gen *ctaD* de *Bacillus firmus*; a la cual se adicionaron extremos con sitios de corte para las enzimas de restricción EcoRI y Bam HI. La secuencia final se analizó con el programa OLIGO 4.03 (Primer analysis software) 1992 de National Biosciences Inc. Como secuencia blanco se utilizó el operón *Cta* publicado por Saraste y colaboradores en 1991, con número de acceso: X54140 EMBL.

Los experimentos de PCR se llevaron a cabo con los componentes del "Gen Amp Kit" de Perkin Elmer. Las condiciones de la reacción fueron las siguientes: 0.2 µg de ADN total de *Bacillus thuringiensis* como molde, 0.4 µg de los oligonucleótidos, 200 µM de desoxinucleótidos trifosfatados (Pharmacia), y 1 U de la enzima Taq polimerasa en un volumen final de 50 µl. Se usaron un total de 30 ciclos de amplificación: en el primero de ellos la desnaturalización inicial fue a 95° C, durante 3 minutos, seguido de un alineamiento inicial a 30° C por 1 minuto y una extensión a 72° C por 1 minuto. En los 29 ciclos restantes la desnaturalización se llevó a cabo a 92° C por 3 minutos, el alineamiento a 58° C por 1 minuto, y la extensión a 72° C por 1 minuto.

### *Clonación*

Para clonar el fragmento amplificado se utilizó el “TA cloning Kit” de INVITROGEN. La transformación se hizo con células competentes preparadas de acuerdo al protocolo descrito por Maniatis en 1982. Se utilizó ampicilina, como agente selectivo, a una concentración de 100 µg por ml en placas de medio LB, adicionadas con IPTG y X-gal a una concentración final de 5 mM y 40 µg por ml respectivamente.

### *Secuenciación*

El ADN utilizado para la secuenciación, se obtuvo mediante la técnica de minipreps y se purificó con fenol-cloroformo-isoamílico. La secuencia se obtuvo con el método de dideoxinucleótidos (Sanger et al, 1976) con el Kit de Secuenciación de USB, y según las especificaciones del proveedor. Se utilizó el primer universal (forward) de Stratagene, amplificando en presencia de adenina marcada con S<sup>32</sup> y se reveló el resultado mediante electroforesis en un gel de acrilamida/urea, al 6% a 50° C y exposición en una placa fotográfica durante 14 horas.

### *Marcaje de las sondas*

Los plásmidos W6 y CryIII contienen al fragmento amplificado y un fragmento del gen *cryIIIA* de *B thuringiensis* respectivamente (ver figura 3.9). Estos plásmidos se digirieron con EcoRI, y los fragmentos liberados se recuperaron a partir de agarosa de bajo punto de fusión al 1.2% por tratamiento con Gelasa (Epicentre). Las sondas se marcaron con fluoresceína por el método de “random priming” con los componentes del “Vistra Fluorescence Kit” (Molecular Dynamics y Amersham Life Sciences).

### *Northern blot*

El ARN extraído se denaturalizó en amortiguador MOPS 1x (MOPS 20 mM, acetato de sodio 8 mM y EDTA 1 mM) adicionado con formaldehído al 16% y formamida al 50%, y calentando a 65° C durante 5 minutos. Posteriormente se separó por electroforesis en agarosa al 1.2% en MOPS 1x, adicionado con formaldehído al 2.4%. Al amortiguador de corrida se le agregó formaldehído al 0.24 %.

El ARN separado por electroforesis se transfirió por capilaridad a membranas de nylon en solución de SSC 5x (NaCl 0.75 M, citrato de sodio 0.075 M, pH 7.0) y se

entrecruzó por irradiación con luz UV, durante 3 minutos. Las membranas se incubaron 2 horas en solución de hibridación (BSA al 1%,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.5 M y SDS al 7%) a 65° C para luego trasladarlas a solución de hibridación nueva con 10 ng de sonda marcada, previamente desnaturalizada. La temperatura de hibridación fue de 60° C para W6 y 65° C para CryIII, durante un tiempo aproximado de 18 horas. La señal se reveló de acuerdo con las instrucciones del "kit" de marcaje y se analizó mediante el uso de un equipo Storm (Molecular Dynamics)

### 3. RESULTADOS

De acuerdo con reportes previos (García-Horsman et al, 1994), la citocromo oxidasa  $caa_3$  de *B cereus* se expresa diferencialmente de acuerdo con la etapa de crecimiento y las condiciones de cultivo (Lauraeus et al, 1991). Dado que *B cereus* y *B thuringiensis* son dos especies que guardan una estrecha relación filogenética, se decidió determinar la presencia de  $caa_3$  en ésta última, con el propósito de usarla como modelo para el análisis de expresión genética; y para ello se realizó un análisis espectrofotométrico de las membranas de *B thuringiensis* obtenidas en las etapas vegetativa y esporulante.

En la figura 3.1 se muestran los resultados de este análisis, y en ella se puede observar la presencia de un máximo de absorción a los 600.7 nm en el espectro hecho con membranas de células vegetativas, correspondiente a la señal característica de la oxidasa  $aa_3$ . En contraste, las membranas esporulantes muestran un corrimiento del pico hasta los 603 nm, lo cual indica fuertemente la presencia de  $caa_3$  en esta etapa; también, se observa un incremento en la absorbencia a 547 nm, la cual puede estar relacionada con un incremento de la cantidad de citocromos del tipo c asociados a la membrana.

Para poner en claro la diferencia entre las señales correspondientes a ambas oxidasas (600 y 604 nm) se analizaron los espectros reducido menos oxidado de las membranas de las células esporulantes, mediante el uso de agentes reductores que donan electrones a diferentes niveles de la cadena respiratoria bacteriana. Estos fueron: a) ascorbato, que reduce preferentemente a los citocromos c, y b) ditionita, que es un reductor fuerte que no discrimina entre los tipos de citocromo presentes en la cadena. En la reducción con ascorbato se observa un máximo a los 602.8 nm (figura 3.2B) mientras que en el espectro con ditionita el máximo se encuentra a los 600.1 nm (figura 3.2B). La última de estas señales es propia del citocromo  $aa_3$ , aunque la otra al parecer no corresponde por completo a la oxidasa  $caa_3$ . Si se hace una resta de ambos espectros, se obtendrá un patrón que resalta a aquellas especies que fueron reducidas preferentemente

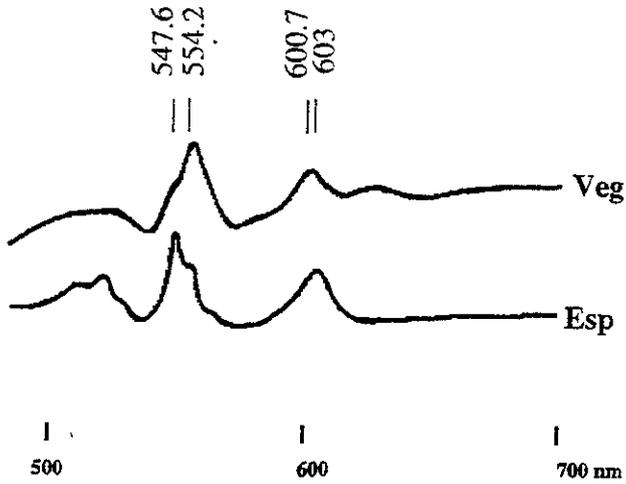


Figura 3.1. Análisis espectral de las membranas de *Bacillus thuringiensis*. Se muestran los espectros reducidos menos oxidado de las membranas obtenidas de cultivos en fase vegetativa (Veg) y en fase esporulante (Esp). Se observa un corrimiento hacia el rojo en el máximo para la oxidasa terminal en las membranas esporulantes.

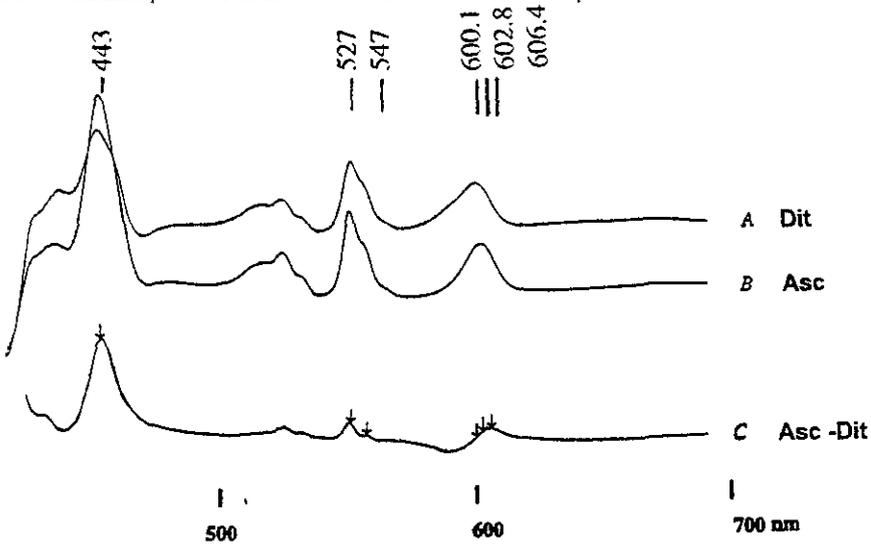


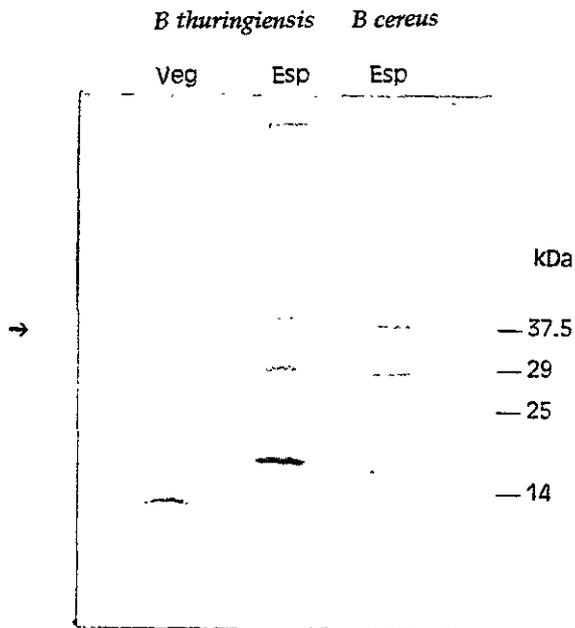
Figura 3.2. Espectro diferencial de las membranas esporulantes de *Bacillus thuringiensis*. Espectro reducido menos oxidado de A) membranas reducidas con ditionita, B) membranas reducidas con ascorbato y C) B-A. Se observa una fuerte señal a los 606 nm, que corresponde a la oxidasa *caa3*.

con ascorbato. En el espectro diferencial que se muestra en la figura 3.2 C, en donde se observa un pico muy corrido hacia el rojo: en 606.4 nm que corresponde a la oxidasa  $caa_3$ , pero que estaba oculto en el espectro con ditionita, debido a que la reducción indirecta de  $aa_3$  por el ascorbato dio lugar a la suma de ambos máximos, lo que dió como resultado una señal intermedia a 602.8 nm. De aquí se desprende que en las membranas esporulantes de *B thuringiensis* están presentes ambos tipos de oxidasa.

De acuerdo con los resultados espectrofotométricos, el patrón de expresión de ambas oxidasas es muy semejante a lo reportado para *Bacillus cereus*. No obstante, se buscó la corroboración de estos datos mediante la detección de la subunidad II de la oxidasa  $caa_3$  en las membranas de las células en los estados vegetativo y esporulante. Lo anterior se consiguió, mediante una tinción específica para los citocromos de tipo c, en una electroforésis de las proteínas membranales totales. Para ello, se obtuvieron membranas de células en ambos estados y se digirieron con SDS y mercapto-etanol; la porción soluble se separó en geles de PAGE-SDS, para después teñirse con tetrametilbencidina, que revela sólo a aquellas proteínas cuyo grupo hemo permanece unido, aún después del proceso de digestión. Tales grupos hemo son exclusivamente los del tipo C, pues son los únicos que forman enlaces covalentes con el polipéptido.

En el carril correspondiente a la etapa esporulante de la figura 3.3, se observa claramente la presencia de un polipéptido que se ubica en la misma posición que la subunidad II de la oxidasa  $caa_3$  de *Bacillus cereus*: cerca de los 37 kDa, según lo reportado por Garcia-Horsman y colaboradores en 1991. En el carril correspondiente a la etapa vegetativa este polipéptido no está presente. Por lo demás, también se observa que el nivel general de citocromos tipo c en las células vegetativas es más bajo, lo cual también coincide con lo reportado previamente en la literatura y con los datos espectrofotométricos que aquí se han presentado. Con todo ello se puede concluir que en *B thuringiensis* la oxidasa  $caa_3$  también se expresa diferencialmente de acuerdo con la etapa de crecimiento.

Con base en los resultados anteriores se prosiguió al análisis del patrón de expresión del ARNm correspondiente a la citocromo oxidasa  $caa_3$ . Para ello, se diseñó



**Figura 3.3. Citocromos tipo c de *Bacillus thuringiensis*.** Aquí se muestra la tinción con bencidina de las proteínas membranales totales separadas por electroforesis en PAGE-SDS. En el carril derecho se corrieron como control las proteínas membranales de *B. cereus*, donde se detectan polipéptidos de 37.5, 29, 25 y 14 kDa cuya identidad ya ha sido determinada (Del Arenal et al, 1997). Los otros carriles corresponden a las proteínas membranales de *B. thuringiensis* en etapa esporulante (al centro), y en etapa vegetativa (a la derecha). Se puede observar que el polipéptido de 37 kDa no se detecta en las membranas de etapa vegetativa de *B. thuringiensis*, pero si está presente en las esporulantes.

una estrategia que se muestra en la figura 3.4 que permitiría, en principio, detectar la presencia de un gen homologa a *ctaD* en *B. thuringiensis*, y posteriormente analizar el

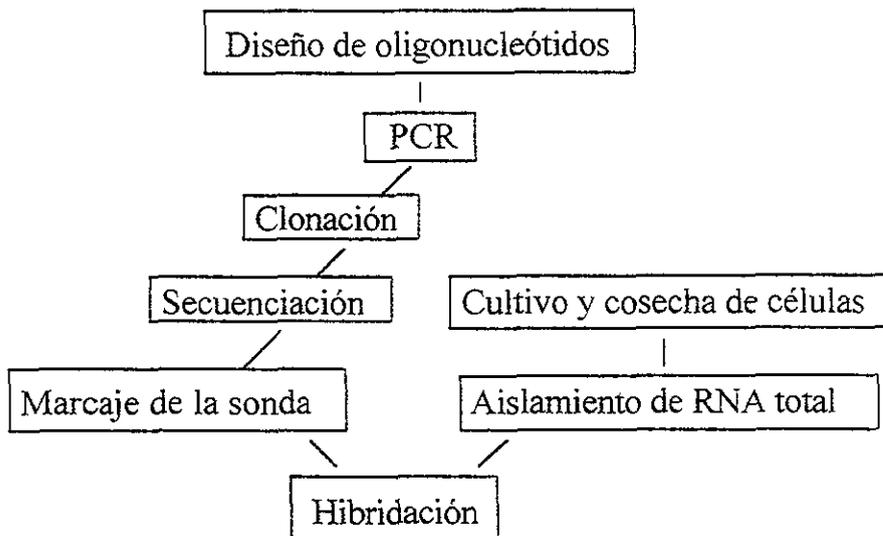


Figura 3.4. Diseño experimental

patrón de expresión temporal, con el uso de una sonda homóloga en experimentos de tipo Northern. Se decidió abordar el problema mediante la amplificación por PCR, debido a que en principio no se cuenta con un banco genómico de *Bacillus thuringiensis* que facilite obtener un fragmento con la mayor parte de los genes del operón. Por otro lado, aunque éste existiera, habría que tener también una sonda suficientemente específica para detectar la clona correspondiente, sin riesgo de una hibridación cruzada con secuencias genéticas distintas. En el sentido inverso, si se pudiera utilizar una sonda heteróloga para la detección del gen, previo a la clonación, habría que encontrar la forma de clonar el fragmento detectado. De este modo la amplificación de un fragmento del gen cumple con la doble intención de generar un fragmento específico que puede servir como base para avanzar en la secuenciación del operón y como herramienta para la hibridación con el ARNm

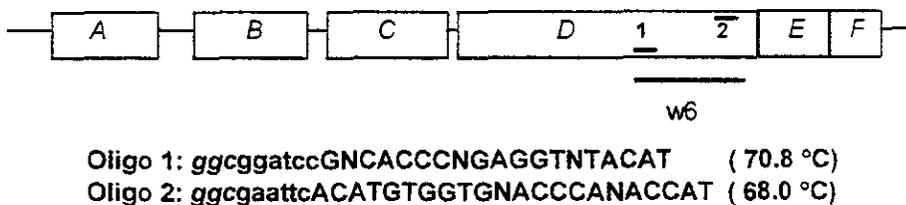
Antes de llegar a la detección del ARN, se valoraron diversos enfoques para definir la estrategia más adecuada en los pasos previos. Inicialmente se pensó en el gen *ctaC*, de la subunidad II de la oxidasa, como el mejor candidato para un análisis que mostrara específicamente la expresión de *caa3*; pues al amplificar un fragmento conformado por las dos regiones de la proteína: la parte homóloga a *aa3* más el dominio del citocromo c fusionado, se obtendría inequívocamente un amplificado propio de *caa3*. Para diseñar los oligos se procedió al alineamiento y análisis de diversas secuencias de oxidasas terminales para definir los sitios más conservados de la enzima.

Como resultado del análisis se construyó un modelo de la estructura de la subunidad II en la membrana y se diseñaron los oligonucleótidos idóneos. Sin embargo, el error de este enfoque consistió en tomar como base la secuencia consenso de una subunidad cuyo nivel de conservación es demasiado bajo (16%), lo cual forzó la elección de los sitios con un nivel de conservación mayor al 80 %, como molde para los oligos. En consecuencia la diferencia en el punto de fusión de cada oligo fue de varios grados, y el nivel de severidad en la temperatura de alineación del PCR tenía que ser bajo, lo que originó gran cantidad de alineamientos inespecíficos.

Aún cuando se lograron establecer las condiciones adecuadas para enriquecer el fragmento deseado: la necesidad de eliminar a los fragmentos “contaminantes”, para evitar que interfirieran con la identificación de la colonia correcta durante la clonación, condujo al empleo de diversos métodos de purificación del fragmento que dificultaron el proceso de clonación.

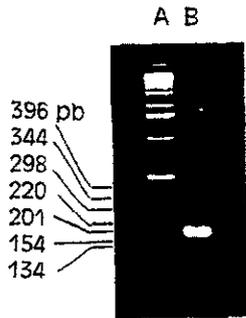
En busca de facilitar el proceso se modificó la estrategia y se decidió utilizar al gen *ctaD* (subunidad I) como punto de partida para la clonación y secuenciación del operón *caa3*. La ventaja del uso del gen *ctaD*, es al mismo tiempo una limitante. Por un lado el alto nivel de conservación que existe entre todas las subunidades principales de la familia de las oxidasas hemo cobre (en este caso mayor al 60%), permite un mayor intervalo para la elección de sitios conservados para el diseño de oligonucleótidos con puntos de fusión semejantes, y por otro, favorece la posibilidad de amplificar múltiples genes que no correspondan a la enzima que se busca, por ejemplo *aa3*. No obstante, esta posibilidad se ve disminuida si se toma en cuenta el alto nivel de severidad con que se

puede trabajar, aunado a que la elección de los sitios se basó en las secuencias utilizadas por otros autores en la detección de este gen en otras especies. Los oligos utilizados se diseñaron con base en las secuencias utilizadas por Quirck y colaboradores en 1993, para la amplificación de un fragmento del gen *ctaD* en *Bacillus firmus* y que a su vez habían sido utilizados por Saraste y colaboradores en 1991 para la detección de este mismo gen en *Bacillus subtilis*. La secuencia final de los oligonucleótidos utilizados puede apreciarse en la figura 3.5: Los sitios menos conservados en los genes cuya secuencia ya se ha reportado, se resaltan con una letra N, señalando que estos oligos son degenerados en tales posiciones. Además de esto, se adicionaron sitios de reconocimiento para enzimas de restricción en el extremo 5' de ambos oligos, con la finalidad de facilitar los procedimientos de clonación que se llevarían a cabo posteriormente: también, al inicio de cada uno de estos sitios se incluyó una secuencia de tres nucleótidos (*ggc*) para permitir el posicionamiento adecuado de las enzimas de corte a utilizar.



**Figura 3.5. Oligonucleótidos diseñados.** En la parte superior de la figura se muestra la ubicación de los sitios de unión de los oligos 1 y 2 al gen *ctaD* y la barra representa el fragmento que amplifican. La secuencia de los oligos se muestra en dirección 5' a 3'. Los nucleótidos señalados con letras minúsculas son aquellos que se añadieron como sitios de corte para las enzimas BamHI (oligo 1) y EcoRI (oligo 2) y las letras cursivas son nucleótidos que se adicionaron para mejorar la unión de las enzimas. Entre paréntesis se indica la temperatura de fusión calculada para cada uno de ellos.

Se realizaron varios experimentos de amplificación por PCR con a los oligos 1 y 2, hasta conseguir un fragmento único de aproximadamente 150 pb (figura 3.6). Las condiciones finales se describen en detalle en la sección de Materiales y Métodos.



**Figura 3.6. Amplificación por PCR de un fragmento del gen *ctaD* de *Bacillus thuringiensis*.** Electroforesis en gel de agarosa al 1% del producto de PCR obtenido a partir de ADN total utilizando los oligonucleótidos 1 y 2. Se observa una banda cercana a los 160 pb. A) Marcador de tamaños moleculares. B) Producto de PCR.

aunque es importante señalar que la temperatura de alineamiento fue de 58 grados centígrados, que es lo bastante alta para brindar confiabilidad en cuanto a la especificidad de la amplificación.

Después de asegurarse de la reproducibilidad de los resultados, se probaron sin éxito diversos métodos para la purificación, corte y ligación del fragmento de amplificación con el vector comercial “Bluescript”. Finalmente, se aplicó una estrategia de clonación basada en la propiedad que presentan algunas ADN polimerasas, como la Taq, de adicionar una adenina libre en el extremo 3' de la cadena recién sintetizada. Para ello se utilizó al vector comercial “PCR<sup>TM</sup>” que contiene una timina en el extremo 5' de ambas cadenas. Con el uso de este método se obtuvieron 17 colonias transformantes positivas (blancas en el ensayo de  $\beta$ -galactosidasa).

Se extrajo el plásmido de las colonias transformantes y al corte con EcoRI se liberó en 10 de ellas un fragmento de 160 pb aproximadamente. Estas clonas se guardaron y se usó una de ellas: W6 para la secuenciación. La secuencia obtenida se muestra en la figura 3.7, en la cual se presenta una comparación del fragmento clonado con una región del gen *ctaD* en *B subtilis*. De esta comparación se puede concluir que en efecto, el fragmento que se amplificó corresponde a una región de un gen homólogo a *ctaD* en *B thuringiensis*.

Es pertinente mencionar que una vez que se contó con la sonda de 160 pb se intentó construir una biblioteca genómica parcial para obtener la secuencia nucleotídica

```

w6  GACCCGGAGGTTTACATTNNNNN-NNNNNNNNNTTCGGAATATTCTCAGAGANNNNNTTCG
Bs  C.....A.....CTATT-TTACCAGCA....T..T.....GATT....
PS3 C.....A..C.....CCTTGTCTTGCCGGCG....C..T.....G..A--ATT....
Bf  C....T.....A..T..CTTAGTATTGCCGGCA.....G..TA.T..T..A--GTTA.TC

w6  CAACANNNNNGAAAAACGATTGTTTGGTTATCCATCGATGGTGGTTGCGACTGTATTAA
Bs  .....TTCTCT.....G..T.....A..T..G.....A.....A.....T....
PS3 .G..GTTCTC.CGC..G..GC....C.....T.G..A.....A..G..GC.T.
Bf  ..G.TTTCTCA.G...G..TC.A.....A.AG.....A..C..T..AA.GA.C.

w6  TTGGATTTTtaggattTATGGTATGGGTCCACCACATGTTT
Bs  .T.....T.....G.....T.....
PS3 ...CT..C....G..C.....G.....T...A.A
Bf  ...C...C.....C.....T.....T.....

```

Figura 3.7. Comparación de las secuencias de los genes para la subunidad I de la citocromo oxidasa *caa3* de tres especies distintas del género *Bacillus*, contra la secuencia del fragmento amplificado (w6). Bs: *B. subtilis* gen *ctaD*, número de acceso al Genbank D85547 (Fukumori et al. 1996). PS3: *B. stearothermophilus* PS3 gen *caaB*, número de acceso al Genbank D11038 D00245 (Sone et al. 1988). Bf: *B. firmus* gen *ctaD*, número de acceso al Genbank M94110 (Quirk et al, 1992). La secuencia del fragmento w6 se muestra en negritas, y debajo de ellas se muestra el alineamiento de las secuencias antes mencionadas. Los nucleótidos que ocupan la misma posición respecto a la secuencia de w6 se marcan con un punto; y las letras señalan las diferencias. Los huecos que se introdujeron para optimizar el alineamiento se indican con un guión.

completa de los genes de *caa3*, en *B. thuringiensis*; no obstante, al parecer todos los procesos de purificación del ADN a partir de agarosa disminuyeron fuertemente la posibilidad de ligar los fragmentos a un vector, por lo que no se avanzó más en esta parte del proyecto.

Con el fragmento amplificado correspondiente a *ciaD* de *B. thuringiensis*, se procedió luego a la determinación del patrón de expresión del ARNm durante el ciclo de vida de la bacteria. Para ello se realizaron cultivos de *B. thuringiensis* en medio fermentable (medio G), y se eligieron cuatro puntos en la curva de crecimiento: el crecimiento logarítmico, el inicio de la etapa estacionaria y dos puntos propios de la esporulación temprana. Las células en etapa logarítmica se cosecharon a las 4 horas de iniciado el cultivo, con una densidad aproximada de 160 unidades Klett (UK), el punto de inflexión de la curva de crecimiento; justo cuando el crecimiento deja de ser exponencial, se toma como  $t_0$  (205 UK) y tiempos de 2 y 4 horas después corresponden a  $t_2$  y  $t_4$  ( figura 3.8). Posteriormente se extrajo el ARN total de las células cosechadas, se cuantificó y se separó por electroforesis en condiciones desnaturalizantes. El ARN separado se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon, y se utilizó para los experimentos de hibridación con las sondas correspondientes.

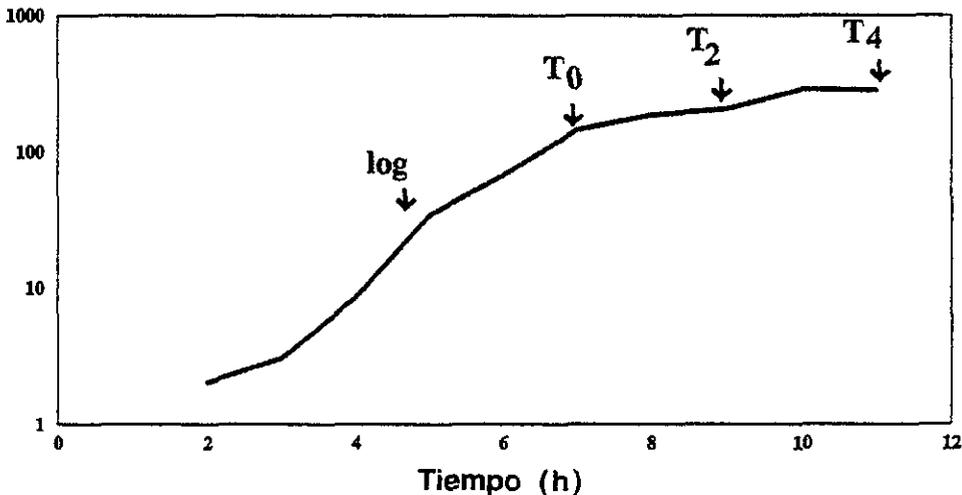
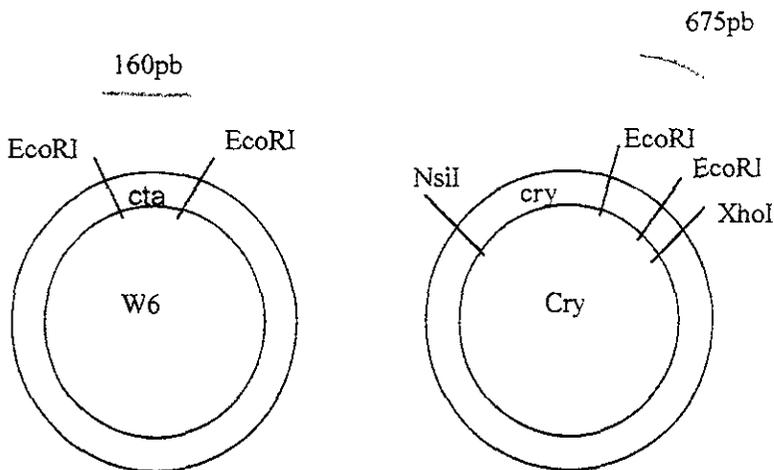


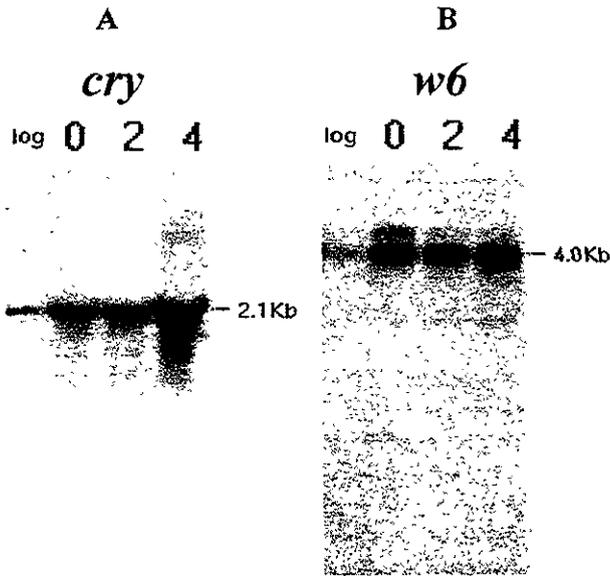
Figura 3.8. Tiempos de cosecha para la extracción de ARN. En la gráfica se muestra la curva de crecimiento de *B. thuringiensis* cultivado en medio fermentable. Las flechas indican los tiempos de cosecha: log = crecimiento logarítmico; T2 y T4 significan 2 y 4 horas después de T0.

Las sondas que se utilizaron fueron: W6 y CryIII (figura 3.9). La primera de ellas es precisamente el fragmento de 160 pb amplificado por PCR (ctaD de *Bacillus thuringiensis*); y la segunda es un fragmento de 675 pb, correspondiente al gen cryIIIa de *B. thuringiensis*, que se utilizó como control de expresión, debido a su alto nivel de transcripción y a su bien conocida regulación temporal.



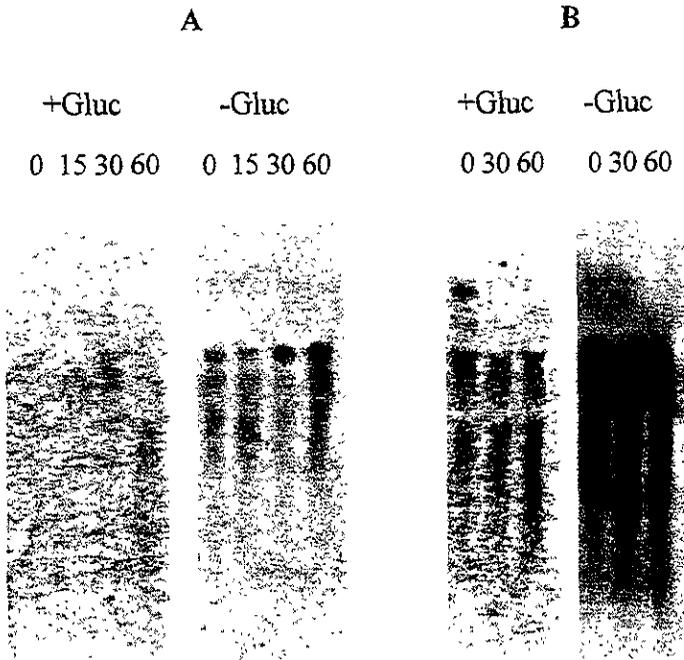
**Figura 3.9. Sondas utilizadas para ctaD y cryIII.** En la figura se observa un esquema de los plásmidos W6 y Cry, de los cuales se obtuvieron las sondas W6 y CryIII respectivamente, al corte con EcoRI.

Los resultados de la hibridación se muestran en la figura 3.10: En la parte A se muestra el resultado de la hibridación del ARN total con la sonda CryIII; se puede observar que en las células en etapa logarítmica se detectan niveles bajos de ARN los cuales crecen de manera exponencial, a partir del tiempo 0. Este patrón coincide con lo reportado para este gen (Salamitou et al. 1996), cuyo mensajero está presente, aunque en niveles bajos, desde dos y hasta una hora antes del inicio de la esporulación (t-2) y se activa a partir del inicio de la fase estacionaria con su máximo en t5.



**Figura 3.10. Expresión de *ctaD* en medio fermentable.** En la parte A, se muestra el resultado de la hibridación contra *cryIII* y en la parte B, la hibridación contra W6. En ambos casos se observa un incremento en la señal conforme avanza la etapa estacionaria.

En la parte B de la figura 3.10, se observa prácticamente el mismo patrón de expresión: niveles muy bajos de una banda de 4 kilobases (kb) en la etapa logarítmica, que se incrementan (aunque tal vez no de manera exponencial), conforme se avanza en la esporulación. Debe resaltarse que a diferencia del gen *CryIII*, el *ctaD* es un gen que se expresa a niveles mucho menores, por lo que el nivel de detección será necesariamente más bajo. Además, se observa una banda tenue por encima de la banda de 4 kb cuyo tamaño debe ser cercano a los 5 kb. Esta segunda banda presenta, al parecer, una regulación temporal diferente, con un máximo en el tiempo 0 y un descenso gradual conforme se avanza en la esporulación. La banda de 4 kb corresponde perfectamente con el tamaño esperado si el operón se transcribe desde *ctaC* hasta *ctaF* (Wachenfeldt y Hederstedt, 1992), y se expresa de acuerdo con lo observado en los datos bioquímicos presentados con anterioridad. Por su parte la banda superior de origen incierto, podría



**Figura 3.11. Expresión de *ctaD* en medios fermentable y no-fermentable.** Se muestran los resultados del Northern Blot utilizando las sondas W6 (parte A) y CryIII (parte B). El medio fermentable se indica como +Gluc (con glucosa) y el medio no fermentable se indica como -Gluc (sin glucosa). El tiempo de cosecha después de la resuspensión se indica en minutos: 0, 15, 30 y 60

corresponder a un segundo transcrito a partir del gen *ctaB* en el mismo operón. Quirck y colaboradores (1991) obtuvieron resultados similares para *Bacillus firmus*, pero la evidencia no es definitiva.

Los resultados anteriores mostraron que a diferencia de lo que se esperaba, *ctaD* de *Bacillus thuringiensis* no es un gen exclusivo de la esporulación, puesto que se detecta desde la fase de crecimiento exponencial. No obstante, el nivel de expresión en esta etapa fue muy bajo, por lo que tal resultado podría deberse a una falta de sincronía en el estado fisiológico de las bacterias de la población en cultivo. Se decidió entonces modificar el método de inducción de la esporulación por otro que asegure la sincronía de las células en cultivo. El método de resuspensión consiste en cultivar a las bacterias en un medio rico.

hasta una densidad óptica propia de la etapa logarítmica media, y cosecharlas por centrifugación para resuspenderlas en un medio pobre que induce la esporulación de manera sincrónica. La hibridación se llevó a cabo con el ARN total extraído de las células cosechadas a los tiempos 0 (logarítmico), 15, 30 y 60 minutos. Además, se hicieron cultivos en medios fermentable y no fermentable con la intención de comparar los niveles de expresión en ambos medios con base en lo reportado para *Bacillus subtilis* (Saraste et al, 1991).

En la parte A de la figura 3.11 se muestran los resultados obtenidos con las células cultivadas en medio con glucosa: la sección de la izquierda corresponde a la hibridación contra W6 y la de la derecha contra cryIII. Se puede apreciar claramente un incremento gradual en la señal para cryIII desde la fase logarítmica hacia las etapas posteriores; un patrón semejante se observa para el gen *ctaD*, aunque debido a la degradación del ARN extraído y a los niveles bajos de transcripción, no es posible hacer una distinción clara en el tiempo de activación del gen. Sin embargo, en el medio no fermentable (parte B) es claro que el mensajero de *ctaD* está presente y en grandes cantidades desde la etapa logarítmica, lo cual confirma definitivamente que el gen se puede expresar aún desde la etapa logarítmica de crecimiento y que su activación no sólo depende de las señales fisiológicas de la esporulación, sino del estado nutricional de la bacteria.

#### 4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.

El análisis detallado de la cadena respiratoria bacteriana, permite una comprensión más profunda de los mecanismos que subyacen a la adaptación fisiológica de las células, a las distintas condiciones de tensión metabólica a las que están sujetas. Uno de los periodos más críticos en la adecuación de los recursos metabólicos de algunas células bacterianas, es la transición de la etapa de crecimiento vegetativo a la etapa de esporulación, en la que las bacterias adquieren un estado diferenciado que presenta requerimientos bioenergéticos distintos (Escamilla et al, 1986).

En *Bacillus cereus* se observa una acumulación de la oxidasa terminal  $caa_3$  durante las fases iniciales de la esporulación (García-Horssman et al, 1991). Esta enzima, que parece no aportar alguna ventaja fisiológica a la célula, está distribuida a través del género *Bacillus* y se acumula en las membranas bajo condiciones muy diversas, aunque todas ellas con el común denominador de representar condiciones de tensión metabólica. De esta forma, la citocromo oxidasa  $caa_3$  podría tener un papel fisiológico relevante que debe ser definido. Una de las aproximaciones a este estudio es el análisis de la expresión de los genes que la codifican, lo cual puede arrojar información sobre los mecanismos que la regulan y sobre los procesos fisiológicos con que se relaciona.

En este sentido se decidió analizar el patrón de expresión del gen que codifica para la citocromo oxidasa  $caa_3$  en *Bacillus thuringiensis* con la finalidad de establecer un modelo para el estudio de la regulación genética de esta enzima. Dicho modelo presenta las ventajas de a) poseer una amplia gama de herramientas genéticas previamente desarrolladas; b) de tener bien caracterizado el patrón de expresión de algunos genes (especialmente *cry*); c) de concentrar un gran interés biotecnológico; y d) de ser un pariente muy cercano de *Bacillus cereus*, con lo cual prácticamente se tienen por conocidos muchos de los rasgos bioquímicos de su cadena respiratoria.

Inicialmente hubo que verificar la presencia de la enzima en las membranas de *Bacillus thuringiensis*, mediante el análisis de sus firmas espectrales y por la detección de sus componentes polipeptídicos. De acuerdo con los resultados, la oxidasa  $caa_3$ , con un máximo de absorción cercano a los 605 nm. en espectro reducido menos oxidado, se detecta sólo en las membranas de las células esporulantes. Por otra parte la subunidad II

característica de la enzima no se observa en las membranas de las células vegetativas, pero sí está presente en la etapa esporulante, acompañada por un incremento en el nivel total de citocromos del tipo C. Estos datos indican que la presencia de la enzima en las membranas de *B thuringiensis* sigue el mismo patrón que se observa en *B cereus* (García-Horsman et al, 1991), lo que sugiere que la citocromo oxidasa  $caa_3$  es una enzima asociada con la esporulación.

### ***Bacillus thuringiensis* posee un gen homólogo a *ctaD***

La presencia de un polipéptido cercano a 35 kDa con un hemo tipo C unido covalentemente, característico de  $caa_3$  (Del-Arenal et al, 1997), confirmó la presencia de la proteína en las membranas, aunque su identidad precisa, debía esperar a ser corroborada por medio de la detección del gen correspondiente (ver figura 3.3). Se buscó entonces localizar a los genes del operón *cta* (citocromo oxidasa) que codifican para las subunidades catalíticas y proteínas accesorias de  $caa_3$ . Aunque la subunidad distintiva de esta oxidasa es la número II, se eligió a la subunidad I por ser la que presenta el mayor nivel de conservación (Saraste, 1990). Los resultados de la amplificación, clonación y secuenciación de un fragmento que asemeja al gen *ctaD* (subunidad I de  $caa_3$ ), indicaron la presencia de un gen homólogo en *B thuringiensis* y sirvieron como punto de partida para el análisis de la expresión a nivel genético. Es importante aclarar en este sentido que no existen reportes previos sobre la detección ni la caracterización bioquímica o genética de la oxidasa en esta especie.

### **El ARN mensajero del gen *ctaD* se acumula durante la etapa estacionaria.**

Como se planteó inicialmente, la citocromo oxidasa  $caa_3$  de *B thuringiensis* mantiene el mismo patrón de expresión temporal observado en *B cereus*. Esto significaba, en principio, que las mismas hipótesis podrían ser válidas para este modelo, es decir, que la oxidasa  $caa_3$  es una enzima específica de la esporulación.

Como se sabe, la esporulación es un proceso altamente regulado; la presencia de los polipéptidos componentes de la enzima, su firma espectral, o aún su actividad enzimática, no identifican el momento exacto en que la célula inicia su síntesis y no nos

permiten correlacionar su activación con el proceso fisiológico en curso. La activación de una enzima ocurre propiamente cuando se inicia la transcripción de sus genes. Por esta razón, es importante hacer un análisis del patrón de expresión temporal de los genes de la enzima por medio de la detección de su ARNm en experimentos de Northern blot.

Los resultados al respecto mostraron que el ARN mensajero de la enzima está presente ya desde la etapa logarítmica de crecimiento (figura 3.10). Se detectaron dos bandas de hibridación: la primera con un tamaño de 4 kb que corresponde al fragmento esperado y otra ligeramente mayor de la cual se hablará posteriormente. La intensidad de la banda de 4 kb refleja la cantidad de mensajero presente y muy probablemente el nivel de transcripción del gen *ctaD*, en el momento de la cosecha y bajo esas condiciones de cultivo. De aquí se desprende que el gen se encuentra activo en esta etapa, aunque sea a niveles bajos y que es muy probable que no sea dependiente del estado de diferenciación.

No obstante, lo anterior no invalida los resultados previos, puesto que al tiempo 0, es decir, al inicio de la fase estacionaria, se da un incremento muy importante en el nivel del mensajero, que prosigue en etapas posteriores ( $t_4$ ). Esto significa dos cosas: que el *ctaD* sigue efectivamente un patrón de expresión temporal, que lo lleva a mantener niveles mayores de  $caa_3$  durante la esporulación, o bien su ARN mensajero se degrada menos durante esta etapa. Si lo anterior es cierto, la carencia de  $caa_3$  en la fase vegetativa, observada con los experimentos anteriores, se debe al nivel de resolución de los mismos, que llevan a la detección de la enzima, sólo cuando su concentración ha alcanzado un cierto valor crítico.

Al comparar el patrón de expresión de *ctaD* con el de *cryIIIA* se observa una notable semejanza. El gen *cryIIIA* es un gen propio de la fase estacionaria, que no depende de las señales de esporulación para transcribirse pero que multiplica su actividad poco antes del  $t_0$  hasta alcanzar una expresión máxima durante la formación de las preesporas (Salamitou et al. 1996). Dada esta semejanza se podría pensar que *ctaD* está regulado por mecanismos similares a los que regulan a *cryIIIA*.

*ctaD* de *Bacillus thuringiensis* se induce por la composición del medio de crecimiento.

La razón para pensar que *ctaD* es un gen de fase estacionaria, es que su síntesis se inicia antes de la transición a la etapa esporulante, pues el ARN extraído pertenece a células cosechadas aproximadamente 1.5 horas antes del t0. Esto también se cumple para *cryIIIa*, y sin embargo con los resultados iniciales no se sabía si la síntesis del mensajero se inicia antes, es decir, durante el crecimiento logarítmico temprano. Cabe entonces la posibilidad de que la señal que se detecta en la fase logarítmica, se deba a una falta de sincronía en el estado fisiológico de las bacterias de la población, aún cuando se hicieron diluciones continuas para evitarlo. Para aclarar este punto se utilizó el método de resuspensión para inducir la esporulación (Sterlini y Mandelstam, 1969). Las células recién resuspendidas (en frío) corresponden a células en etapa logarítmica temprana o media; pero cuando se regresan a la temperatura de crecimiento, estas bacterias responden a la carencia de nutrientes esporulando. En este caso las bacterias mostraron, de nuevo, un patrón de expresión similar al de *cryIIIa*, y similar al de los experimentos anteriores, con niveles muy bajos al tiempo 0 (momento de la resuspensión) y un incremento continuo y casi inmediato hacia los tiempos posteriores (figura 3.11). El nivel de la señal para *ctaD* en este experimento fue muy bajo y poco evidente por la degradación del ARN; sin embargo, ya se alcanza a distinguir una señal a los 60 minutos, lo que sugiere que también aquí se repitió el patrón anterior, aunque sin permitir la definición de la presencia del mensajero en la etapa logarítmica.

Afortunadamente este experimento se realizó por duplicado, y se analizó el crecimiento en dos medios de composición distinta: un medio fermentable, como en el experimento inicial, y uno no fermentable que adicionaría datos sobre la posibilidad de que el *ctaD* de *Bacillus thuringiensis* también fuera regulado por la composición del medio de cultivo como en *Bacillus subtilis*. Los resultados en el medio sin fuente fermentable fueron completamente distintos. Por una parte no sólo se observó al ARNm desde la etapa logarítmica (tiempo 0), sino que el nivel de expresión fue muy alto, inclusive mayor que en etapas posteriores. Esto llevó a concluir que el *ctaD* también está

regulado por la fuente de carbono y a concluir que definitivamente su regulación no depende directa o exclusivamente de la esporulación.

Los genes de esporulación son dependientes de sigma H, cuya síntesis es uno de los primeros acontecimientos de este proceso y ocurre por medio de Spo0A fosforilado (Perego et al, 1994). Al detectar *ctaD* desde la fase estacionaria queda implícito que su síntesis puede ocurrir a partir del factor sigma de fase vegetativa, es decir, sigma A, lo cual podría confirmarse mediante un análisis de la región promotora.

La regulación del gen *ctaD* puede verse afectada, entonces, al menos por dos mecanismos distintos: el inicio de la fase estacionaria o la composición del medio de crecimiento; pero ¿que tienen en común ambos estados?

#### ¿Es *ctaD* un gen sujeto a represión catabólica?

El inicio de la fase estacionaria está definido por el agotamiento de nutrientes cuando las bacterias reducen su tasa de crecimiento y se alcanza un equilibrio entre el número de bacterias que se originan y las que se mueren. La presencia de glucosa inhibe cualquiera de los procesos que se desencadenan en la fase estacionaria, excepto el desarrollo de la competencia (Dubnau, 1991), y favorece el estado de división vegetativa. En las bacterias Gram negativas es bien conocido el efecto de represión catabólica que ejercen la glucosa y otros azúcares de fácil asimilación disponibles en el medio de crecimiento (Hueck y Hillen, 1995). La esporulación es sin duda una respuesta a las condiciones de tensión nutricional a las que se enfrenta la bacteria durante esta etapa, y sin embargo, no es la única ni la más inmediata de las respuestas a la condición de ayuno, antes se inicia la formación del flagelo o la síntesis de enzimas hidrolíticas, que capacitan a la célula para sobrevivir ante las nuevas condiciones sin necesidad de esporular.

La presencia de *caa<sub>3</sub>* en bacterias de ambientes extremos como *Thermus thermophilus*, *Bacillus stearothermophilus* (termófilas) o *Bacillus firmus* (alcalófila), la relaciona con condiciones de tensión metabólica. Las únicas especies mesófilas en las que se ha detectado esta enzima son *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* y ahora *Bacillus thuringiensis*. La presencia de *caa<sub>3</sub>* puede estar relacionada, entonces, más que con la etapa de diferenciación, con la condición de tensión nutricional que representa la

esporulación. Si bien la composición del medio de crecimiento no fermentable que se usó en estos experimentos, está muy lejos de ser equivalente a una condición de ayuno, las señales para la activación de cierto número de genes que permiten el crecimiento con fuentes de carbono alternativas deben ser las responsables de su activación.

La represión catabólica es el candidato más fuerte como mecanismo de regulación de *Cta*. En *Bacillus* la carencia de glucosa no "activa" pero sí permite la expresión de cierto número de genes, al facilitar la transcripción de los genes reprimidos por el complejo Cpp-(Hpr-Ser-P) (Hueck y Hillen, 1995). De esta forma, la transcripción de *cta* podría no ser una respuesta directa, sino una consecuencia de la falta de represión inducida por la falta de intermediarios glucolíticos; la misma hipótesis también podría explicar los niveles altos de transcripción de *cryIIIA*. Sin embargo, esto va en contra de la lógica de optimización de recursos, pues incrementaría el gasto energético en una condición poco favorable. Lo anterior da la idea de que podría tratarse de una regulación activa, esto es, cabe la posibilidad de que la oxidasa  $caa_3$  realmente sea necesaria en estas condiciones.

A pesar de todo, la regulación por glucosa no significa que *ctaD* deje de ser un gen propio de la etapa estacionaria. El incremento en la cantidad de transcrito que se observa con el avance de la etapa estacionaria, podría deberse a factores ajenos a la desrepresión. Si se toma como base esta posibilidad, se puede añadir que ya que la transcripción de *ctaD* no depende de la esporulación, como se ha mostrado, entonces debe depender de sigma A. y en consecuencia el incremento gradual de *ctaD* con el avance de la esporulación, sólo sería posible si existiese un segundo promotor reconocido por sigma H. Se sabe que la represión catabólica puede actuar también sobre genes de las etapas estacionaria y esporulante pues hay más de un ejemplo de genes propios de la esporulación que están sujetos a represión catabólica (Strauch, 1995; Bryan et al, 1996). Uno de ellos es SpoVG: un gen dependiente de sigma H que comienza a transcribirse en la etapa estacionaria y cuyo producto se asocia con la formación de las cubiertas protéicas de la espora, pero se reprime en presencia de glucosa o glutamina, para lo cual requiere además la presencia del sistema de fosfotransferasa (que incluye a Hpr) (Bryan et al, 1996).

Otro punto importante de discutir en relación a la hipótesis de la regulación catabólica es el siguiente: En la figura 3.10 se observa la presencia de una banda de menor intensidad localizada por encima de la banda principal de 4 kb. Esta banda tiene un tamaño aproximado de 5 kb, y su máxima expresión se da al tiempo 0, con un descenso gradual en etapas posteriores. En *Bacillus firmus*, Quirk y colaboradores (1993) tuvieron un hallazgo semejante y propusieron un mecanismo de procesamiento postranscripcional para explicar sus resultados. Si se analiza la distribución de los genes en el operón *cta* de *Bacillus subtilis*, se encuentra que todos los que codifican para las subunidades de la enzima se ubican en una unidad policistronica que abarca a los genes *ctaC*, *ctaD*, *ctaE* y *ctaF*; mientras que los genes *ctaA* y *ctaB* se encuentran separados (ver figura 1.2). El extremo 5' del gen *ctaB* se localiza aproximadamente a 1 kb de distancia del mismo extremo en *ctaC*. Esto sugiere que la banda de 5kb corresponde al producto de la transcripción continua de los genes *ctaB* a *ctaF*. Es posible que la banda de 5kb sea procesada para originar un mensajero menor más estable de 4 kb. Siguiendo esta hipótesis, es posible que el aumento que se observa en la cantidad de mensajero se deba a una mayor acumulación del mismo como resultado de su estabilización. Pero, de ser así, debe existir un mecanismo responsable del cambio en el sistema de procesamiento.

Basandose en la similitud de resultados entre el grupo de Quirk y este trabajo, es necesario resaltar algunos puntos que aquel no considera. Dado que *ctaB* es un gen que codifica para una farnesil transferasa que convierte al protohemo IX en hemo tipo O (Saiki et al, 1993) y que con una sola enzima es posible catalizar la conversión de muchos a la vez, es razonable pensar que se requieren niveles bajos de esta enzima para cubrir los requerimientos de síntesis de hemos. De acuerdo con lo anterior se puede pensar que la razón por la cual el mensajero mayor es inestable, es la de evitar la acumulación de los productos de los genes *ctaC-F*, sin bloquear la síntesis de los hemos, los cuales se requieren de forma constitutiva.

Una alternativa es que, si existen dos promotores los cuales responden a señales de regulación más o menos independientes, la manera de evitar la síntesis del fragmento *ctaC-F*, podría ser la formación de asas de terminación al final del gen *ctaB*. De este modo el gen *ctaB* puede estar sintetizándose de manera constitutiva manteniendo al

fragmento *ctaC-F*, en niveles muy bajos. Esto no constituye una posibilidad nueva pues la terminación temprana es un mecanismo que se observa en genes sujetos a represión catabólica (Kruger et al, 1996; Fisher et al, 1994). La antiterminación no siempre es un mecanismo cien por ciento eficiente, especialmente si es independiente de rho, y siempre podrían existir niveles basales del fragmento de 5 kb, lo que podría explicar su detección en estos experimentos; aunque de todos modos se podría explicar en función de una desrepresión doble, al inicio de la fase estacionaria, esto es: se permite la síntesis del fragmento de 5 kb por antiterminación y al mismo tiempo se induce la transcripción a partir del segundo promotor, mediante la desfosforilación de Hpr-Ser-P.

En la parte final de esta discusión se propone la idea de que la citocromo oxidasa *caa<sub>3</sub>* de *Bacillus thuringiensis* es una enzima sujeta a represión catabólica. Los datos que aquí se presentan no apoyan contundentemente esta hipótesis, aunque sirven de base para su postulación. como una alternativa a la hipótesis inicial, para explicar la presencia de esta oxidasa en las etapas finales del ciclo de crecimiento. La argumentación tiene el propósito de plantear algunas de las rutas que se podrían seguirse para explorar a fondo esta posibilidad.

Adicionalmente será necesario en el futuro estudiar la regulación aeróbica del gen. pues en *Bacillus stearothermophilus*, la síntesis de *caa<sub>3</sub>*, depende justamente de la concentración de oxígeno.

Por último queda recalcar la importancia de saber si la presencia de la citocromo oxidasa *caa<sub>3</sub>* está relacionada directamente con la optimización de las capacidades bionenergéticas de la bacteria en condiciones de tensión o si simplemente comparte el mecanismo de regulación de otros genes que sí capacitan a la célula para enfrentar este tipo de condiciones. Y sin embargo es difícil imaginar cómo una enzima asociada tan estrechamente a ellas, ya sea que se exprese constitutivamente o que sea regulada activamente, carezca de un papel relevante para la fisiología bacteriana.

## 5. REFERENCIAS

1. Arredondo-Peter, R., Helman-Meneguzzi, F., Hernández, F. y Escamilla, J. E. (1993), Computer analysis and modelling of a consensus sequence of bacterial cytochrome oxidase subunit II. *Rev Lat Microbiol* 35 (44), 423-432
2. Agaisse, H. y Lereclus, D. (1994), Expression in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus thuringiensis* cryIII<sub>A</sub> toxin gene is not dependent on a sporulation-specific sigma factor and is increased in a spo0A mutant. *J Bacteriol* 176(15), 4734-4741.
3. Basu, A., Yin, M., Waterland, R. A. y Chance, B. (1994), Kinetics of ligand binding of cytochrome oxidases: a comparative study. *Biochim Biophys Acta* 1184, 291-295.
4. Bryan, E. M., Beall, B. W. y Moran, Ch. P. Jr. (1996), A  $\sigma^E$  dependent operon subject to catabolite repression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 178(16), 4778-4786.
5. Carlson, C. R., Johansen, T. y Klosto, A. B. (1996). The chromosome map of *Bacillus thuringiensis* subsp. *canadiensis*. *FEMS Microbiol Lett* 141:2-3, 163-167.
6. Castresana, J., Lübben., M., Saraste, M., y Higgins D. G. (1994). Evolution of cytochrome oxidase, an enzyme older than atmospheric oxygen. *EMBO J* 13 (11), 2516-2525.
7. Del-Arenal, P., Contreras, M. L., Sviatelorova, B. B., Rangel, P., Lledias, F., Dávila, J. R. y Escamilla, J. E. (1997), Haem O and putative cytochrome bo in a mutant of *Bacillus cereus* impaired in the synthesis of haem A. *Arch Microbiol* 167, 24-31.
8. Doi, R. H. (1989), Sporulation and germination. Capítulo 8 en *Biootechnology Handbooks.2 "Bacillus"* Editado por Colin R Harwood. Plenum Press USA.
9. Dubnau, D., Hahn, J., Kong, L., Roggiani, M. y Weinrauch, Y. (1991). Genetic competence as a post-exponential global response. *Develop Biol* 2, 3-11.
10. Escamilla, J. E., Ramírez, R., Del-Arenal, P. y Aranda, A. (1986). Respiratory systems of the *Bacillus cereus* mother cell and forespore. *J Bacteriol* 167 (2), 544-550.

11. Fisher, S. H., Strauch, M. A., Atkinson, M. R. y Wray, L. V Jr (1994). Modulation of *Bacillus subtilis* catabolite repression by transition state regulatory protein AbrB. *J Bacteriol* 176(7): 1903-19012.
12. García-Horsman, J. A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J. y Gennis, R. (1994), The superfamily of heme-copper respiratory oxidases. *J Bacteriol* 176(18), 5587-5600.
13. García-Horsman, J. A., Barquera, B. y Escamilla, J. E. (1991) Two different aa3-type cytochromes can be purified from the bacterium *Bacillus cereus*. *Eur J Biochem* 199. 761-768.
14. Hanson, R. S., Srinivarsan, V. R. y Halvorson, H. D. (1963). Biochemistry of sporulation. *J Bacteriol* 85, 451-460.
15. Harwood, C. R. Ed (1989), *Bacillus*. Biotechnology Handbooks 2. Plenum Press. New York.
16. Hernández, S. F. (1994), Construcción y análisis de una secuencia consenso para la citocromo oxidasa *caa3*, y la búsqueda de su gen (*ctaD*) en *Bacillus cereus*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
17. Hueck, C. J. y Hillen, W. (1995). Catabolite repression in *Bacillus subtilis*: a global regulatory mechanism for the Gram-positive bacteria? *Mol Microbiol* 15(3). 395-401.
18. Kadenbach, B., Stroh, A., Hüther, F. J., Reimann, A. y Steverding, D. (1991). Evolutionary Aspects of Cytochrome c Oxidase. *J Bioenerg Biomem* 23 (2). 231-333.
19. Keim, R., Kalif, A., Schupp, J., Hill, K., Travis, S. E., Richmond, K., Adair, D. M., Hugh-Jones, M., Kuske, Ch. R. y Jackson, P. (1996). Molecular evolution and diversity in *Bacillus anthracis* as detected by amplified fragment length polymorphism markers. *J Bacteriol* 179(3). 818-824.
20. Kroos, L. (1991). Gene regulation in the mother cell compartment of sporulating *Bacillus subtilis*. *Develop Biol* 2, 63-71.
21. Kruger, S., Gertz, S. y Hecker, M. (1996). Transcriptional analysis of *bgI* PH expression in *Bacillus subtilis*: evidence for two distinct pathways mediating carbon catabolite repression. *J Bacteriol* 178(9): 2637-2644.

22. Laemmli, U. K. (1970), Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature (London)*, 227, 680-685.
23. Lauraeus, M., Haltia, T., Saraste, M., y Wikstrom, M. (1991), *Bacillus subtilis* expresses two kinds of haem-A-containing terminal oxidases. *Eur J Biochem* 197, 699-705.
24. Lauraeus, M., and Wikstrom, M. (1993), The terminal quinol oxidases of *Bacillus subtilis* have different energy conservation properties. *J Biol Chem* 268(15), 11470-11473.
25. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951), *J Biol Chem* 193, 265.
26. Mather, W., Springer, P., Fee J. A. (1990), Cytochrome oxidase genes from *Thermus thermophilus*. *J Biol Chem* 266 (8), 5025-5053.
27. Perego, M., Glaser, P. y Hoch, J. A. (1996), Aspartyl-phosphate phosphatases deactivate the response regulator components of the sporulation signal transduction system in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 19(6), 1151-1157.
28. Perego, M., Hanstein, C., Welsh, K. M., Djavakhishvili, T., Glaser, P. y Hoch, J. A. (1994), Multiple protein-aspartate phosphatases provide a mechanism for the integration of diverse signals in the control of development in *Bacillus subtilis* *Cell* 79, 1047-1055.
29. Quirk, P. G., Hicks, D. B., y Krulwich, T. A. (1993), Cloning of the *cta* operon from alkaliphilic *Bacillus firmus* OF4 and characterization of the pH-regulated cytochrome *caa3* oxidase it encodes. *J Biol Chem* 268(1) 678-685.
30. Saiki, K., Moga, T., Ogura, K. y Anraku, Y. (1993), In vitro heme O synthesis by the *cyoE* gene producto from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 134, 115-124
31. Salamitou, S., Agaisse, H., Bravo, A. y Lereclus, D. (1996). Genetic analysis of *cryIIIa* gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol* 142, 2049-2055.
32. Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989), *Molecular cloning a laboratory manual*. 2ª edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press USA.
33. Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. (1977), DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467.

34. Saraste, M. (1990). Structural features of cytochrome oxidase. *Q Rev Biophys* 23, 331-366.
35. Saraste, M., Merso, T., Nakari, T., Jalli, T., Laureaus, M. y Van der Oost, J. (1991). The *Bacillus subtilis* cytochrome-c oxidase. Variations on a conserved protein theme. *Eur J Biochem* 195, 517-525.
36. Some, K., Kuroh, E. y Sato, K. (1990). A cytochrome c-type oxidase of the thermophilic bacterium PS3 grown under air limited conditions. *J Biochem* 107(4), 597-602.
37. Some, N. y Fujiwara, Y. (1991). Haem O can replace haem A in the active site of cytochrome c oxidase from thermophilic bacterium PS3. *FEBS Lett* 228(1,2), 154-158.
38. Some, N., Ogura, T., Noguchi, S. y Kitagawa, T. (1994) Proton pumping activity and visible absorption and resonance raman spectra of a cao-type cytochrome c oxidase from the thermophilic bacterium *Bacillus PS3*. *Biochemistry* 33(4), 849-855.
39. Some, N., Yokoi, F., Fu, T., Ohta, S., Merso, T., Raito, M. y Saraste, M. (1988). Nucleotide sequence of the gene coding for cytochrome oxidase subunit I from the thermophilic bacterium PS3. *J Biol Chem* 103, 606-610.
40. Sterlino, J. M. y Mandelstam, I. (1969). Commitment to sporulation in *Bacillus subtilis* and its relationship to actinomycin resistance. *Biochem J* 113, 29-37.
41. Strajger, P. y Losick, R. (1996). Molecular genetics of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Annu Rev Genet* 30, 297-341.
42. Strauch, M. A. (1995). AbrB modulates expression and catabolite repression of a *Bacillus subtilis* ribose transport operon. *J Bacteriol* 177(23), 6727-6731.
43. Svensson, B., Lubben, M., y Hederstedt, L. (1993). *Bacillus subtilis* CtaA and CtaB function in haem A biosynthesis. *Mol Microbiol* 10 (1), 193-201.
44. Thomas (1976). *Analytical Biochem* 75, 168-176.
45. Vary, S. P. (1994) Prime time for *Bacillus megaterium*. *Microbiol* 140, 1001-1013.
46. Wachenfeldt, C., Hederstedt, L. (1992). Molecular biology of *Bacillus subtilis* cytochromes. *FEMS Microbiol Lett* 100, 91-100.

## Agradecimientos.

Esta sección final de la tesis, que parece intrascendente, es sumamente difícil de escribir. Primero por toda la gente que colaboró en este trabajo con recursos, experiencia, ideas, críticas, sonrisas, angustias, neurosis y años. Luego, porque se escribe en un lenguaje personal y de estilo libre que nadie va a corregir. Por esto quiero advertir que la austeridad de mis razones y la omisión de personajes, obedece más que a la falta de espacio, a mi imposibilidad de resumir en pocas palabras todo lo que puedo decirles a cada uno de ustedes.

Comenzaré por los maestros: Gracias al Dr. Edgardo Escamilla por abrirme las puertas del Instituto, que fue como mi casa durante muchos años. Al Dr. Jesús Aguirre por hablarme siempre con honestidad. Al Dr. Cázares, como lo conocemos los cuates, por la entrega, la dedicación y la amistad incondicional que siempre nos da a todos sus alumnos. A los maestros que durante la licenciatura me hicieron tener ganas de entrar a la Maestría: Carlos Pompeyo, Alejandro Sosa y Víctor Valdés. A los que hicieron soportable y hasta agradable, la maestría: Irma Romero, Luis Felipe, Toño Lazcano, y Rogelio Alonso. Y a los que por fortuna me aprobaron para no tener que repetir su curso.

Gracias a los que alegraron las jornadas "laborales": Lucha, El Querubín, El toro, Tete, Luz, Layla, Shaday, Laucel, Enrique, Jimmy y Willy. A Gustavo por su hospitalidad, a Panchito, Enrique y Cande.

A los que hicieron mi trabajo: Gracias a Rosa Estela Navarro por su ayuda, si no fuera por ella, yo no estaría escribiendo agradecimientos. También a Candelario Vázquez, a Olivia y a Martha. Muy especialmente a Gabriela Olmedo por el tiempo y el entusiasmo que dedicó a mi proyecto y al Dr. Jesús Aguirre por prestarme su laboratorio, su equipo, sus reactivos y a sus estudiantes. No puede faltar Juan Méndez Franco que me ayudó un poco en todo.

También agradezco a mis amigos de siempre, por el puro gusto de hacerlo: Salomón, Francisco, Alejandro, Juan, Felipe y Alvaro, Eivira, Amelia, Sara y La China, Julieta, Cecilia y Arturo. Ningún trabajo sería soportable si no contara con ellos. También hay cupo para Eneida, el Ray, David y Agradesco a Manuel Ramos por darme chance de terminar esto en horas de trabajo y por ser un gran jefe. Y al Dr. Hansberg por animarme a escribir.

Con mis dos familias será breve porque nunca tendría espacio suficiente para agradecerles por cada día de mi vida: Gracias a Bernardo a Luisa, a sus hijos y a sus nietos.

Sinceramente, Fernando