

00551

30



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

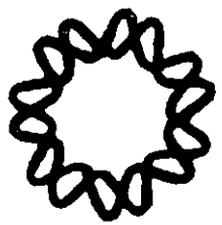
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

294940

ANALISIS DE LA REGION 5' DE REGULACION
DEL GEN *aprE* DE *Bacillus subtilis*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS
P R E S E N T A :
ARISTIDES III SAMPIERI HERNANDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ENRIQUE MERINO PEREZ



JULIO DE 2001.



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.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis y agradezco muy profundamente el apoyo de dos grandes mujeres que han estado conmigo en las buenas como en las malas.

A mi madre Irma Hernández Guillen.

A mi madre Ma. Sonia Sampieri Lacayo.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a los honorables y distinguidos miembros del jurado, Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo, Ma. Alejandra Bravo de la Parra, Dr. Edmundo Calva Mercado, Dr. Luis Servín González y Dr. Enrique Merino Pérez, quienes revisaron esta tesis, por sus valiosos comentarios y sugerencias para el mejoramiento de la misma.

Agradezco a los honorables y distinguidos miembros de mi comité tutorial, Dra. Gloria Soberón Chavez, Dr. José Luis Puente García y Dr. Enrique Merino Pérez, por sus valiosos comentarios y sugerencias para la realización de este trabajo.

Agradezco el apoyo que me han ofrecido al permitirme incorporar a su grandioso laboratorio, Dr. Francisco Bolívar Zapata, Dr. Guillermo Gosset Lagarda, Dr. Fernando Valle Baheza y Dr. Enrique Merino Pérez

Agradezco el apoyo que me han ofrecido de manera incondicional mis abuelos, tíos, primos y mi hermano Emmanuel Sampieri Hernández.

Agradezco el apoyo y esfuerzo de mi padre J. Aristides Sampieri Lacayo y mi tío Jorge Aranda Almazán.

Agradezco a mis grandes amigos y colegas que han estado siempre conmigo, en las buenas y en las malas, Martín Peralta Gil, Gabriel Sandoval López, Takuya Nishigaki y Raúl Miranda.

Agradezco a todos mis compañeros y amigos del laboratorio por sus valiosos comentarios y sugerencias técnicas en este trabajo.

Agradezco a la QFB Liliana Carmona Aparicio, por su valioso apoyo para la realización de esta tesis.

Agradezco a la señora Mercedes y el señor Pablo por su valioso apoyo técnico y laboral para la realización de este trabajo.

Agradezco a mis maestros de ajedrez, quienes me han demostrado el valor y esencia de este noble juego, Grand Master Marcel Sisniega Campbell e Ing. Alfonso Ferríz.

Agradezco a CONACYT por la beca de maestría de la cual he sido beneficiado.

Agradezco de manera muy especial al Dr. Enrique Merino Pérez, por su admirable labor de paciencia y comprensión hacia mí, así como su gran profesionalismo, inteligencia y sabiduría y gran nobleza.

“Tened en mente que las cosas maravillosas que se aprenden en las escuelas son el trabajo de muchas generaciones, producidas por el esfuerzo entusiasta y la labor infinita en todos los países del orbe. Todo esto se pone en vuestras manos como herencia para que la recibáis, honréis, aumentéis y, un día, con toda vuestra fe, la traspaséis a vuestra descendencia. Esta es la forma en que nosotros los mortales logramos la inmortalidad en las cosas permanentes que creamos en común.”

Dr. Albert Einstein

INDICE	PAGINA
RESUMEN	1
1. INTRODUCCION	2
1.1 Generalidades de <i>Bacillus subtilis</i>	2
1.2 Proceso de esporulación.	4
1.2.1. Señales nutricionales.	5
1.2.2. Densidad de población.	7
1.2.3. Ciclo celular.	7
1.2.4. Crecimiento vegetativo.	8
1.3 Subtilisina y la región 5' de regulación de <i>aprE</i>	8
1.4 Reguladores del estado de transición.	9
1.4.1 El gen <i>sinR</i> y la proteína SinR.	11
1.4.2 Los genes <i>degU/degS</i> y las proteínas DegU y DegS.	13
1.4.3 El regulador AbrB.	13
1.4.4 El regulador Hpr.	14
1.4.6 Los reguladores Pai y SenS.	14
1.5 Formación de un asa de DNA (horquilla de de DNA).	15
1.5.1 Experimentos de giros en la hélice de DNA <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	17
1.5.2 Electroforesis de horquillas en círculos pequeños de DNA.	17
1.5.3 Generación de estructuras de sandwich.	20
1.5.4 Alteraciones en la estructura de la horquilla.	20
1.5.5 Curvatura estática en la región de regulación de <i>aprE</i>	20
2. HIPOTESIS	21
3. OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo general.	22
3.2 Objetivos particulares.	22
4. MATERIALES Y METODOS	23

4.1 Cepas bacterianas y plásmidos	23
4.1.1 Plásmidos.	23
4.1.2 Cepas.	24
4.1.3 Oligonúcleotidos.	25
4.2 Condiciones de crecimiento.	26
4.3 Construcciones genéticas y análisis de secuencia de DNA.	26
4.4 Fusiones traduccinales <i>rrapE-lacZ</i>	26
4.5 Ensayo de actividad para β -Galactosidasa.	27
5. RESULTADOS	28
5.1 Construcción de mutantes	28
5.2 Determinaciones de actividad de β -Galactosidasa.	36
6. DISCUSION	41
7. CONCLUSIONES	45
8. PERSPECTIVAS	46
9. APENDICE	47
9.1 Técnicas generales de Biología Molecular.	47
9.1.1 Medios de cultivo.	47
9.1.2 Soluciones y Buffers.	48
9.1.3 Mini Screening de plásmidos por lisis alcalina.	48
9.1.3 Macro Screening de plásmidos por lisis alcalina.	50
9.1.4 Amplificación de DNA con DNApol ELONGASA.	51
9.1.5 Extracción de bandas de DNA en gel preparativo.	53
9.1.6 Preparación de células electrocompetentes de <i>E. coli</i>	53
9.1.7 Electroporación.	54
9.1.8 Determinación de proteína por el método de Lowry.	55
10. BIBLIOGRAFIA	57

INDICE DE FIGURAS	PAGINA
I. Figura 1. Ciclo de vida de <i>Bacillus subtilis</i>	3
II Figura 2. Sistema de dos componentes y Spo0A.....	6
III Figura 3. Control de la expresión del gen <i>aprE</i>	10
IV Figura 4. Secuencia de la región 5' de regulación de <i>aprE</i>	12
V Figura 5. Electroforesis de pequeños círculos de DNA con proteínas unidas...	19
VI Figura 6. Secuencia y mutaciones en la región 5' de regulación de <i>aprE</i> Curvatura de la región 5' de regulación del gen <i>aprE</i>	29
VII Figura 7. Construcción de los plásmidos y las cepas con mutaciones de múltiplos de 5 pb en la <i>rraprE</i> con la introducción de un sitio <i>HindIII</i>	30
VIII Figura 8. Construcción de los plásmidos y las cepas con mutaciones de múltiplos de 5 pb en la <i>rraprE</i> con la introducción de un sitio <i>SmaI</i>	32
IX Figura 9. Construcción de los plásmidos y las cepas con mutaciones de múltiplos de 5 pb en la <i>rraprE</i> con la introducción de un sitio <i>SacI</i>	35
X Figura 10. Curvatura en el gen <i>aprE</i>	38
XI Figura 11. Actividad de β -galactosidasa en mutantes <i>rrapE-lacZ</i> que llevan inserciones de 5, 10, 15 y 20 pb entre los sitios de unión Hpr1 y Hpr2.....	39
VII Figura 12. Actividad de β -galactosidasa en mutantes <i>rrapE-lacZ</i> que llevan inserciones de 5 y 10 pb entre los sitios de unión DegU y Hpr1, SinR y Hpr2.....	40
IX Figura 13. Sitios de unión de Hpr en las regiones de regulación de los genes divergentes <i>yhfO</i> y <i>aprE</i> en el cromosoma de <i>B. subtilis</i>	43

RESUMEN

Bacillus subtilis es una bacteria Gram-positiva; durante su ciclo de vida posee la capacidad de esporular. Entre la fase de crecimiento exponencial y estacionaria se encuentra el estado de transición, durante el cual secreta al medio de cultivo enzimas degradativas, entre las cuales se encuentra la subtilisina, que es codificada por el gen *aprE*. La regulación de *aprE* se lleva a cabo a través de múltiples elementos de control, siendo de los más importantes represores como Hpr, AbrB y SinR, y activadores como DegU/DegS. Es importante resaltar que para la expresión normal de *aprE*, se requieren por lo menos 400 pb hacia su región 5' de regulación. La distribución espacial de estos reguladores sobre esta región, y principalmente el represor Hpr, que posee cuatro sitios de unión en la región 5' de regulación de *aprE*, ha sugerido de manera importante que la geometría del DNA pudiera tener un efecto en la regulación del gen a través de la formación de una horquilla de DNA.

En el presente trabajo, se realizaron mutagénesis sitio-específicas en tres diferentes lugares cercanos a los sitios de unión del represor Hpr. 1) Se realizaron inserciones de 5, 10, 15 y 20 pb en el sitio -60 de *aprE*, entre los sitios de unión Hpr1 y Hpr2. Los resultados sugieren que puede existir una interacción proteína-proteína de tipo cooperativo del represor Hpr en estos sitios. 2) Se realizaron inserciones de 5 y 10 pb en el sitio -99 de *aprE*, entre los sitios de unión Hpr2 y Hpr3. Los resultados sugieren que entre estos sitios se lleva a cabo la interacción de Hpr para la formación de una horquilla de regulación. 3) Se realizaron inserciones de 5 y 10 pb en el sitio -268 de *aprE*, entre los sitios de unión Hpr2 y SinR. Los resultados sugieren que entre los sitios de unión Hpr2 y Hpr3 se establece la interacción del represor Hpr para generar una horquilla de DNA. Se observó que el desfasamiento como el reestablecimiento de la fase de los sitios de unión Hpr2 y Hpr3 forman una horquilla de DNA proteína-proteína. En estos resultados, el reestablecimiento de la fase de los sitios de unión de Hpr, medido como la actividad de β -galactosidasa de una fusión traduccional *aprE-lacZ*, no es totalmente recuperada con respecto a la cepa silvestre. Este efecto puede deberse a que se modifican también los sitios donde actúan el activador DegU y el represor SinR.

1. INTRODUCCION

1.1 GENERALIDADES DE *Bacillus subtilis*.

El género *Bacillus* está constituido por uno de los grupos más diversos de bacterias Gram-positivas, entre las cuales se encuentran microorganismos aerobios, anaerobios facultativos y anaerobios. Tienen una morfología tipo barra o bastón, y son formadoras de endosporas (Priest, 1993; Setlow, 1993; Slepecky, 1992). Estas esporas pueden sobrevivir mucho tiempo y son resistentes a calor, luz ultravioleta, desecación y solventes orgánicos (Setlow, 1994; Slepecky, 1992). La capacidad de la mayoría de los microorganismos que conforman el género *Bacillus* para crecer a altas temperaturas, la ausencia de productos tóxicos y su habilidad para producir y secretar grandes cantidades de proteínas, han convertido a este género en uno de los más valiosos para la industria biotecnológica (Ferrari *et al.*, 1993; Harwood, 1992; Zukowski, 1992).

El miembro más representativo del género *Bacillus* es *Bacillus subtilis*; el cual es una eubacteria ampliamente distribuida, que habita principalmente en el suelo, aunque también se le encuentra en el aire, ríos y estuarios (Priest, 1989; 1993). *B. subtilis*, después de *Escherichia coli*, es la eubacteria mejor caracterizada y entre los microorganismos Gram-positivos, es la más fácil de manipular en términos genético-moleculares. Los avances en la tecnología del DNA recombinante y la expresión génica, particularmente en *B. subtilis* y otros *Bacillus* han servido en el entendimiento de los complejos mecanismos por los cuales se lleva a cabo el desarrollo y regulación genética de este tipo de bacterias en muchas áreas de investigación básica y aplicada (Harwood, 1992; Slepecky, 1992; Wong, 1995).

B. subtilis es una bacteria generalmente reconocida como segura (GRAS), por la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos USA (Boer y Diderichsen, 1991; Harwood, 1992). Tiene la capacidad de secretar directamente al medio de cultivo grandes cantidades de enzimas degradativas, entre las cuales se encuentra la subtilisina (Zukowski, 1992; Pierse, 1992). En estudios previos, muchos investigadores utilizaron a *B. subtilis* como la contraparte Gram-positiva de la bacteria mejor conocida Gram-negativa, *E. coli* y, como un modelo para entender los mecanismos de

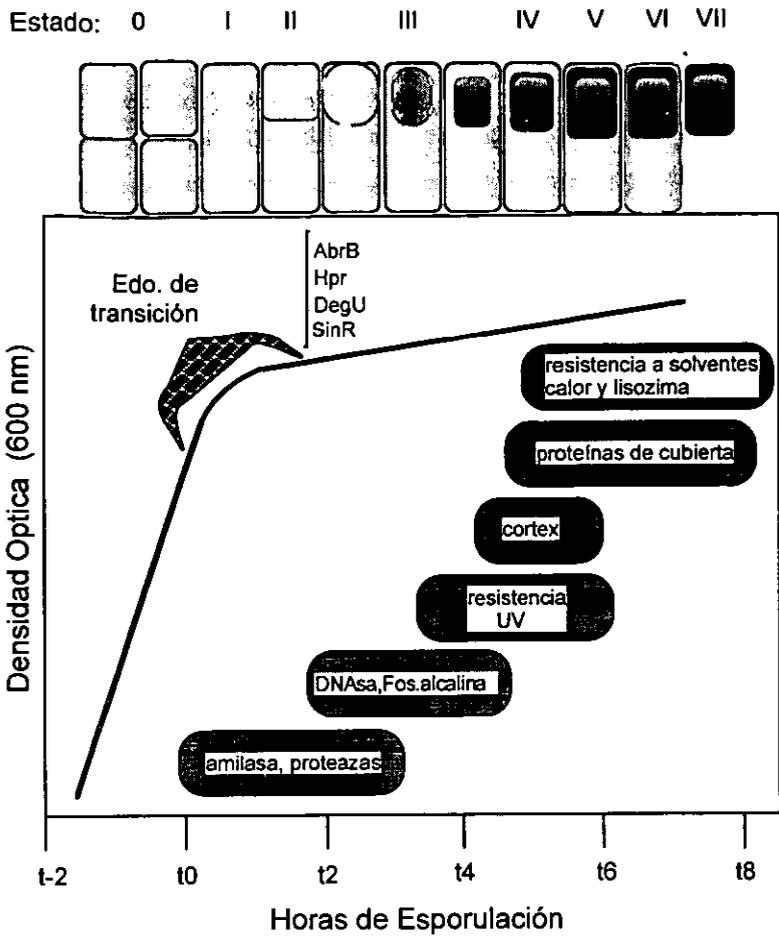


Figura 1: Ciclo de vida de *Bacillus subtilis*

diferenciación, estudiando el proceso de esporulación (Anagnostopoulos y Spizizen, 1991; Schaeffer, 1965). Sin embargo, en los últimos años, el desarrollo de sistemas de producción de proteínas heterólogas, usando a *B. subtilis* como microorganismo huésped, ha venido convirtiéndose en uno de los más importantes. Algunos de estos sistemas utilizan la región de regulación del gen *aprE* (Fig. 4), el cual codifica para la proteasa alcalina subtilisina, la proteasa mayoritaria que produce *B. subtilis* (Jacobs, 1995; Nagarajan *et al.*, 1992; 1993; Strauch y Hoch, 1992a; Valle y Ferrari, 1989; Wang *et al.*, 1988; Wong, 1995). La subtilisina es una de las enzimas de mayor uso a nivel mundial (Dababov, 1982; Pierse, 1992; Priest, 1989). Sin embargo, los mecanismos moleculares y fisiológicos por los cuales se regula su síntesis, aún no han sido estudiados en detalle, abriendo un área de gran interés para estudios básicos y aplicados.

1.2 PROCESO DE ESPORULACION

La esporulación en *B. subtilis* es parte de un complejo programa de desarrollo y diferenciación celular que tiene como resultado la formación de una estructura altamente resistente denominada espora. Este proceso se ha dividido en diferentes estadios (Fig. 1). La formación de esta estructura es un ejemplo extremo de la adaptación de *B. subtilis* al medio e involucra a más de ochenta genes (Kunkel, 1991). En el inicio de la esporulación, la proteína Spo0A, la cual funciona como represor y activador, juega un papel central (Fig. 2). El gen *spo0A* es transcrito a partir de dos promotores, P_v y P_s. P_v es activado por el factor de transcripción E σ^A , lo cual proporciona un nivel basal de síntesis de Spo0A en células en crecimiento vegetativo. P_s es regulado por E σ^H , el cual produce un incremento súbito en la síntesis de Spo0A al inicio de la esporulación (Chibazakura *et al.*, 1991; Yamashita *et al.*, 1989).

La proteína Spo0A pertenece a la familia de reguladores bacterianos de dos componentes (Stock *et al.*, 1989). La fosforilación de Spo0A es la clave en el control del inicio de la esporulación (Fig. 2). El fosfato es transferido a Spo0A por un mecanismo complejo que involucra a histidin-protein-cinasas y al menos a dos acarreadores de fosfato que actúan como intermediarios. Las interacciones entre los distintos participantes han sido reproducidas *in vitro* (Burbulys *et al.*, 1991). Al menos

dos histidin-protein-quinasas, codificadas por los genes *kinA* y *kinB*, pueden transferir el fosfato a la proteína Spo0F, la cual a su vez transfiere el fosfato a un segundo acarreador llamado Spo0B. La proteína Spo0B es el donador directo del fosfato a Spo0A. Esta vía puede permitir que mediante detectores ambientales, tanto internos como externos, se controle el nivel de Spo0 fosforilada de manera rápida y precisa (Grossman, 1991). Congruente con esta idea, se ha demostrado que las cinasas KinA y KinB pueden responder a diferentes señales.

Spo0A~P regula negativamente algunos genes, siendo el más importante *abrB*, uno de los represores de *aprE* (Perego *et al.*, 1988; Strauch *et al.*, 1990). Por otra parte, la función positiva de Spo0A~P es responsable de la activación de ciertos genes específicos de la esporulación, como lo son los operones *spolIA* (Perego *et al.*, 1991), *spolIG* (Satola *et al.*, 1991; 1992), *spolIE* (York *et al.*, 1992) y el gen *sinI* (Bai *et al.*, 1992) (Fig. 2). Por otra parte, se sabe que algunas mutaciones en *spo0A* bloquean la esporulación en su fase inicial y eliminan la producción de proteasas extracelulares (subtilisina. Strauch y Hoch, 1992a). Otras mutaciones, como la denominada *spo0A9V*, bloquea la esporulación en el estadio II (Fig. 1). Sin embargo, al parecer esta mutación produce niveles normales de subtilisina (Perego *et al.*, 1991).

La iniciación de la esporulación es compleja y se conocen al menos tres tipos de señales principales que se interrelacionan y dan inicio a ésta:

1.2.1 Señales nutricionales.

La limitación de fuentes de carbono, nitrógeno o fósforo puede inducir la esporulación (Freese, 1981; Sonenshein, 1989). A su vez, buenas fuentes de carbono, como la glucosa, la reprimen (López *et al.*, 1980). Recientemente se ha demostrado que la concentración intracelular de GTP (o GDP) probablemente representa el efector clave de la señal nutricional (López *et al.*, 1979; 1981). Sin embargo, aún se desconoce cómo es detectada por la célula la concentración de GTP y cómo se transmite la señal al aparato transcripcional.

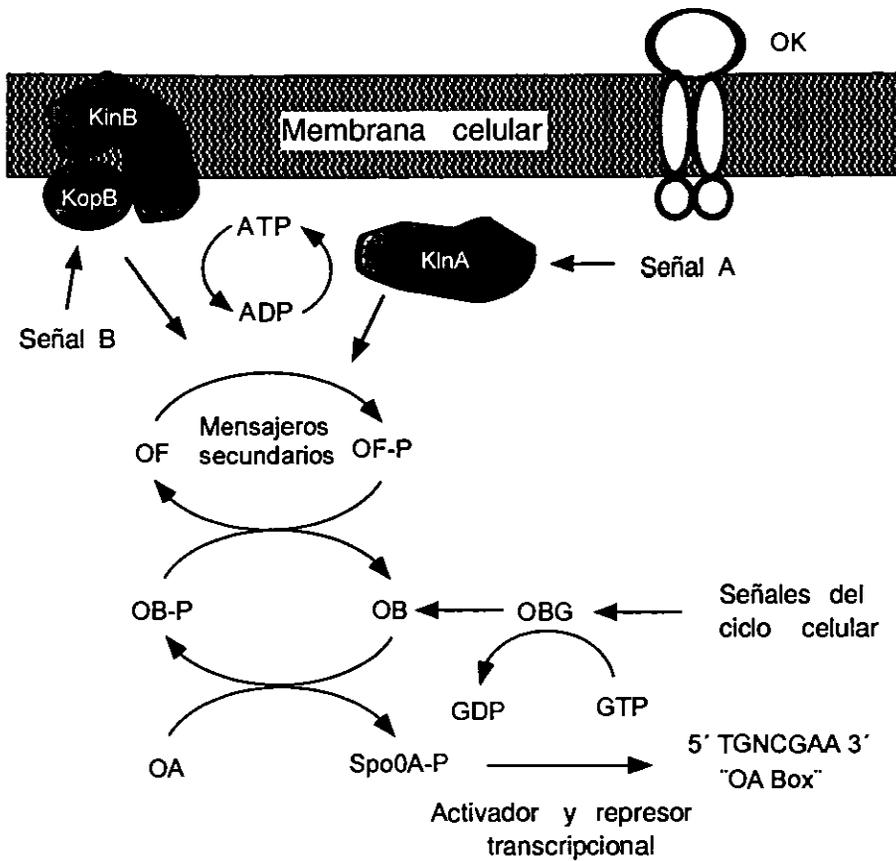


Figura 2: Sistema de dos componentes y Spo0A

1.2.2 Densidad de población.

Grossman y Losick (1988), observaron que la esporulación no puede inducirse eficientemente en células mantenidas a baja densidad de población. Sin embargo, una esporulación eficiente se obtiene cuando las células se resuspenden a baja densidad en un medio previamente condicionado de células a alta densidad. Este efecto no se debió al agotamiento de un factor esencial de crecimiento, sino a la producción de sustancias, posiblemente oligopéptidos, que son necesarios para inducir una esporulación eficiente (Waldburger *et al.*, 1993). Se conoce poco a cerca de la naturaleza de dichos factores y menos aún de cómo su presencia es detectada e interpretada.

1.2.3 Ciclo celular.

En su etapa más temprana, la esporulación claramente comprende la división celular modificada, la cual se caracteriza por la compactación de uno de los dos cromosomas y la migración de éste hacia uno de los polos de la célula (Hitchins *et al.*, 1969. Fig. 1). Sin embargo, a pesar de que la relación entre el ciclo celular y el inicio de la esporulación está bien definida (Clarke *et al.*, 1980; Dunn *et al.*, 1978), la manera en que la célula monitorea el desarrollo del ciclo celular y transmite esta información al aparato de transcripción, permanece sin establecerse claramente (Ireton y Grossman, 1994).

Estudios sobre la regulación transcripcional del gen *aprE* sugieren que ésta se lleva a cabo a través de la acción concertada de múltiples elementos de control positivos y negativos, como son las proteínas AbrB, Hpr, DegU/DegS y SinR, entre otras (Fig. 3). Algunas de estas proteínas reguladoras ejercen su acción en la fase vegetativa y otras durante la fase estacionaria y/o de esporulación (Strauch y Hoch, 1992a; Valle y Ferrari, 1989); aunque la síntesis de la subtilisina al inicio de la fase estacionaria, al igual que la de muchas otras enzimas degradativas producidas por *B. subtilis*, no es requerida para el proceso de esporulación. La producción de esta enzima es inducida por mecanismos específicos que son a su vez responsables de la activación de la esporulación (Fig. 1). Por tal motivo, el estudio del gen *aprE* ha sido

tomado como modelo para tratar de comprender los complejos mecanismos moleculares y fisiológicos que regulan la expresión de los genes durante el estado de transición en este organismo.

1.2.4 Crecimiento vegetativo

Es común que conforme los nutrientes en un cultivo celular empiezan a ser limitantes, las células en este cultivo inician la entrada a la fase estacionaria y, como consecuencia, activan varias respuestas de estrés (Strauch y Hoch, 1992; 1993). En *B. subtilis*, al igual que en otras bacterias, hongos y eucariotas inferiores, una respuesta a esta condición es la formación de una endo-espora (Setlow, 1994; Strauch y Hoch, 1992b. Fig.1). Además de las proteínas necesarias para la esporulación, son también sintetizadas durante esta misma etapa de desarrollo proteasas, amilasas y otras proteínas (Kunst *et al.*, 1994). La mayor parte de estas proteínas son enzimas degradativas, las cuales forman parte de una estrategia alternativa de la célula para obtener nutrientes del medio que la rodea y así mantenerse en crecimiento vegetativo. Además de la síntesis de enzimas degradativas, (levansacarasa, α -amilasa, proteasa neutra, proteasa alcalina ó subtilisina, etc.), algunas otras funciones son llevadas a cabo en *B. subtilis* en esta misma etapa de desarrollo. Estas funciones comprenden: i) el desarrollo de competencia, lo cual confiere a la célula la habilidad para captar moléculas de DNA del medio, ii) la producción de antibióticos, iii) la síntesis de flagelo para motilidad y iv) la inducción completa del ciclo de Krebs, el cual está parcialmente reprimido durante el estado vegetativo (Strauch y Hoch, 1992).

1.3 Subtilisina y la región 5' de regulación de *aprE*.

La subtilisina es una enzima que posee una actividad óptima en un pH de 7 a 9 y cuyo peso molecular es de 28.5 KDa. Debido a este pH alcalino, la subtilisina es conocida como proteasa alcalina. Esta enzima es un miembro de la familia de las serin proteasas y es inhibida por floruro de para-metil-fenil-sulfonilo (pmsf). Presenta una alta actividad proteolítica, es una proteína de 275 a.a., con una región líder de 106 a.a. y una secuencia señal de 29 a.a. Esta proenzima se transloca y autodigiere para dar una proteína madura. La subtilisina ha sido utilizada en la industria de producción de jabones biodegradables de manera muy importante (Jacobs, 1995; Nagarajan *et al.*,

1993; Valle y Ferrari, 1989; Zukowski, 1992).

El gen *aprE*, que codifica para la proteasa alcalina subtilisina, es transcrito a través de un promotor reconocido por σ^A (Jan, *et al.*, 2000, Park *et al.*, 1989). Su regulación es llevada a cabo a través de múltiples elementos de control, siendo de los más importantes represores como AbrB, Hpr y SinR y activadores como DegU/DegS. También se conocen otros reguladores que afectan en menor medida la expresión de este gen, como son las proteínas Pai, SenS, DegQ, DegR. Una breve descripción de estos reguladores se incluye posteriormente. Es importante resaltar que, para la acción concertada de estos reguladores sobre la expresión de *aprE*, se requieren por lo menos 400 pb hacia su región 5' de regulación (Fig. 4). La distribución espacial de estos reguladores sobre esta región ha sugerido de manera importante que la geometría del DNA pudiera tener un efecto en la regulación del gen (Strauch y Ayazifar, 1995, Jan *et al.*, 2000). El codón de inicio del gen estructural es GTG, siendo éste poco frecuente en los demás genes de *B. subtilis* (78% ATG, 9% GTG y 13% TTG). La secuencia de unión de ribosoma de *aprE* (AAGGAGA) sólo difiere en una base de la secuencia consenso en *B. subtilis* (AAGGAGG) (Jan *et al.*, 2000).

1.4 Reguladores del estado de transición.

En *B. subtilis* se conoce que por lo menos cuatro proteínas, AbrB, Hpr, SinR y DegU, tienen efectos pleiotrópicos sobre la síntesis de muchas de las proteínas que se expresan entre el final del crecimiento exponencial y el inicio de la fase estacionaria de crecimiento y/o esporulación. Por lo tanto, a estas proteínas se les ha llamado "reguladores del estado de transición" (Kunst *et al.*, 1994; Strauch y Hoch, 1992a) (Fig 3). Por otra parte, aunque ninguna de las mutaciones conocidas en estos reguladores del estado de transición afectan significativamente la formación de la spora, los genes que las codifican están bajo el control de proteínas esenciales para el inicio de la esporulación. Además, por sí mismos, algunos de estos reguladores del estado de transición, regulan algunos de los genes del proceso de la esporulación (Fig. 3).

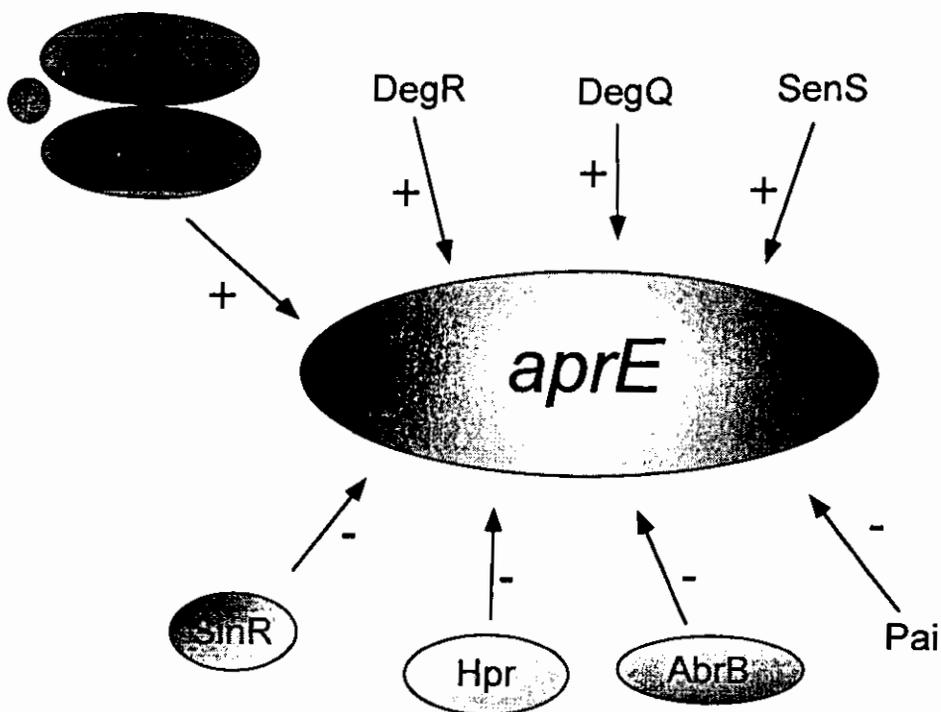


Figura 3: Control de la expresión del gen *aprE*

Estos datos sugieren que el control de la síntesis de enzimas degradativas, y otros procesos que se llevan a cabo durante el estado de transición, son dependientes de los mecanismos de regulación de la esporulación (Kurns *et al.*, 1994; Strauch y Hoch, 1992a).

1.4.1 El gen *sinR* y la proteína SinR.

El gen *sinR* fue aislado por primera vez de un fragmento de DNA cromosomal de *B. subtilis*, el cual clonado en un plásmido multicopia inhibía la esporulación y la producción de proteasas extracelulares (Gaur *et al.*, 1986). Este gen forma parte de un operón dicistrónico y es precedido por un gen llamado *sinI*, el cual codifica para la proteína SinI constituida por 57 a.a. La función de SinI es inactivar a la proteína SinR a través de interacciones proteína-proteína durante el final de la segunda hora del estado estacionario (t₂) (Bai *et al.*, 1992). Este operón cuenta con tres promotores, dos de los cuales regulan la transcripción de ambos genes (P1 y P2), mientras el otro (P3) regula únicamente la transcripción de *sinR* (Gaur *et al.*, 1988).

Los niveles de expresión de SinR se incrementan al final de la primera hora del estado estacionario (t₀) y requieren de las proteínas Spo0A-P y Spo0H. Por el contrario, el gen *sinR* es expresado constitutivamente, pero la proteína sólo se detecta al inicio de la esporulación y su expresión es independiente de las proteínas Spo0A-P y Spo0H (Gaur *et al.*, 1988). La inactivación del gen *sinR* conlleva a la pérdida de la habilidad para desarrollar competencia, motilidad y a la sobreproducción de proteasas extracelulares (Gaur *et al.*, 1986; 1988). Por otra parte, se ha reportado que la forma activa de la proteína SinR es un tetrámero de subunidades idénticas de 13 KDa (Gaur *et al.*, 1991). Posteriormente, en experimentos de "footprinting" *in vitro*, se determinó el sitio de unión de SinR a la región de regulación de *aprE* (Fig. 4). Este abarca de la posición -263 a la -215 respecto al origen de transcripción y es adyacente a un sitio de unión de la proteína reguladora Hpr (Gaur *et al.*, 1991; Strauch y Hoch 1992a).

1.4.2 Los genes *degU/degS* y las proteínas DegU y DegS.

Mientras que los reguladores del estado de transición AbrB, Hpr y SinR ejercen un efecto negativo sobre la expresión del gen *aprE*, una variedad de estudios han señalado que los productos de los genes *degU/degS* se encuentran implicados en activar su transcripción durante el estado de transición. (Hener *et al.*, 1998a; Msadek *et al.*, 1991. Fig. 2). Además, mutaciones en *degS* y *degU* afectan pleiotrópicamente la producción de otras enzimas degradativas y otros procesos involucrados en el estado de transición (Strauch y Hoch, 1992a; Msadek *et al.*, 1991). De estas mutaciones, *degU32* (Hy) es ampliamente utilizada en la industria biotecnológica por su capacidad de sobreproducir enzimas degradativas (Dahl *et al.*, 1991; Ferrari *et al.*, 1995). El análisis de la secuencia de aminoácidos de DegS y DegU reveló que forman parte de una familia de proteínas que cuentan con un sistema que transmite señales por medio de dos componentes (Henner *et al.*, 1988b). DegS es una cinasa que se autofosforila en respuesta de señales ambientales específicas y que posteriormente fosforila al segundo componente, la proteína DegU, la cual a su vez actúa como proteína reguladora uniéndose al DNA (Henner *et al.*, 1988a). La forma fosforilada de DegU tiene dos funciones: a) regulación positiva sobre la expresión de algunas enzimas degradativas y b) regulación negativa en el desarrollo de competencia y motilidad (Msadek *et al.*, 1990). Por otra parte, un análisis de remoción (Henner *et al.*, 1988a) enfocado a localizar los sitios de unión de DegU en la región de regulación del gen *aprE*, sugirió que el fragmento de DNA involucrado abarcaba desde la posición -164 a la -141 (Fig. 4). Sin embargo, es importante mencionar que en experimentos de "footprinting" *in vitro*, utilizando DegU y la región de regulación de *aprE*, no se localizó el sitio de unión de esta proteína, por lo que no se descarta que la activación de DegU sea a través de una segunda proteína reguladora.

1.4.3 El regulador AbrB.

El gen *abrB* codifica para una proteína de 96 a.a. con un peso molecular de 10,773 Da. El gen es transcrito por dos diferentes promotores separados por 14 pb. AbrB fue purificada como un hexámero, presenta un motivo hélice-vuelta-hélice. La secuencia de nucleótidos que reconoce AbrB es variada y no se conoce un sitio consenso, sólo se sabe que es una secuencia rica en AT. Comúnmente actúa como un

regulador negativo clásico, interactuando sobre la región promotora. Dentro de estos genes se encuentra *aprE*. Se sabe también que sobre este gen interactúa de manera específica sobre la topología del DNA, siendo inactiva si se desfasa sobre la cadena de DNA (Robertson *et al.*, 1989, Strauch y Ayazifar 1995).

1.4.4 El regulador Hpr.

El locus *hpr* se localizó por mutaciones que causaban sobreproducción de las proteasas neutra y subtilisina (Higerd *et al.*, 1992). El gen *hpr* ha sido clonado y secuenciado, y la proteína purificada. Utilizando experimentos de protección con DNasa I en la región de control de regulación de *aprE*, se localizaron cuatro sitios de unión de la proteína Hpr. Los sitios en los cuales se une Hpr en *aprE* se encuentran distribuidos de manera peculiar, siendo dos de estos cercanos al promotor, mientras otros dos se localizan a más de 200 pb del sitio de inicio de transcripción. El primer sitio se encuentra sobrelapando la región del promotor de *aprE* en -35 a -14, seguida de una secuencia rica en AT. Posterior a éstas se encuentra el segundo sitio de -79 a -59 y más arriba se localizan otros dos sitios de unión en -292 a -267 y en -324 a -295. El análisis de varios sitios de unión en *aprE* y otros genes regulados por Hpr, se obtuvo una secuencia consenso de unión la cual es ATANTTATT (Strauch y Hoch, 1992).

1.4.6 Los reguladores Pai y SenS.

El papel de estos reguladores es de menor importancia, ya que su efecto sólo es apreciable cuando sus correspondientes genes son clonados en multicopia y su actividad reguladora es observada durante el estado de transición. Pai inhibe la producción de α -amilasa, levansacarasa, proteasas neutra y alcalina (Honjo *et al.*, 1990).

El gen *senS* en multicopia activa la transcripción de α -amilasa, proteasas neutra y alcalina y fosfatasa alcalina (Wang *et al.*, 1988b; Wang y Doit, 1990).

1.5 Formación de un asa de DNA (horquilla de DNA)

La formación de un asa de DNA (horquilla de DNA) es generada por una proteína o complejos de proteínas que, simultáneamente, se pegan a dos diferentes sitios sobre una molécula de DNA. En la formación del asa pueden llegar a intervenir decenas a miles de pares de bases. Esto ha sido observado en la regulación de genes de organismos procariones y eucariones, en la regulación de recombinación sitio-específica, en la regulación de la replicación del DNA y en la regulación transcripcional de algunos genes (revisado por Schleif, 1992).

Se pueden requerir una gran cantidad de proteínas para regular apropiadamente la transcripción sobre una molécula de DNA. Por ejemplo, la transcripción de un gen puede requerir la presencia simultánea de diferentes condiciones, un estado que puede ser transmitido por una proteína detectora a un complejo de iniciación. La formación de un asa en el DNA permite que otras proteínas se peguen en la vecindad del complejo de iniciación, para que actúen con este. Varias proteínas pueden permitir o impedir la formación de una asa. De esta manera se pueden explicar una gran diversidad de sistemas de regulación que utilizan la formación de una asa en el DNA para poder llevar a cabo la regulación transcripcional (Matthews, 1992; Schleif, 1992).

La formación de una asa, sólo se genera cooperativamente con el pegado de una proteína y dos o más sitios en el DNA. Cuando una proteína se ha pegado a un sitio, puede contribuir al pegado de una segunda proteína en su correspondiente sitio de unión, ya que la unión de la primera proteína a su sitio incrementa la concentración (sinergismo) para el pegado de la segunda proteína (Matthews, 1992; Schleif, 1992).

La formación de un asa en el DNA es un fenómeno que es central en la regulación de genes involucrando la estructuración del DNA. La transcripción de un gen puede requerir de diferentes condiciones; una señal puede ser captada por una proteína detectora y la señal puede viajar hasta el complejo de iniciación. Una proteína detectora puede ser también una proteína reguladora, la cual confiere sus actividades a los genes blanco; ésta puede unirse a secuencias específicas localizadas cerca de los genes que van a ser regulados. Existe un pequeño espacio donde sólo 2 ó 3

proteínas se pueden unir muy cerca del complejo de iniciación. La horquilla de DNA permite que proteínas adicionales se unan en la vecindad del complejo y que puedan interactuar en éste. Esto produce una rica diversidad de sistemas de regulación que pueden ser utilizadas con la intervención de un loop de DNA (Pérez-Martín *et al.*, 1994).

La cooperatividad resultante para la horquilla de DNA permite a las proteínas saturar sus sitios de unión aún y cuando la concentración de proteína sea baja, o bien cuando las afinidades de las proteínas por sus sitios sean bajas. La cooperatividad también permite saturar los sitios de unión en el DNA involucrados en la formación de la horquilla.

Por una parte, la horquilla de DNA es generada por una proteína con dos sitios de unión de DNA. Por otra parte, dos diferentes proteínas se pegan a dos diferentes sitios y debido a que estas se encuentran cerca una de la otra por el DNA, estas se unen una a otra y forman una horquilla. Por lo mismo se puede esperar que la horquilla de DNA pueda ser generada por una proteína monomérica, por una proteína oligomérica, o por dos proteínas que solo se asocian a altas concentraciones o en la presencia de un DNA que contiene sus sitios de unión (Schleif, 1992, Pérez-Martín *et al.*, 1994).

Una de las primeras investigaciones referentes a la formación de una horquilla proteína-proteína, fue realizada por Englesberg en 1969 y años posteriores, trabajando en la regulación del operón de arabinosa en *E. coli*, él obtuvo evidencia genética de un sitio hacia arriba del promotor de *araBAD* que actuaba para reprimir la actividad del promotor (Englesberg, 1974).

Existen varios métodos para detectar y medir la formación de una horquilla. Estos diferentes métodos dan una idea de la riqueza y diversidad de la formación de horquillas, así como el efecto de los cambios en la conformación de una horquilla en la regulación de genes en células vivas. A continuación se mencionan las más importantes:

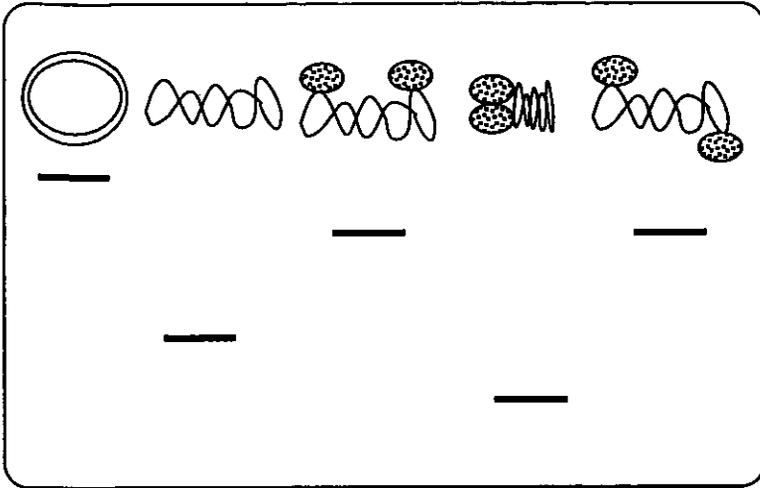
1.5.1 Experimentos de giros en la hélice de DNA *In vivo* e *In vitro*.

En este tipo de experimentos, los dos sitios involucrados en formar una horquilla son rotados alrededor del eje del cilindro de DNA con respecto de uno al otro por la inserción o pérdida de diferentes bases de DNA entre los sitios. Si los dos sitios se encuentran en posición para formar una horquilla, la inserción o pérdida de 5 pares de bases entre estos sitios rotará medio giro un sitio con respecto al otro alrededor del DNA (Dunn *et al.*, 1984). Como resultado, la formación de una horquilla ahora requerirá no sólo de la unión de las proteínas al DNA para obtener los sitios cerca uno de otro, sino también de un medio giro para obtener los sitios en la fase correcta del DNA. Se ha observado que la interferencia para la formación de la horquilla depende de el tamaño, forma y flexibilidad de las proteínas involucradas, la distancia de separación entre los sitios de unión y las energías utilizadas para la formación de un loop (Dunn *et al.*, 1984). Este tipo de experimentos ha sido utilizado para caracterizar la formación de un loop en el operón de arabinosa de *E. coli* (Li *et al.*, 1988).

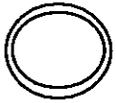
1.5.2 Electroforesis de horquillas en círculos pequeños de DNA

La electroforesis de moléculas pequeñas de DNA superenrolladas con proteínas unidas en diferentes sitios de unión ha sido usada en el estudio de la formación de horquillas en el DNA (Krämer *et al.*, 1988). La horquilla de DNA superenrollada puede ser detectada efectuando una electroforesis bajo condiciones en la cual las proteínas pueden unirse al DNA y sus sitios de unión se encuentran en fase en el DNA durante la separación electroforética. Normalmente el complejo DNA-proteína migra más lentamente que el DNA sin proteína. En pequeños círculos de DNA superenrollado (incluidos plásmidos), este retardamiento puede ser visto cuando el DNA contiene uno o más sitios de unión para una proteína, sin que se forme una horquilla de DNA. Cuando se forma una horquilla de DNA superenrollado entre dos sitios de unión proteína-proteína, el complejo puede migrar más que el DNA libre o DNA con proteínas unidas en uno o más sitios (Krämer *et al.*, 1988). La razón por la cual la movilidad se incrementa cuando se establece la unión proteína-proteína para la formación de una horquilla, es debido a que la horquilla entre los dos sitios mantiene al DNA en una estructura altamente compacta. Esto se debe a que el complejo es más

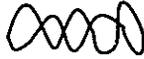
estable, cuando los dos sitios de unión están presentes que cuando un sitio está cercano y no establecen una horquilla de DNA (Krämer *et al.*, 1988; Eismann *et al.*, 1990). El rango de disociación es mucho menor cuando se encuentran ambos sitios interactuando con la unión proteína-proteína, el incremento de inestabilidad y las propiedades de mayor movilidad se afectan cuando se rota un sitio en la fase opuesta del DNA con respecto al otro sitio ya que no se establece una horquilla (Krämer *et al.*, 1988; Eismann *et al.*, 1990. Fig. 5).



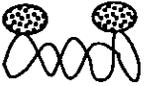
tomado de Eismann et al., 1990.



Círculo de DNA
relajado



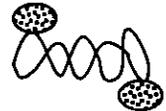
Círculo de DNA
Superenrollado



Proteínas unidas
al DNA



Proteínas unidas formando
una horquilla de DNA



Proteínas unidas al DNA
con un medio giro +/- 5 pb

Figura 5: Electroforesis de pequeños círculos de DNA con proteínas unidas.

1.5.3 Generación de estructuras de sandwich

En la generación de una horquilla una proteína o complejos de proteína se unen a dos sitios en el DNA; al aumentar la concentración de las proteínas y del DNA se ha observado que se generan interacciones proteína-proteína en dos diferentes moléculas de DNA, entonces las dos moléculas de DNA pueden ser unidas a través de proteínas y pueden formar una estructura de "sandwich". La detección de estas estructuras de "sandwich" es sencilla en ensayos de retardación en gel, en el cual las proteínas se unen al DNA durante la electroforesis reduciendo el costo entrópico para la formación de una horquilla. Cuando dos sitios se encuentran en diferentes moléculas, el costo entrópico de formación de sandwich es menor (Shore *et al.*, 1981).

1.5.4 Alteraciones en la estructura de la horquilla.

En algunos casos, el patrón de protección hacia DNAsal puede ser modificado con la introducción o deleción de múltiplos de 5 pb que provocan la pérdida de sensibilidad a DNAsal reflejando un cambio en la fase helicoidal del DNA, que se mantiene en períodos de 10 a 11 pb. Un ejemplo de este fenómeno es la formación artificial de una horquilla mediada por el represor del fago lambda (Hochschild y Ptashne, 1986). Normalmente el represor se une en forma de dímero a lo largo del DNA y las interacciones proteína-proteína son cooperativas. Las interacciones proteína-proteína son tan fuertes que si los sitios de unión son movidos 55 pb, la interacción se mantiene y se forma una horquilla. La región entre los sitios de unión muestra áreas que son fuertemente protegidas y aumenta la sensibilidad contra DNAsal.

1.6 Curvatura estática en la región de regulación de *aprE*

Por sí misma, la región de regulación de *aprE* presenta una curvatura estática. Se han realizado experimentos de PCR para mapear la parte en esta región que presenta curvatura estática. Se comprobó la existencia de dos *loci* con curvatura estática ubicados aproximadamente a 210 y 310 pb hacia arriba del gen estructural de *aprE* (Jan *et al.*, 2000). Es importante resaltar que esta curvatura favorece interacciones entre diferentes monómeros unidos en sitios distantes en la cadena de DNA. Tal es el caso de las proteínas Hpr unidas en sitios distantes la región de regulación de *aprE* (Fig. 4).

2. HIPOTESIS

A pesar de la importancia industrial y básica de la subtilisina, aún se desconoce la mayoría de los aspectos moleculares de la regulación transcripcional del gen que la codifica (*aprE*). Se ha propuesto que debido a la distribución espacial de los reguladores del estado de transición que se unen a la región reguladora, el mecanismo de regulación involucra la formación de una asa de DNA (horquilla de DNA. Jan *et al.*, 2000).

Si en la región de regulación de *aprE* se forma una horquilla de DNA a través de la unión de la proteína Hpr en sus sitios de unión al DNA y para la formación de esta horquilla se requiere que la proteína Hpr este en la misma fase del DNA, entonces la inserción o deleción de múltiplos de 5 pb cercanos al sitio de unión de Hpr provocará un cambio de fase en el DNA, impidiendo la formación de una horquilla y modificando la regulación del gen.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Analizar y caracterizar, mediante técnicas de biología molecular, si las posibles interacciones de los reguladores del gen *aprE* de *Bacillus subtilis* generan la formación de una asa de DNA (horquilla de DNA) en su región reguladora, y si la formación de esta asa regula la expresión del gen *aprE*.

3.1 Objetivos específicos

1.- Modificar la orientación rotacional de los sitios de pegado de los reguladores transcripcionales del gen *aprE*, mediante fusiones con el gen reportero *lacZ* y determinar si dichas modificaciones afectan la expresión de *aprE*.

2.- En base a los resultados obtenidos, proponer un modelo de regulación para el gen *aprE*.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1 Cepas bacterianas y Plásmidos

4.1.1 Plásmidos	Referencia
pBR328	[Bolívar y Rodríguez (1977)] (Bolívar y Rodríguez (1977))
pBRE-H	[pBR328 fragmento <i>EcoRI-HindIII</i> de <i>rraprE</i>] Este trabajo
pBR-H5	[pBRE-H fragmento <i>HindIII</i> +5 pb- <i>BamHI</i> de <i>rraprE</i>] Este trabajo
pBR-H10	[pBRE-H fragmento <i>HindIII</i> +10 pb- <i>BamHI</i> de <i>rraprE</i>] Este trabajo
pBR-H15	[pBRE-H fragmento <i>HindIII</i> +15 pb- <i>BamHI</i> de <i>rraprE</i>] Este trabajo
pBR-H20	[pBRE-H fragmento <i>HindIII</i> +20 pb- <i>BamHI</i> de <i>rraprE</i>] Este trabajo
pSGPLK	[Jan, J. <i>et al.</i> , 2000] (Jan, J. <i>et al.</i> , 2000)
pSG-H5	[pSGPLK fragmento <i>EcoRI-HindIII</i> +5 pb- <i>BamHI</i> de <i>rraprE</i>] Este trabajo
pSG-H10	[pSGPLK fragmento <i>EcoRI-HindIII</i> +10 pb- <i>BamHI</i> de <i>rraprE</i>] Este trabajo
pSG-H15	[pSGPLK fragmento <i>EcoRI-HindIII</i> +15 pb- <i>BamHI</i> de <i>rraprE</i>] Este trabajo
pSG-H20	[pSGPLK fragmento <i>EcoRI-HindIII</i> +20 pb- <i>BamHI</i> de <i>rraprE</i>] Este trabajo
pUC19	[Boehinger Mannheim] (Boehinger Mannheim)
pUCE-S	[pUC19 fragmento <i>EcoRI-SacI</i> de <i>rraprE</i>] Este trabajo
pUC-S5	[pUCE-S fragmento <i>SacI</i> +5 pb- <i>BamHI</i> de <i>rraprE</i>] Este trabajo
pUC-S10	[pUCE-S fragmento <i>SacI</i> +10 pb- <i>BamHI</i> de <i>rraprE</i>] Este trabajo
pUCE-D	[pUC19 fragmento <i>EcoRI-SmaI</i> de <i>rraprE</i>] Este trabajo
pUC-D5	[pUCE-D fragmento <i>SmaI</i> +5 pb- <i>BamHI</i> de <i>rraprE</i>] Este trabajo
pUC-D10	[pUCE-D fragmento <i>SmaI</i> +10 pb- <i>BamHI</i> de <i>rraprE</i>] Este trabajo
pSG-S5	[pSGPLK fragmento <i>EcoRI-SacI</i> +5 pb- <i>BamHI</i> de <i>rraprE</i>] Este trabajo
pSG-S10	[pSGPLK fragmento <i>EcoRI-SacI</i> +10 pb- <i>BamHI</i> de <i>rraprE</i>] Este trabajo
pSG-D5	[pSGPLK fragmento <i>EcoRI-SmaI</i> +5 pb- <i>BamHI</i> de <i>rraprE</i>] Este trabajo
pSG-D10	[pSGPLK fragmento <i>EcoRI-SmaI</i> +10 pb- <i>BamHI</i> de <i>rraprE</i>] Este trabajo

4.1.2 Cepas

Referencia

<i>Escherichia coli</i> JM101	[(<i>lac-pro</i>) <i>supE</i> <i>thiF'</i> <i>traD30</i> <i>proAB</i> <i>lacI</i> ZM15]	(Messing J. 1979)
<i>Bacillus subtilis</i> BSR1	[<i>Dnpr</i> <i>hisA</i> <i>glyB</i>]	(Jan, J. <i>et al.</i> , 2000)
<i>B. subtilis</i> BSR6	[BSR1 <i>amyE</i> ::pSG31.5 <i>caf</i>]	(Jan, J. <i>et al.</i> , 2000)
<i>B. subtilis</i> BSR-H5	[BSR1 <i>amyE</i> ::pSG-H5 <i>caf</i>]	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> BSR-H10	[BSR1 <i>amyE</i> ::pSG-H10 <i>caf</i>]	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> BSR-H15	[BSR1 <i>amyE</i> ::pSG-H15 <i>caf</i>]	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> BSR-H20	[BSR1 <i>amyE</i> ::pSG-H20 <i>caf</i>]	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> BSR-S5	[BSR1 <i>amyE</i> ::pSG-S5 <i>caf</i>]	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> BSR-S10	[BSR1 <i>amyE</i> ::pSG-S10 <i>caf</i>]	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> BSR-D5	[BSR1 <i>amyE</i> ::pSG-D5 <i>caf</i>]	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> BSR-D20	[BSR1 <i>amyE</i> ::pSG-D10 <i>caf</i>]	Este trabajo

4.1.3 Oligonucleótidos utilizados

Apr400	5' AATTCAGCGGGCGCAATGGCGGCCGCATCT3'
Subjan	5' GATCCCCCATCCACAATTTTTGCTTCTCACTCTTTACCC3'
SacI-5	5' TATCGAGCTCATTGTTCTCACGGAAGCACACGC3'
SacI-10	5' TATCGAGCTCAGTACATTGTTCTCACGGAAGCACACGC3'
SacI-rev	5' CCGGCTCGAGCTATAATAGCACTATAAAAAAGTTTC3'
SmaI-5	5' GTCTCCCGGGTACGGAAATAGCGAGAGATGATATACC3'
SmaI-10	5' GTCTCCCGGGAATTGTACGGAAATAGCGAGAGATGATATACC3'
SmaI-rev	5' CGGCGGGCCCTCTGAGCTTTATTGATAAAGG3'
H20	5' CTTAAATAGAGATAAGCTTAATCCAGTAACAGTAAATCATCTCAAAAA3'
H15	5' CTTAAATAGAGATAAGCTTAATCCAGTAAATCATCTCAAAAA3'
H10	5' CTTAAATAGAGATAAGCTTAATCCAAATCATCTCAAAAA3'
H5	5' CTTAAATAGAGATAAGCTTAATCATCTCAAAAA3'
Hrev	5' CCCGAAGCTTATCTCTATTTAGGTATATC3'

4.2 Condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas de *E. coli* se crecieron rutinariamente en medio Luria Bertani (LB. Sambrook *et al.*, 1989), suplementado con antibióticos, a las concentraciones necesarias. Para la conservación de las cepas se utilizó medio líquido LB adicionado con glicerol; refrigerando inmediatamente y conservando hasta su uso a la temperatura de -70°C (Sambrook *et al.*, 1989). Para el manejo de las cepas, primeramente, se tomó una asada del cepario en glicerol y se plateó en cajas de Petri con medio LB agar y suplementado con los requerimientos específicos de cada cepa. El uso de LB sólido se utilizó tanto para preparaciones de precultivos líquidos de LB, como para llevar a cabo medios de selección en las transformaciones (Sambrook *et al.*, 1989).

Las cepas de *B. subtilis* se crecieron rutinariamente en matraces Fernback con 500 ml de medio de esporulación Shaeffer, a 37°C (Shaeffer *et al.*, 1965), para los ensayos de actividad de β -Galactosidasa.

El crecimiento de las cepas de *B. subtilis* utilizadas como precultivos, así como para su conservación en glicerol, se realizó de forma igual que para las cepas de *E. coli* (Sambrook *et al.*, 1989).

4.3 Construcciones genéticas y análisis de secuencia de DNA

Los plásmidos fueron purificados por medio de técnicas de Biología Molecular básica (Sambrook *et al.*, 1989), con excepción de aquellos utilizados para su análisis por secuencia, fueron purificados usando un Kit de reactivos Qiagen, de acuerdo a las instrucciones del proveedor. (Quiagen Inc., Chatsworth, CA). Las enzimas de modificación y restricción de DNA fueron obtenidas de Gibco BRL (Life technologies, Grand Island N. Y.) y fueron usadas de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

4.4 Fusiones traduccionales de *rraprE-lacZ*

Las fusiones traduccionales de la región 5' de regulación de gen *aprE* (*rraprE*) se llevaron a cabo utilizando el gen reportero *lacZ* de *E. coli*; el cual ha sido empleado de manera eficiente en la investigación de la regulación de *aprE* y otros genes en *B. subtilis*. (Jan *et al.*, 2000). La fusión es efectuada al incorporar la *rraprE* en su extremo

3' con el sitio de restricción *Bam*HI utilizando el oligonucleótido subjan, (Fig. 4) el cual incorpora este sitio en fase con el gen *lacZ* que se encuentra en el vector pSGPLK. El vector pSGPLK es un vector que presenta un gen de resistencia a ampicilina y un origen de replicación que permite su replicación en *E. coli*, así mismo presenta el gen de resistencia a cloranfenicol, un sitio de múltiple clonación unido al el gen *lacZ* con un sitio de clonación *Bam*HI en su extremo 5', y flanqueado con los fragmentos 5' y 3' del gen *amyE* de *B. subtilis*. (Jan *et al.*, 2000). Este plásmido permite la integración al cromosoma por medio de una doble recombinación homóloga al *locus amyE*.

4.5 Ensayo de actividad para β -Galactosidasa

El ensayo para determinar actividad de β -Galactosidasa en las cepas de *B. subtilis* que llevan mutaciones en la región 5' de regulación del gen *aprE* fue realizado según Ferrari y colaboradores (Ferrari *et al.*, 1988) y llevada a cabo durante el crecimiento exponencial y el crecimiento estacionario, durante intervalos de tiempo regulares, con pequeñas modificaciones basadas en la experiencia del laboratorio en estas determinaciones (Fig. 1),

Primeramente se hace una separación de colonias, estriando una asada de la cepa en glicerol y dejando en incubación a 37°C durante un día. Posteriormente se toma una colonia y se deja crecer en medio LB hasta su fase estacionaria. De este inóculo se depositan 200 μ l a un preinóculo de 3 ml de medio Shaeffer por aproximadamente 3 hrs. En este tiempo el cultivo alcanza aproximadamente 0.5 unidades de densidad óptica leídas a 600 nm. Se ajusta la densidad óptica de todos los cultivos a 0.5 unidades y se inoculan de los precultivos en alícuotas que van de 0.5 a 2 ml; esto depende estrictamente del cálculo de ajuste a 0.5 unidades. Se inoculan 500 ml de medio Shaeffer y se muestrea cada media hora después de 3 hrs, tiempo en el cual los cultivos se encuentran aproximadamente en el tiempo t-2. Se toman alícuotas y se procesan para la determinación de proteína y el ensayo de actividad de β -Galactosidasa. En este trabajo en particular, el muestreo se siguió hasta el tiempo t 6 (ver Fig. 1).

5. RESULTADOS

5.1 Construcción de mutantes

Para obtener mutantes que presentaran cambios en la orientación rotacional del DNA en la región 5' de regulación del gen *aprE*, se procedió a diseñar oligos que introdujeran múltiplos de 5 pb en algunos sitios de la región de regulación de *aprE* y que presentaran la misma composición de nucleótidos A-T/C-G para no alterar la composición general de *rraprE* (Fig. 6).

Uno de los sitios de inserción elegidos fue cerca del sitio 2 de unión al represor Hpr, sin afectar su secuencia de reconocimiento y unión (Fig. 6). Se introdujeron múltiplos de 5 pb (5, 10, 15 y 20), provocando en la topología del DNA medios giros y giros completos con respecto a la topología silvestre del gen.

Se amplificó un fragmento de 373 pb utilizando el oligo *aprE400*, el cual introduce en el extremo 5' del fragmento un sitio de restricción para la enzima *EcoRI* y el oligo *HindIII*-rev, que introduce en el extremo 3', el sitio *HindIII* (Fig. 6 y 7). Este fragmento fue purificado de un gel de agarosa y clonado en el vector pBR328 digerido con las enzimas correspondientes. Se transformó y se seleccionaron colonias sensibles al antibiótico cloranfenicol. A este vector se le nombro pBRE-H y fue utilizado para la construcción de las mutantes que llevan el sitio *HindIII* y los múltiplos de 5 pb (pBR-H5, pBR-H10, pBR-H15 y pBR-H20. Fig. 7).

Una vez obtenido este vector, se procedió a amplificar el resto de la secuencia 5' de regulación hasta los tres primeros codones del gen de *aprE*. Se utilizó el oligo subjan, el cual introduce un sitio de *BamHI* en el extremo 3' y cuatro diferentes oligos, *HindIII*-5, *HindIII*-10, *HindIII*-15 y *HindIII*-20, los cuales introducen un sitio de *HindIII* en el extremo 5' y adicionan 5, 10, 15 y 20 pb, respectivamente, a la *rraprE* en la posición -60 (Fig. 6 y 7). Los fragmentos amplificados fueron digeridos con *BamHI* y *HindIII* y clonados en el vector pBRE-H, digerido con las mismas enzimas de restricción. Las mutantes fueron seleccionadas con tetraciclina (30 µg /ml).

EcoRI

aprE400 5' **GAATTC**AGCGGGCGCAATGGCGGGCCGCATCTGATGTCTTTGCTTGGCGAATGTTTCATCTTATTTCTTCCTCCCTCTCAATAATTTTTT
AATTTCAGCGGGCGCAATGGCGGGCCGCATCTGATGTCTTTGCTTGGCGAATGTTTCATCTTATTTCTTCCTCCCTCTCAATAATTTTTT

Hpr 4 Hpr 3 SinR
CATTCTATCCCTTTTCTGTAAAGTTTATTTTFCAGAATACFTTTATCATCAATGCTTTTGAAAAAATATCACCATAATATCCATTTGTTTCTCACGGAAGCACACG
SacI-5 5' TATCGAGCTCATTGTTTCTCACGGAAGCACACGC3'
SacI-10 5' TATCGAGCTCAGTACATTGTTTCTCACGGAAGCACACGC3'
SacI-rev 3' GAAACTTTTTTATAGTGTATTATAGCTCGAGCCGG5'

SinR

DegU

CAGGTCATTTGAACGAATTTTTTCGACAGGAATTTGCCGGGACTCAGGAGCATTTAACCTAAAAAAGCATGACATTTCCAGCNTAATGAACATTTACTCATGT

HindIII-rev 3' CTATATGGATTTATCTCTATTCGGAAGCC5'
HindIII-20 5' CTTAAATAGAGATAAGCTTAATCCAGTAACAGTAAAAATCATCTCAAAAA3'
HindIII-15 5' CTTAAATAGAGATAAGCTTAATCCAGTAAAAATCATCTCAAAAA3'
HindIII-10 5' CTTAAATAGAGATAAGCTTAATCCAAATCATCTCAAAAA3'
HindIII-5 5' CTTAAATAGAGATAAGCTTAATCATCTCAAAAA3'

CTATTTTCGTTCTTTTCTGTATGGAATAGTTATTTTCGAGTCTCTACGGAAATAGCGAGAGATGATATACCTAAATATACCTAAATAGAGATAAAATCATCTCAAAAAATG
SmaI-5 5' GTC**TCCC**GGGTACGGAAATAGCGAGAGATGATATACC3' Hpr 2
SmaI-10 5' GTC**TCCC**GGGAATGTACGGAAATAGCGAGAGATGATATACC3'
SmaI-rev 3' CCTTTATCAATAAAGCTCAGAGGGCCCGCG

-35 Hpr 1 -10 +1 Subjan 3' CCCATTTCTCACTCT
GGTCT**ACTAA**AATATTTATTTCCATCTA**TACAAT**AAATTCACAGAATAGTCTTTTAAGTAAGTCTACTCTGAATTTTTTTAAAGGAGAGGGTAAAGAGTGGAGA
AbrB

BamHI

TCGTTTTTTAACACCTACCC**CTAGG**-5'
AGCAAAAAATGTGGATGGGGGATC

Figura 6: Secuencia y mutaciones en la región 5' de regulación del gen *aprE*. Los sitios de pegado de las proteínas reguladoras son mostrados.

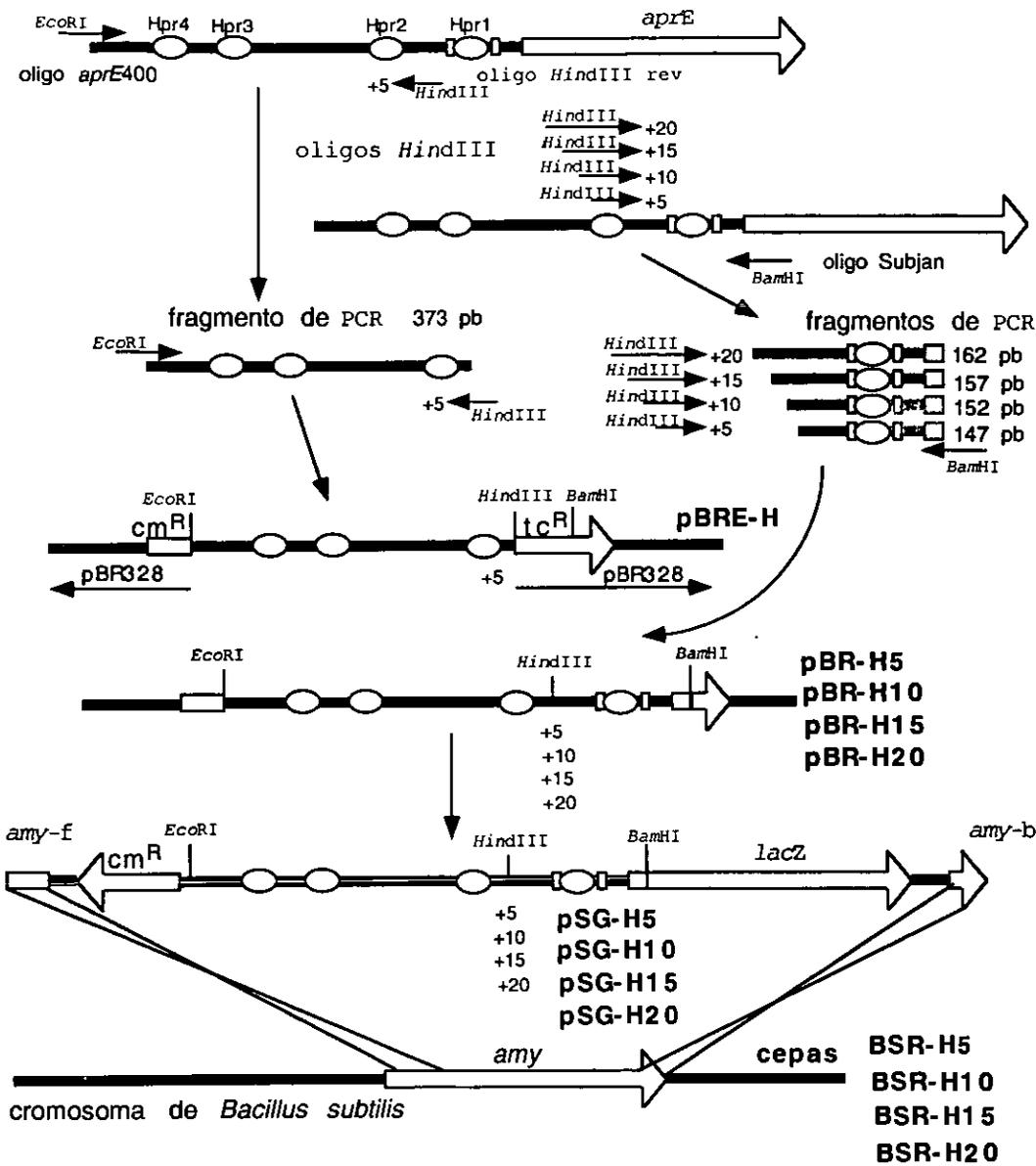


Figura 7: Construcción de los plásmidos y las cepas con mutaciones de múltiplos de 5 pb en la *rraprE* con la introducción de un sitio *HindIII*.

Una vez que se obtuvieron las clonas, se purificaron los plásmidos, se confirmó la existencia de cada una de las mutaciones por digestión con las enzimas correspondientes y se secuenciaron los fragmentos correspondientes a las distintas versiones de la región de regulación de *aprE* mutagenizada. A estos plásmidos se les nombraron pBR-H5, pBR-H10, pBR-H15 y pBR-H20 (Fig. 7).

Se hizo un PCR de los plásmidos pBR-H5, pBR-H10, pBR-H15 y pBR-H20, utilizando los oligos *aprE400* y *subjan*, se purificaron los fragmentos y se digirieron con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*. Estos fragmentos se ligaron al vector pSGPLK (Jan, *et al.*, 2000) en sus sitios únicos de *EcoRI* y *BamHI*. El sitio de *BamHI* permite una fusión traduccional con el gen reportero *lacZ* en este vector. pSGPLK puede estar presente en la bacteria *E. coli* como un plásmido replicativo, mientras que en *B. subtilis* es integrativo. Las construcciones son integradas por medio de una doble recombinación homóloga en el *locus* del gene de amilasa, *amyE*, permitiendo seleccionar a las transformantes en un medio de selección con almidón, cloranfenicol y producción de color azul en medio con X-gal (Jan, *et al.*, 2000; Maniatis *et al.*, 1982). A los plásmidos obtenidos se les nombraron pSG-H5, pSG-H10, pSG-H15 y pSG-H20 y a las clonas de *B. subtilis* con las integraciones en el *locus amyE*, BSR-H5, BSR-H10, BSR-H15, BSR-H20, respectivamente (Fig. 7).

Se hizo una prueba cualitativa del efecto de las inserciones de múltiplos de 5 pb en la posición -60 de las mutantes en la *rraprE*. En cajas de Luria y X-gal, a simple vista, se observaba un incremento en la actividad de β -Galactosidasa de manera secuencial, siendo mayor el aumento en actividad en la cepa H20 y menor en las otras cepas H15, H10 y H5 (datos no mostrados).

Otro de los sitios elegidos para introducir medios giros y giros completos fue en la posición -99, entre los sitios de unión del represor Hpr (sitio 2) y el sitio de unión a DegU, sin afectar las secuencias de reconocimiento y unión (Fig. 6 y 8). Para ello, se elaboraron diferentes oligos que pudieran introducir múltiplos de 5 pb, provocando en la topología del DNA giros completos y medios giros con respecto a la topología silvestre del gen (Fig 6 y 8).

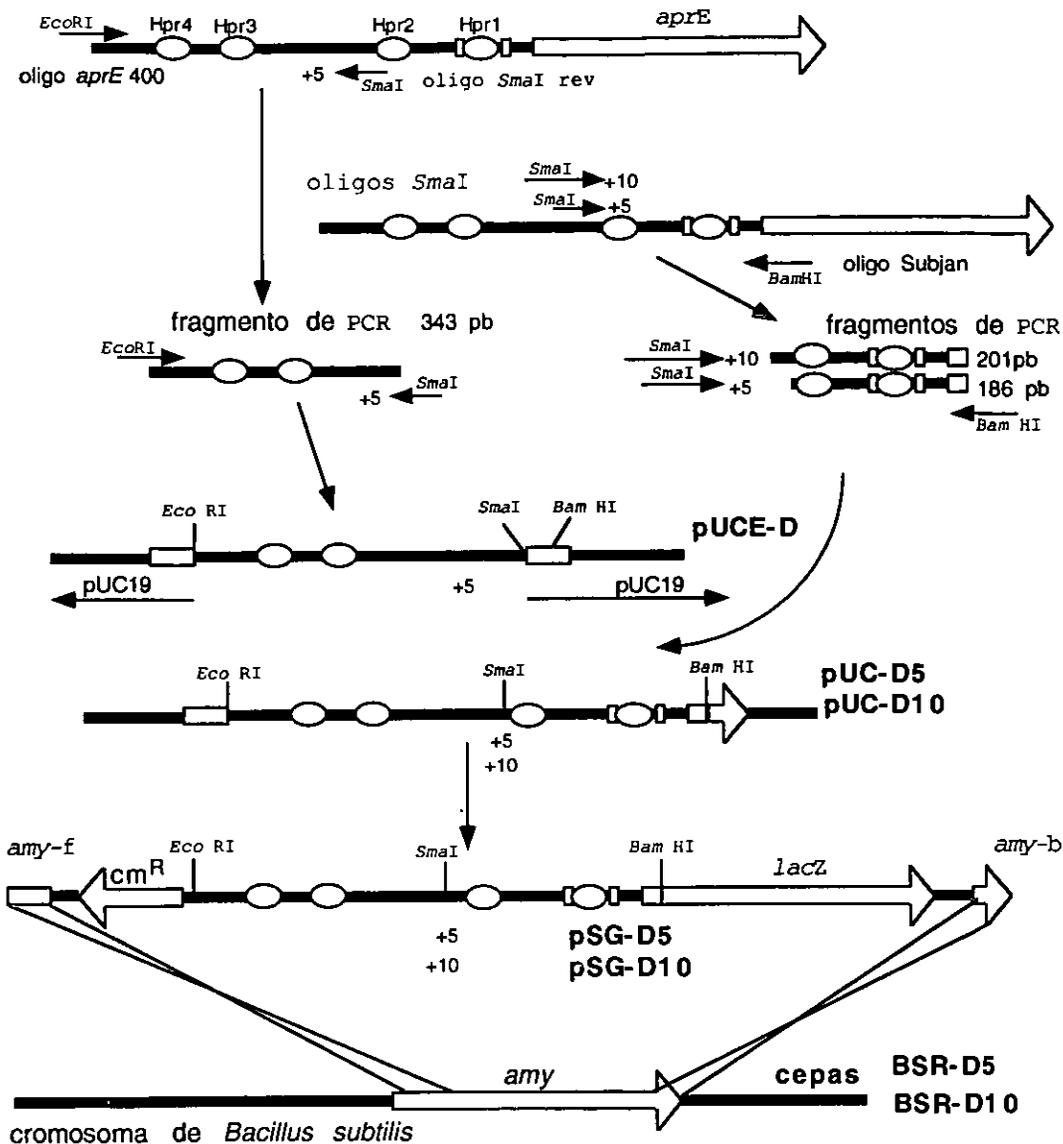


Figura 8: Construcción de los plásmidos y las cepas con mutaciones de múltiplos de 5 pb en la *rraprE* con la introducción de un sitio *SmaI*.

Se elaboraron oligos que introducen un sitio único de *SmaI*. Se amplificó un fragmento de 343 pb utilizando el oligo *aprE400* y el oligo *SmaI*-rev, el cual introduce en el extremo 3' del fragmento un sitio de *SmaI*. Este fragmento fue purificado de un gel de agarosa y clonado en el vector pUC19, digerido en sus sitios únicos del enlazador con *EcoRI* y *SmaI*, ligado con el fragmento amplificado y digerido con las mismas enzimas de restricción. Se transformó y se seleccionaron colonias sensibles al antibiótico ampicilina. Este vector, con este fragmento se le nombró pUCE-D y fue utilizado para la construcción de las mutantes que llevan el sitio *SmaI* y los múltiplos de 5 pb en la posición -99 (pUC-D5 y pUC-D10. Fig. 6 y 8).

De manera semejante a las otras construcciones, se utilizó el oligo *subjan*, el cual introduce un sitio de *BamHI* en el extremo 3' y los oligos *SmaI*-5, *SmaI*-10, que introducen un sitio de *SmaI* en el extremo 5', obteniéndose fragmentos de 186 y 201 pb, respectivamente. Los fragmentos fueron digeridos con *BamHI* y *SmaI* y clonados en el vector pUCE-D, digerido con las mismas enzimas de restricción y las mutantes fueron seleccionadas con ampicilina (100 µg/ml) (Fig 8).

Se purificaron los plásmidos, se confirmó la existencia de cada una de las mutaciones por digestión con las enzimas correspondientes y se secuenciaron los fragmentos de la región de regulación de *aprE* mutagenizada. A estos plásmidos se les nombraron pUC-D5 y pUC-D10 (Fig. 8).

Se hizo un PCR de los plásmidos, utilizando los oligos *aprE400* y *subjan*; se purificaron los fragmentos y se digirieron con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*; estos fragmentos se ligaron al vector pSGPLK en los sitios únicos de *EcoRI* y *BamHI*. A los plásmidos obtenidos se les nombraron pSG-D5 y pSG-D10 y a las clones de *B. subtilis* con las integraciones en el *locus amyE*, BSR-D5, BSR-D10, respectivamente (Fig. 8).

Para obtener una visión más precisa de los efectos de insertar múltiplos de 5 pb, por último se eligió un sitio cercano de unión al represor Hpr (sitio 3) y el sitio de unión a SinR, sin afectar su secuencia de reconocimiento y unión en la posición -268 (Fig. 6 y 9).

Se elaboraron oligos que introducen en la secuencia un sitio único de *SacI*. Se amplificó un fragmento de 165 pb utilizando el oligo *aprE400* y el oligo *SacI*-rev, que introduce en el extremo 3' del fragmento un sitio de *SacI*. Este fragmento fue purificado de un gel de agarosa y clonado en el vector pUC19, digerido en sus sitios únicos del enlazador con *EcoRI* y *SacI*, ligado con el fragmento amplificado y digerido con las mismas enzimas de restricción. Se transformó y se seleccionaron colonias sensibles a el antibiótico ampicilina (100 µg/ml). Al vector construido se le nombró pUCE-S y fue utilizado para la construcción de las mutantes que llevan el sitio *SacI* y los múltiplos de 5 pb en la posición -268 de la *rraprE* (pUC-S5 y pUC-S10. Fig 6 y 9).

De manera semejante a las otras construcciones, se utilizó el oligo Subjan el cual introduce un sitio de *BamHI* y los oligos, *SacI*-5, *SacI*-10, que introducen un sitio de *SacI* en el extremo 5', obteniéndose fragmentos de 364 y 369 pb, respectivamente. Los fragmentos fueron digeridos con *BamHI* y *SmaI* y clonados en el vector pUCE-S, digerido con las mismas enzimas de restricción y las mutantes fueron seleccionadas con ampicilina (100 µg/ml. Fig 9).

Se purificaron los plásmidos, se confirmó la existencia de cada una de las mutaciones por digestión con las enzimas correspondientes y se secuenciaron los fragmentos de la región de regulación de *aprE* mutagenizada. A estos plásmidos se les nombraron pUC-S5 y pUC-S10 (Fig. 9).

Se hizo un PCR de los plásmidos utilizando los oligos *aprE400* y subjan. Se purificaron los fragmentos y se digirió con las enzimas de restricción *EcoRI* y *BamHI*. Estos fragmentos se ligaron al vector pSGPLK en los sitios únicos de *EcoRI* y *BamHI*.

A los plásmidos obtenidos se les nombro pSG-S5 y pSG-S10 y a las clonas de *B. subtilis* con las integraciones en el *locus amy*, BSR-S5 y BSR-S10, respectivamente (Fig. 9).

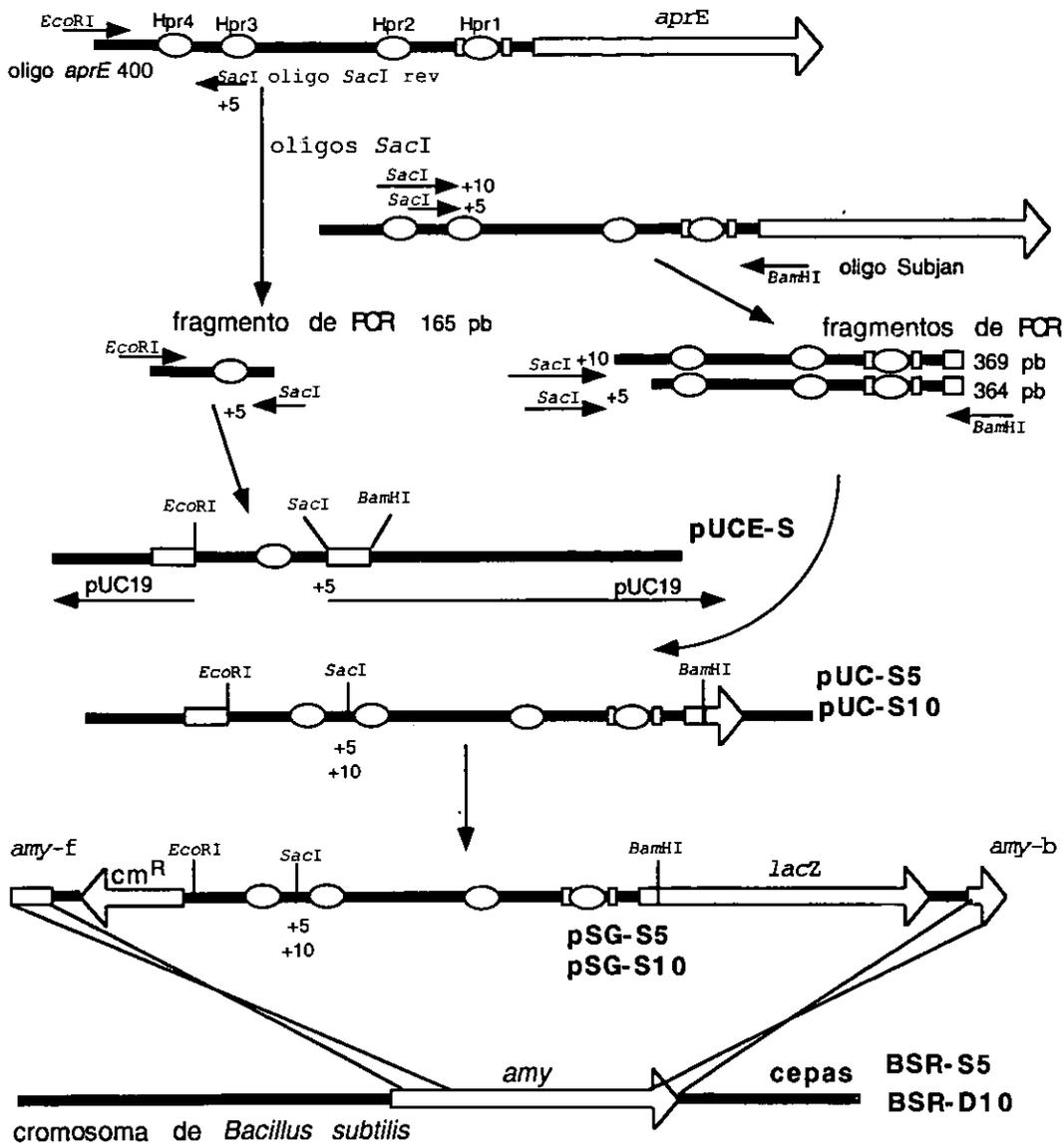


Figura 9: Construcción de los plásmidos y las cepas con mutaciones de múltiplos de 5 pb en la *rrapE* con la introducción de un sitio *SacI*.

5.2 Determinaciones de actividad de β -Galactosidasa

Se hicieron determinaciones de actividad de β -Galactosidasa de las cepas BSR-H5 (*Hind*III + 5 pb), BSR-H10 (*Hind*III + 10 pb), BSR-H15 (*Hind*III +15 pb), BSR-H20 (*Hind*III + 20 pb). Se observó que la actividad de β -galactosidasa incrementaba conforme aumentaba el distanciamiento de los sitios de unión de Hpr, sitios 1 y 2 (Fig. 10 y 11). El aumento en la actividad observada fue debido a la pérdida de cooperatividad del represor Hpr en estos sitios. Este resultado es muy importante ya que es el primer dato que establece cooperatividad en este sistema y que involucra la participación de la proteína Hpr en sus sitios de unión 1 y 2 (Fig. 7, 10 y 11).

Se hicieron determinaciones de actividad de β -Galactosidasa de las cepas BSR-S5 (*Sac*I + 5 pb) y BSR-S10 (*Sac*I +10 pb). Se observó que las actividades de β -Galactosidasa aumentaron con respecto a la cepa silvestre. En el caso particular, la cepa BSR-S5 presentó una actividad máxima de 1630 u/mg proteína al tiempo t3; mientras que en la cepa BSR-S10 se observó una actividad máxima de 1549 u/mg de proteína al tiempo t6 (tiempo relativo a la esporulación). Esto representa un restablecimiento parcial de la actividad, el cual ha sido observado en otros sistemas (Li *et al.*, 1988). Este efecto en la cepa BSR-S5, indica que se ha desfasado al represor Hpr en el sitio 2 de unión con un medio giro. La actividad es restablecida parcialmente en la cepa BSR-S10 con un giro completo. Estos datos apoyan la hipótesis de la formación de una horquilla de DNA entre el sitio 2 y 3 de unión de Hpr. El restablecimiento en la actividad no es total, tal vez debido a que también se están modificando otros sitios de unión de los reguladores DegU y SinR (Fig. 10 y 12).

Cuando se hicieron determinaciones de actividad de β -Galactosidasa de las cepas BSR-D5 (*Sma*I + 5 pb) y BSR-D10 (*Sma*I +10 pb), se observó que las actividades de β -Galactosidasa aumentaron con respecto a la cepa silvestre. En el caso particular de la cepa BSR-D5, presentó una actividad máxima de 1005 u/mg de proteína en el tiempo t5, mientras que en la cepa BSR-D10 mostró una actividad máxima de 1208 u/mg de proteína en el tiempo t6. Este aumento representa un restablecimiento parcial de la actividad del 72% en el tiempo t3. Este efecto en la cepa BSR-D5, indica que se ha desfasado al represor Hpr en el sitio 3 de unión con un

medio giro. La actividad es restablecida parcialmente en la cepa BSR- D10 con un giro completo. Estos datos corroboran que se está estableciendo la formación de una horquilla de DNA en el sitio 2 como en el sito 3 de unión de Hpr en el gen *aprE*. El restablecimiento parcial es debido a lo antes mencionado (Fig. 7, 10 y 12).

En la figura 10 se puede apreciar que el efecto en las mutaciones es más drástico en las cepas BSR-D5 y BSR-D10 que en las cepas BSR-S5 y BSR-S10. Esta diferencia puede ser debida a que no sólo se está modificando rotacionalmente el sitio de unión de Hpr (Fig. 7), sino que también se está modificando muy probablemente el sitio de unión del activador DegU. Estos datos nuevamente están en favor de la hipótesis de la formación de una horquilla de tipo represora proteína-proteína de DNA, que involucra la participación de la proteína Hpr en los sitios 2 y 3 en la región de regulación del gen *aprE*.

MODELO PROPUESTO

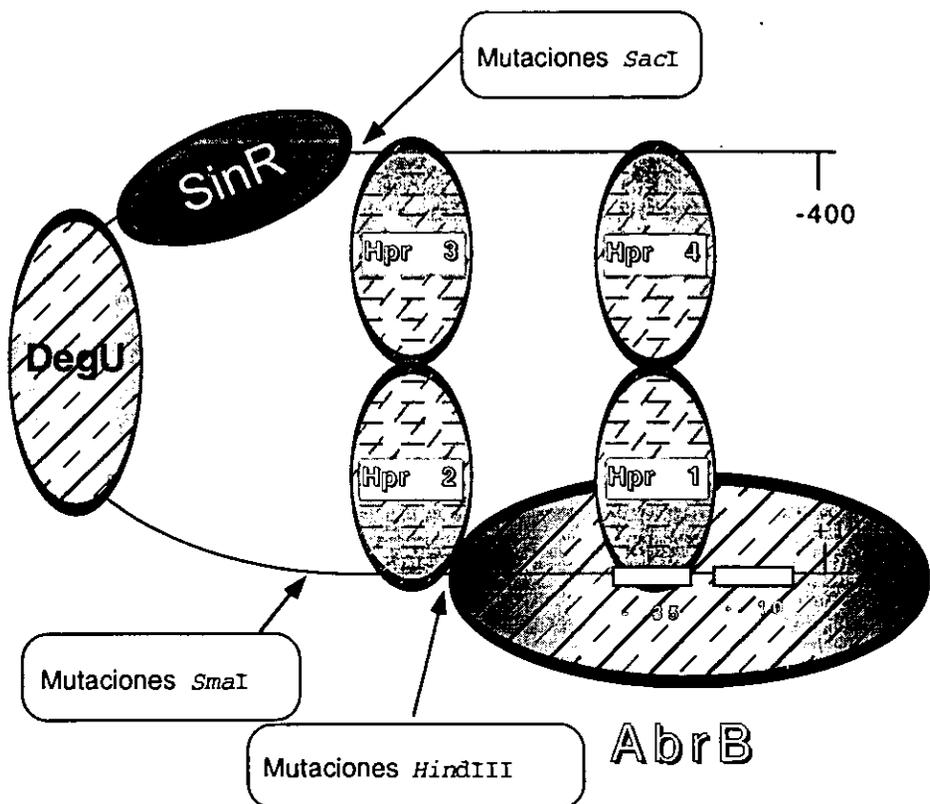
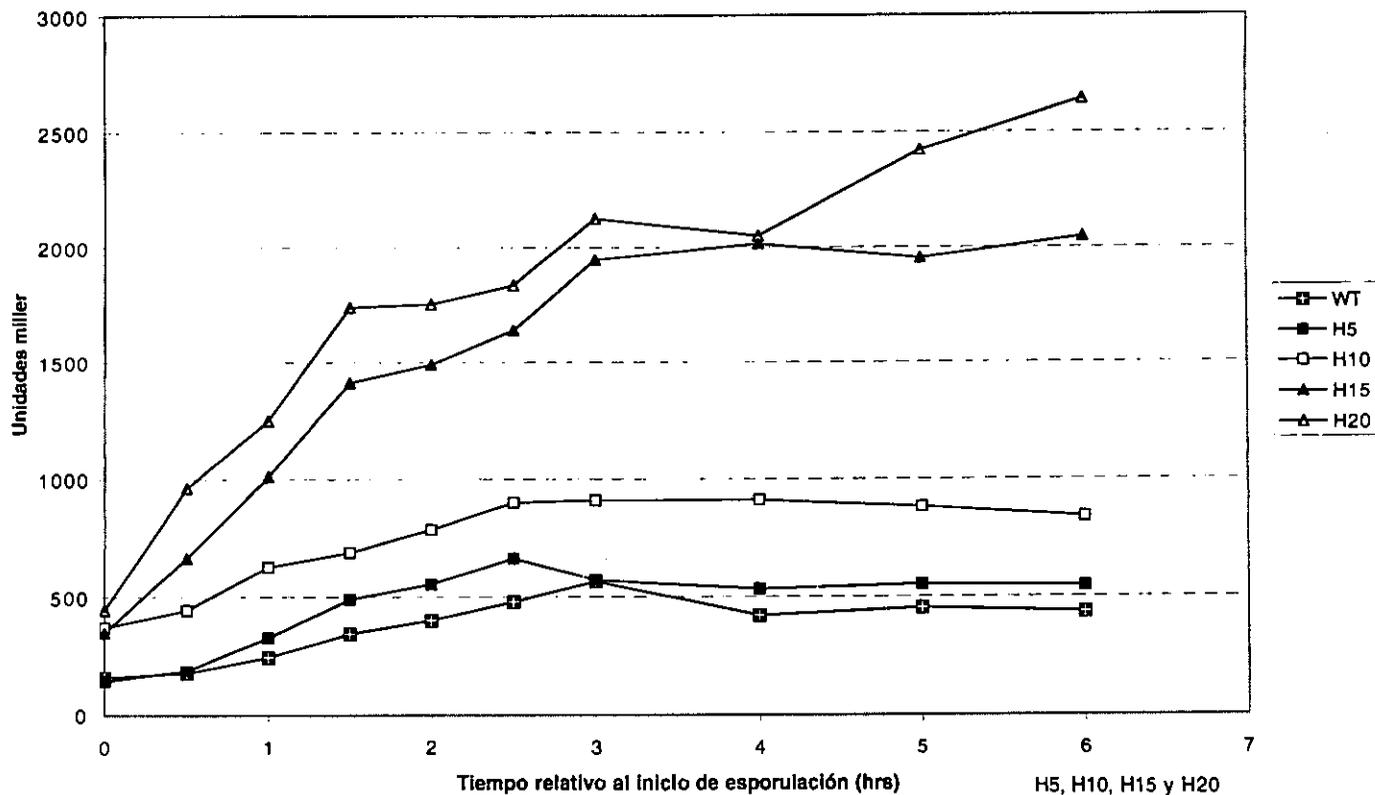


Figura 10: Curvatura en el gen *aprE*, sitios de unión de proteínas reguladoras y mutaciones realizadas.

Figura 11: Actividad de β -galactosidasa en mutantes *rraprE-lacZ* que llevan inserciones de 5,10,15 y 20 pb entre los sitios de unión Hpr1 y Hpr2



66

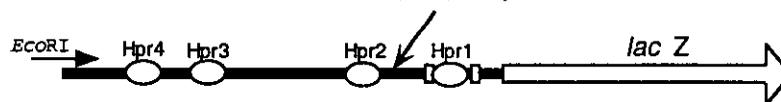
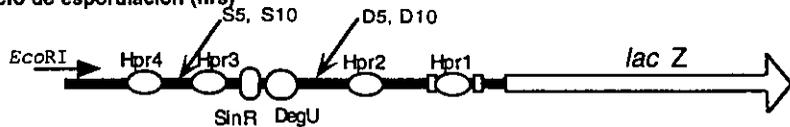
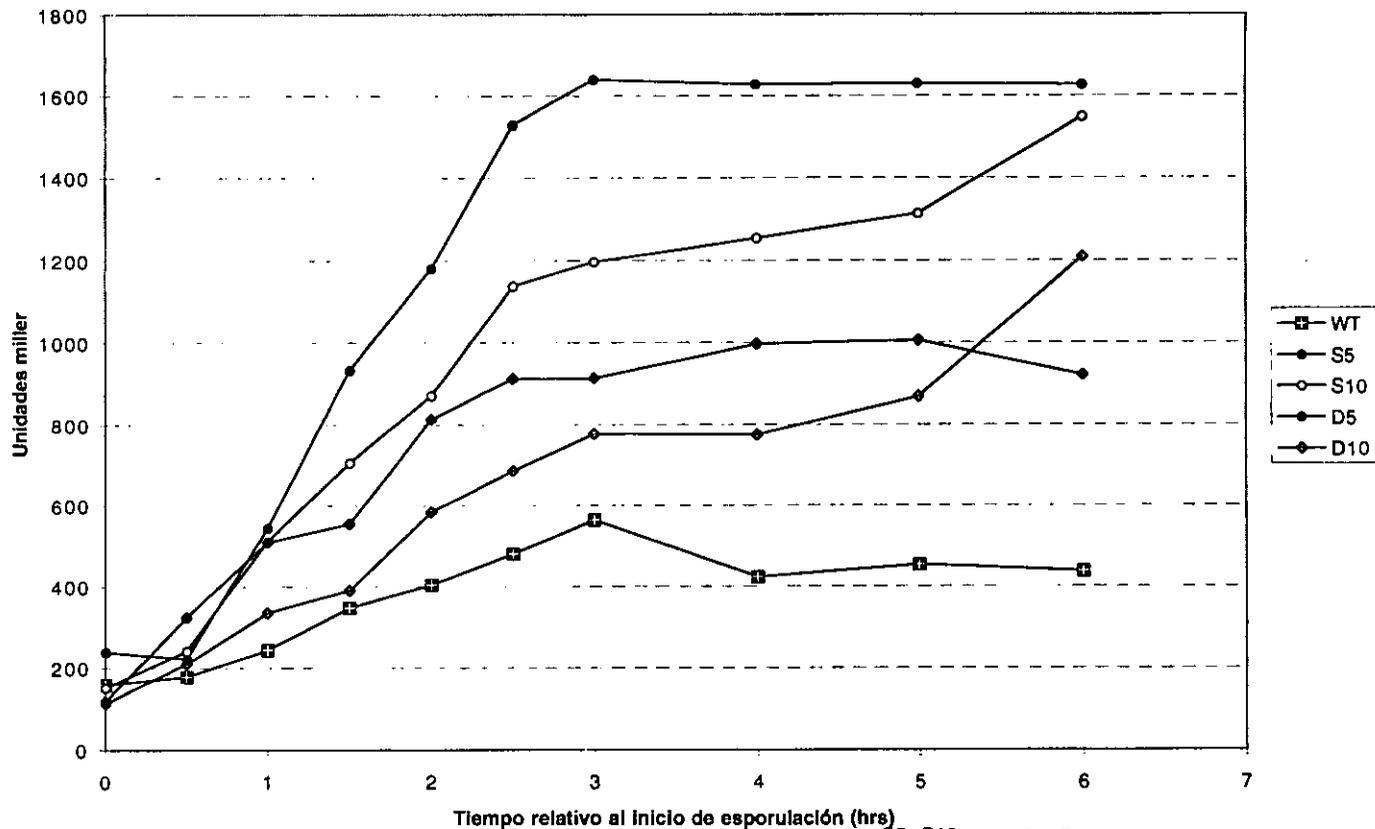


Figura 12: Actividad de β -galactosidasa en mutantes *rraprE-lacZ* que llevan inserciones de 5 y 20 pb entre los sitios de unión DegU y Hpr2, SinR y Hpr3



6. DISCUSION

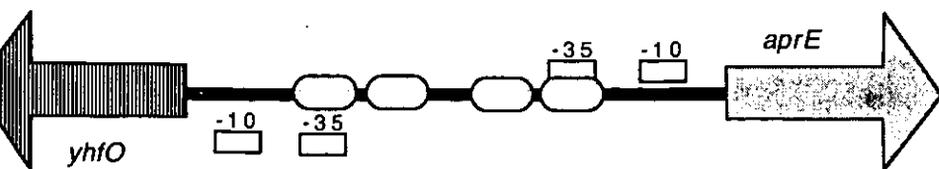
El gen *aprE* es un gen que se encuentra multirregulado, siendo sus reguladores principales los represores AbrB, Hpr y SinR, y estando regulado positivamente por el sistema de dos componentes DegS/DegU. La proteína represora Hpr posee 4 sitios de unión en la región 5' de regulación. El primer sitio de unión sobrelapa la región promotora del gen *aprE* de manera similar al sitio de unión de la proteína AbrB. Aún no es muy claro porque un gen que pudiera parecer no esencial para la supervivencia de *B. subtilis* se encuentra tan regulado. Al parecer este gen podría ser más importante de lo que originalmente se pensó en su entorno natural, donde las condiciones de crecimiento están determinadas por el ambiente, siendo necesario el ahorro de energía y biomoléculas empleadas en la síntesis de proteínas. En estas condiciones de limitación de nutrimento, la síntesis de la proteasa alcalina subtilisina, es requerida para la obtención de nutrimento difícilmente accesibles. En condiciones de crecimiento en el laboratorio, la síntesis de esta proteína es mayoritaria del total de proteínas expresadas a partir del estado de transición hasta mas o menos cuatro horas después de t0. En condiciones de laboratorio el gen puede ser interrumpido en el genoma no se producen alteraciones fenotípicas, ni cambios en el ciclo de vida de *B. subtilis*. Pero aún se desconoce como pudiera ser la expresión de *aprE* en vida libre ante distintos cambios del medio ambiente.

Es posible pensar que los sistemas de regulación en los que existe la formación de horquillas de DNA a través interacciones de tipo proteína-proteína, sean altamente finos en su regulación. Un ejemplo de este tipo de sistema de regulación es el mediado por el represor Hpr sobre *aprE*. Se han encontrado otros sitios de unión de este regulador en los genes del gen *nprE* así como en el operón de *sin*, teniendo en ambos casos dos sitios de unión separados por varios pares de bases, por lo que se podría sugerir la formación de una horquilla represora en estos genes, de una manera más general como se ha descubierto en otros sistemas bacterianos. Sería muy importante, ahora que se cuenta con el genoma completo de *B. subtilis*, localizar si en las regiones de regulación de otros genes, el represor Hpr puede actuar simultáneamente en dos sitios distantes y si éste es un sistema general de regulación del represor Hpr. También es importante resaltar que la

interacción de Hpr en el gen *aprE* es a través de cuatro sitios de unión de esta proteína monomérica, en tanto que la formación de horquillas por proteínas es mayoritariamente de proteínas diméricas y formando tetrámeros al interactuar en la región de regulación, como es el caso del represor del fago lambda, donde se ha podido observar que existe cooperatividad de este represor. Al igual que en este caso, en el presente trabajo se aportan evidencias experimentales que soportan la idea de interacción cooperativa de Hpr en su pegado a los sitios de unión 1 y 2 en la regulación de *aprE*.

Se sabe que la regulación a distancia de un activador, como de un represor, es favorecida por la formación de una horquilla de DNA que permite la interacción de estas proteínas con la RNA polimerasa. En el modelo que se ha propuesto intervienen distintas proteínas que interactúan a distancia en el gen de *aprE*, una de ellas es la proteína SinR, que actúa como represor en este sistema; el otro es la proteína DegU que es un activador en este sistema. En una cepa de *B. subtilis* en la cual se ha interrumpido el gen *hpr*, es posible pensar que la formación de la horquilla de DNA mediada por Hpr no se lleve a cabo, sin embargo sabemos que no se pierde el efecto regulador de otras proteínas reguladoras como DegU y SinR, que también actúan a distancia. Una opción sería que ellas mismas establecieran la formación de una horquilla para interactuar con la RNA polimerasa, sin embargo, nuestros resultados de medición de actividad de β -galactosidasa en nuestras cepas mutantes indican que este no es el caso. La explicación más probable para entender la conservación de la regulación por DegU y SinR en cepas (*hpr*-) es la que considera que la horquilla pueda ser formada por la curvatura intrínseca del DNA en la región de regulación de *aprE*. Es posible que la curvatura estática del DNA en la región de regulación de *aprE* pudiera ser suficiente para permitir una interacción de estas proteínas reguladoras con la RNA polimerasa, tal y como se ha demostrado en otros sistemas de regulación en ausencia de una horquilla por interacción proteína-proteína, como ejemplo el operón *araBAD*.

Tomando en cuenta que para la regulación del gen *aprE* es necesario más de 400 pb hacia arriba del inicio de la transcripción y su transcripción es en dirección divergente respecto a la del gen *yhfO* que se encuentra río arriba (Fig. 13), podría pensarse que las regiones de regulación de *aprE* y *yhfO* comparten sitios de



○ sitios de unión de Hpr

← gen *yhfO*

→ gen *aprE*

□ -10 □ -35 cajas del promotor σ^A

— región 5' de regulación

Figura 13: Sitios de unión de Hpr en las regiones de regulación de los genes divergentes *yhfO* y *aprE* en el cromosoma de *B. subtilis*.

pegado a proteínas reguladoras. ¿Cuál es el límite de los sitios de regulación de uno y otro gen?. El papel de la proteína codificada por *yhfO* aun es desconocido, sin embargo es posible pensar que este relacionada con la fase estacionaria de crecimiento, ya que se observó que el sitio 4 de unión de Hpr sobrelapa dos pares de bases de la posible caja -35 del promotor del gen *yhfO*. Este sitio 4 es un sitio reportado de unión de Hpr en la regulación de *aprE*. Adicionalmente, el programa detectó otro sitio más arriba del sitio 4 de unión de Hpr (sitio 5) con respecto al gen *aprE*, que sobrelapa exactamente sobre la probable caja -10 del promotor de *yhfO*. Aún no se ha reportado si este sitio de unión es utilizado por Hpr, pero esto hace aún más interesante como podría establecerse una regulación a través de Hpr que regulara ambos genes simultáneamente. Sería importante realizar experimentos fusionando un gen reportero que permitiese detectar la expresión del gen *yhfO* y correlacionarlo con la expresión de *aprE*. Todavía falta obtener más datos sobre como se lleva acabo la regulación de genes multirregulados que pueden formar estructuras secundarias en el DNA, como es el caso de *aprE*, pero conforme se continúe trabajando en estos sistemas de regulación se podrá argumentar con mayor seguridad la importancia que tiene este tipo de regulación en el ciclo de vida de *B. subtilis*.

7. CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos en este trabajo se pueden establecer las siguientes conclusiones.

El represor Hpr requiere de los sitios de unión Hpr1 y Hpr2 en la región de regulación de *aprE* para establecer una interacción proteína-proteína de tipo cooperativo.

Los sitios Hpr2 y Hpr3 del represor Hpr presentan interacción proteína-proteína, estableciéndose la formación de una horquilla de DNA de tipo represor y se requiere que ambos sitios estén en fase para que se establezca esta interacción.

Las determinaciones de actividad de β -Galactosidasa entre las mutaciones que presentan múltiplos de 5 pares de bases e insertan el sitio *Scal* y las mutaciones que insertan el sitio *SmaI*, demuestran que se establece una horquilla mediada por el contacto de la proteína Hpr en los sitios de unión Hpr2 y Hpr3. Se puede observar que el desfase de los sitios de unión de Hpr como el restablecimiento de la fase de los sitios en las mutaciones que presentan el sitio de unión *SmaI*, presentan menor actividad que las mutaciones en los sitios *Scal*. Este efecto puede ser debido a que se están modificando también los sitios donde actúan el activador DegU y el represor SinR.

8. PERSPECTIVAS

De este trabajo pueden establecerse los siguientes puntos que de manera particular podrían contribuir aun más a esclarecer como se lleva la regulación en *aprE* en *B. subtilis*.

Establecer el efecto que se daría al efectuar mutaciones de desfaseamiento en el sitio 4 de unión de Hpr en *aprE*, debido a que este sitio en particular puede ser utilizado para la regulación del gen divergente *yhfO*.

Efectuar mutaciones de desfaseamiento haciendo mutaciones en dos sitios diferentes al mismo tiempo. Como ejemplo, mutaciones dobles en los sitios Hpr1 y Hpr4, Hpr2 y Hpr3 de unión del represor Hpr, que daría una visión más clara de cómo interactúa DegU y SinR en la *rraprE*.

Hacer una determinación por análisis de secuencia genómica de *B. subtilis* y de otros *Bacillus* (*i.e.* *B. halodurans*) secuenciados para identificar si otros genes son potencialmente regulados por Hpr e inferir si la regulación es mediada por una horquilla reguladora de tipo proteína-proteína.

9. APENDICE

9.1 Técnicas generales de Biología Molecular

9.1.1 Medios de cultivo

Luria Bertani (LB)

Bactotripton	10 g
NaCl	5 g
Extracto de levadura	5 g

pH 7.2

(Sambrook *et al.*, 1989).

Luria Bertani (LB) sólido 1L.

Bactotripton	10 g
NaCl	5 g
Extracto de levadura	5 g
Bacto-agar	1.5 g

(Sambrook *et al.*, 1989).

Shaeffer 1L.

Extracto de carne	3 g
Bactopeptona	5 g
KCl	1 g
MgSO ₄	0.13 g

Ajustar el pH a 7 con NaOH y esterilizar.

Por separado agregar sales para un litro de medio Shaeffer.

Sales para Shaeffer 1L.

1 mM FeSO ₄	1 ml
------------------------	------

1 M Na ₂ SO ₄	1 ml
1 mM MnCl ₂	1 ml

(Shaeffer *et al.*, 1965)

9.1.2 Soluciones y Buffers (Sambrook *et al.*, 1989).

Buffer SET	Sacarosa	20%
	EDTA	50 mM
	Tris-HCl pH 7.6	50 mM

RNAasa:	Ribonucleasa Pancreática A	10 mg/ml
	Acetato de sodio	100 mM
	EGTA	0.3 mM
	pH 4.8	

Activarla calentando a 80°C durante 10 min.

Solución lítica:	SDS	1.0 %
	NaOH	0.2 N
Acetato de sodio:	Acetato de sodio	40.83 gr
	Ac. acético cbp pH 4.8	30 ml
..	H ₂ O cbp	100 ml

9.1.3 Mini Screening de Plásmidos por lisis alcalina.

1. Inocular 3 ml de medio Luria con una sola colonia bacteriana. Agregar el antibiótico requerido e incubar toda la noche a 37°C, con agitación vigorosa (300 r.p.m.). El cultivo debe llegar a la fase estacionaria.
2. Centrifugar el cultivo de la noche anterior en un tubo Eppendorf de 1.5 µl, durante 5 min.
3. Lavar la pastilla con 1 ml de Buffer SET y resuspender con vortex.

4. Centrifugar en la microfuga durante 1 min. A 12000 r.p.m.
5. Remover el medio por aspiración para dejar la pastilla de células lo más seca posible y resuspender 150 μ l de Buffer SET helado.
6. Adicionar 5 μ l de RNAsa y mezclar con vortex.
7. Agregar 350 μ l de solución de lisis recién preparada. Mezclar por inversión repetida.
8. Incubar 10 min. en hielo.
9. Agregar 250 μ l de solución de acetato de sodio 3 M pH 4.8. Cerrar el tubo y mezclar perfectamente el tubo por inversión repetida hasta que desaparezca la viscosidad.
10. Incubar 30 min. en hielo.
11. Centrifugar durante 5 min. a 4°C y el sobrenadante, aproximadamente 700 μ l pasarlo a un tubo Eppendorf limpio.
12. Adicionar un volumen de isopropanol y mezclar invirtiendo el tubo varias veces
Nota: Opcionalmente se puede hacer una extracción con cloroformo al DNA antes de precipitarlo. Esto elimina exopolisacáridos mejorando la calidad del DNA.
13. Centrifugar 15 min a tem. amb., remover el sobrenadante e invertir el tubo abierto sobre una toalla de papel para secarlo lo más posible.
14. Lavar con un volumen de etanol al 70 %, centrifugar a 12000 r.p.m. por 10 min.
15. Remover el sobrenadante y secar la pastilla
16. Resuspender en 50 μ l de TE 10 mM. Usar 5 μ l para cada reacción de restricción.

(Sambrook *et al.*, 1989).

9.1.4 Macro Screening de Plásmidos por lisis alcalina

1. Inocular 90-100 ml de medio Luria con una sola colonia bacteriana. Agregar el antibiótico adecuado e incubar toda la noche a 37°C y con agitación vigorosa (300 r.p.m.). El cultivo debe llegar a la fase estacionaria.
2. Centrifugar el cultivo de toda la noche en tubos estériles de 30 ml, durante 5 min a 10000 r.p.m. a 10°C. Desechar el sobrenadante.
3. Lavar las pastillas resuspendiéndolas en 10 ml de Buffer SET₂ utilizando vortex.
4. Centrifugar durante 5 min. A 12000 r.p.m.
5. Remover el medio por aspiración para dejar la pastilla de células lo más seca posible y resuspender en 4.5 ml de SET frío.
6. Adicionar 100 µl de RNAsa y volver a mezclar con vortex.
17. Agregar 10.5 ml de solución de lisis recién preparada y a temperatura ambiente. Cerrar el tubo y mezclar por inversión repetida.
8. Incubar 10 min. en hielo.
9. Agregar 7.5 ml de solución de acetato de sodio 3 M pH 4.8. Cerrar el tubo y mezclar perfectamente el tubo por inversión repetida hasta que desaparezca la viscosidad.
10. Incubar 30 min. en hielo.
11. Centrifugar durante 15 min. a 4°C y el sobrenadante filtrarlo al vacío y pasarlo a otro tubo limpio de 30 ml.

12. Adicionar un volumen de isopropanol y mezclar invirtiendo el tubo varias veces.
13. Centrifugar 15 min. a tem. amb., remover el sobrenadante e invertir el tubo abierto sobre una toalla de papel para secarlo lo más posible.
14. Lavar con un volumen de etanol al 70 %, centrifugar a 12000 r.p.m. por 10 min. y resuspender en 500 µl de TE.
15. Agregar 500 µl de fenol. Dar vortex y centrifugar por 5 min.
16. Extraer la fase acuosa y colocarla en un tubo Eppendorf.
17. Agregar un volumen de cloroformo al DNA antes de presipitarlo. Esto elimina exopolisacáridos mejorando la calidad del DNA.
18. Centrifugar 1 min y extraer la fase acuosa.
19. Agregar NaCl 5 M en proporción de 8 µl por cada 100 µl de fase acuosa y un volumen de isopropanol. Centrifugar 15 min.
20. Tirar sobrenadante y lavar con Et-OH al 70 %.
21. Secar y resuspender en 500 µl de TE.

(Sambrook *et al.*, 1989).

9.1. 5 AMPLIFICACION DE DNA CON DNApoli ELONGASA

Elongasa es una mezcla de *taq* y DNA polimerasa de *Pyrococcus sp.* La enzima mayoritaria en la mezcla es la *taq* polimerasa que se encarga de la polimerización y la minoritaria es la polimerasa de *Pyrococcus* que se encarga de corregir las incorporaciones equivocadas, debido a su actividad de exonucleasa 3'→5'. Este

9.1.6 Extracción de bandas de DNA en gel preparativo.

1. Cortar la banda del gel y colocarla en un tubo Eppendorf.
2. Congelar la agarosa con la banda de en hielo seco por 5 min.
3. Machacar la agarosa en frío.
4. Agregar 1 vol. igual de fenol. Agitar en vortex .
5. Congelar en hielo seco por 5 min.
6. Centrifugar 15 min.
7. Pasar la fase orgánica superior a un tubo Eppendorf.
8. Agregar un vol. igual de cloroformo, agitar en vortex.
9. Centrifugar 2 min.
10. Pasar la fase orgánica superior a un tubo Eppendorf.
11. Agregar 8 μ l de NaCl 5 M por cada 100 μ l de líquido.
12. Agregar 5 μ l de glicógeno por tubo y resuspender.
13. Agregar un vol. igual de isopropanol y resuspender.
14. Centrifugar 15 min.
15. Decantar el sobrenadante y lavar con etanol al 70%.
16. Centrifugar por 10 min
17. Secar la pastilla de DNA.

(Sambrook *et al.*, 1989).

9.1.7 PREPARACION DE CELULAS ELECTROCOMPETENTES DE *E. coli*

1. Se coloca un cultivo durante toda la noche en un medio líquido YENB (Bacto yeast extract. 0.75%), Bacto Nutrient Broth (0.8%); Difco Laboratories). Esto es importante para eliminar en todos los pasos necesarios para remover las sales. Se conoce que las sales reducen la eficiencia de electrotransformación y originan arqueos en la cubeta de electroporación.
2. Inocular 1 L del medio fresco YENB con 5 a 10 ml. del cultivo toda la noche a 37°C a 300 r.p.m., se cosechan las células a una DO de 600 nm.

3. Centrifugar a 10000 r.p.m. por 5 min. a 4°C.
4. Retirar el sobrenadante y lavar el pellet 2 veces en 100 ml. de agua fría y centrifugar como en el paso 3; remover y descartar el sobrenadante.
5. Resuspender en 20 ml. de glicerol al 10% frío. Centrifugar como en el paso 3; remover y descartar el sobrenadante.
6. Resuspender las células en un volumen final de 2 a 3 ml. de glicerol al 10% frío.
7. Alícuotar en tubos Eppendorf con 50 µl totales.
8. Almacenar a -70°C en antes de su uso. Estas células competentes serán viables por 1 a 2 años.

(Sambrook *et al.*, 1989).

9.1.8 Electroporación.

1. Una alícuota de 50 µl de células competentes, adicionar de 1 a 2 µl de ADN (2ng/µl). Manejar en hielo.
2. Transferir la mezcla de las células y el ADN a una cubeta fría para electroporación de 0.2 cm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) y electroforar dando un pulso de 2500 Volts.
3. Remover la cubeta de la cámara e inmediatamente adicionar 1 ml del medio YENB a la cubeta (El medio SOC puede también ser utilizado). El medio SOC contiene Bacto triptona al 2%, extracto de bacto levadura al 0.5 %, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl₂ 10 mM MgSO₄ y glucosa 20 mM.. Resuspender las células. Transferir la suspensión celular a un tubo de vidrio estéril e incubar con agitación a 37°C por 1hr.
4. Platear el cultivo en cajas de Petri con medio de selección, incubar durante la noche a 37°C.

9.1.9 Determinación de proteína por el método de Lowry

Este método está basado en la formación de un compuesto colorido a partir de residuos de aminoácidos aromáticos proveniente de la hidrólisis alcalina de proteína celular.

Preparar las siguientes soluciones

Reactivo A: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% y Tartrato de Na-K al 1%. Antes de realizar las determinaciones, mezclar (en la cantidad necesaria) 1:1 las dos soluciones anteriores.

Reactivo B: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N. Disolver 20 g de Carbonato de sodio y 4 g de Hidróxido de sodio en 1L de agua.

Reactivo C: a 49 ml de reactivo B agregar 1ml de Reactivo A.

Reactivo D: Solución 1:1 de reactivo de folin y agua.

Procedimiento

1.- Tomar una muestra de 1 ml del caldo de fermentación en un tubo Eppendorf de 1.5 ml. Centrifugar por 3 min. a 12 000 r.p.m. Separar el sobrenadante del paquete celular. Congelar las muestras en hielo seco. Si las muestras no son analizadas inmediatamente almacenarlas en congelador.

2.- Resuspender las muestras en 1 ml buffer Z.

3.- En un tubo colocar 1ml de Reactivo C y agregar 200 ml de muestra. Mezclar y dejar reposar por 10 min. Agregar 100 ml de reactivo D. Mezclar y dejar reposar por 30 min. Leer el color producido en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm. Leer contra blanco de reactivos. Para esto utilizar 200 ml de agua destilada procesada de igual manera que la muestra. Realizar cada determinación por duplicado.

Elaboración de curva patrón.

A partir de una solución patrón de albúmina de 1 mg/ml [(de una solución patrón de Sigma de 10 g/dl), hacer dos diluciones 1:10]. Variar la concentración de albúmina de 0 a 0.4 mg/ml de acuerdo a la siguiente tabla:

ml de solución patrón	ml de agua destilada	Albúmina C. final [mg/ml]
0	1000	0
25	975	0.025
50	950	0.050
100	900	0.100

10. BIBLIOGRAFIA

Anagnostopoulos C., Spizizen J (1961). Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 81:741-746

Bai U, Mandic-Mulec I, Smith I (1992) SinI modulates the activity of SinR, a developmental switch protein of *Bacillus subtilis*, by protein-protein interaction. Gen and Develop. 7:139-148

Boer, S.A. and Diderichsen, B. (1991). On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36:1-4

Bookstein C, Edwards C, Kapp N, Hulett M (1990) The *Bacillus subtilis* 168 alkaline phosphatase III gene: Impac of a phoAIII mutation on total alkaline phosphatase synthesis. J. Bacteriol. 172:3730-3737

Burbulys, D., Trach, K.A., Hoch, J.A. (1991). Initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* is controled by a multicomponent phosphorelay. Cell. 64: 545-552

Chung JD, Stephanopoulos G, Ireton K, Grossman AD (1994) Gene expression in single cells of *Bacillus subtilis*: evidence that a threshold mechanism controls the initiation of sporulation. J. Bacteriol. 176:1877-1984

Chibazakura, T., Kawamura, F., Takahashi, H.(1991). Diferential regulation of *spo0A* transcription in *Bacillus subtilis*: Glucose represses promoter swtching at the initiation of sporulation. J. Bacteriol. 173: 2625-2632.

Clarke, S., Mandelstam, J. (1980). Dissociation of an early event in sporulation from chromosome replication in *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol. 121: 487-490

Dababov, V.G. (1992). The industrial use of *Bacillus* of Bacilli. In: Dubnau D.A. (ed). The molecular biology of the bacilli, vol. 1. Academic Press, New York. pp 331-370

Dahl, M.K., Msdek, T., Kunst, F., Rapoport, G. (1991). Mutational analysis of the

Bacillus subtilis DegU regulator and its phosphorylation by the DegS protein kinase. J. Bacteriol. 173: 2539-2547

Dunn, G., jeffs, P., Mann, H., torgersen, D.M., Young, M. (1978). The relationship between DNA replication and the induction of sporulation in *Bacillus subtilis*. J. Gen. Microbiol. 108: 189-196

Dunn, T. M., Hahn, S., Ogden, S. Schleif, R. F. (1984). An operator at -280 base pairs that is required for repression of araBAD operon promoter: Addition of DNA helical turns between the operator and promoter cyclically hinders repression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 81:5017-5020.

Eismann, E. R. and Müller-Hill, B. (1990). *lac* repressor forms stable loops in vitro supercoiled wild-type *lac* DNA contains all three natural *lac* operators. J. Mol. Biol. 213:763-775.

Englesberg, E. and Wilcox, G. (1974). Regulation: positive control. Annu. Rev. Genet. 8:219-142.

Estell, D.A., Graycar, T.P., Wells, J.A (1985) Engineering on enzyme by site-directed mutagenesis to be resistant to chemical oxidation. J. Biol. Chem. 260:6518-6521

Ferrari E, Howard SA, Hoch JA (1985) Effect of sporulation mutations on subtilisin- β -Galactosidase gene fusion. In : Hoch JA, Setlow p (sds) Molecular biology of microbial differentiation. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp 180-184

Ferrari E, Henner DJ, Perego M, Hoch JA (1988) Transcription of *Bacillus subtilis* subtilisin and expression of subtilisin in sporulation mutants. J. Bacteriol. 170:289-295

Ferrari E, Jamagin AS, Schmidt BF (1993) Commercial production of extracellular enzymes. In : Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R (eds) *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria : Biochemistry, Physiology and molecular Genetics. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp 917-937

Freese, E. (1981). Initiation of bacterial sporulation. In: Levinson H.S., Sonenshein A.L., Trpper D.J. (eds) In sporulation and germination. American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp 1-12

Gaur, N. K., Cabane, K., Smith, I. (1988). Structure and expression of the *Bacillus subtilis* *sin* operon. J. Bacteriol. 170:1046-1053

Gaur NK, Dubnau E, Smith I (1986) Characterization of cloned *Bacillus subtilis* gene that inhibits sporulation in multiples copies. J. Bacteriol. 168:860-869

Gaur NK, Oppenheim J, Smith I (1991) The *Bacillus subtilis* *sin* gene, a regulator of alternate developmental processes, codes for a DNA-binding protein. J. Bacteriol. 173:678-686

Grosman, A. D. (1991). Integration developmental signal and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. Cell. 65: 5-8

Grosman, A. D., Losick, R. (1988). Extracellular control of spore formation in *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 4369-4373

Haword, C.R. (1992). *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. TIBTECH 10:247-156

Hichins, A.D., Slepecky, R.A. (1969). Bacterial spore formation as a modified prokaryotic cell division. Nature. 223: 804-807

Henner DJ, Ferrari E, Perego M, Hoch JA (1988a) Location of the targets of the *hpr-97*, *sacU32(Hy)*, and *sacQ36(Hy)* mutations in upstream regions of the subtilisin promoter. J. Bacteriol. 170:296-300

Henner DJ, Yang M, Ferrari E (1988b) Localization of *Bacillus subtilis* *sacU (Hy)* mutations to two linked genes with similarities to the conserved prokaryotic family of two component signalling systems. J. Bacteriol. 170:5102-5109

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Hochschild, A. and Ptasshne, M. (1986). Cooperative binding of λ repressors to sites separated by integral turns of the DNA helix. *Cell*. 44:681-687.

Ireton, K., Grossman, A.D. (1994). A developmental Checkpoint couples the initiation of sporulation to DNA replication in *Bacillus subtilis*. *EMBO J.* 13: 1566-1573

Jan, J., Valle, F., Bolivar, F. Merino, E.(2000). Characterization of 5' subtilisin (*aprE*) regulatory region from *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1833:9-14.

Kallio PT, Fagelson JE, Hoch Ja, Strauch M (1991) The transition state regulator Hpr of *Bacillus subtilis* is a DNA- binding protein. *J. Biol. Chem.* 266:13411-13417

Krämer, H. M., Amouyal, M., Nordheim, N. Müller-Hill, B. (1988). DNA supercoiling changes the spacing requirement of two *lac* operators for DNA loop formation with *lac* repressor. *EMBO J.* 7:547-556.

Kunkel, B. (1991). Compartmentalized gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Trends in Genetic* 7: 167-172

Kunst, F, Msadek, T., Rapoport, G. (1994). Signal transduction network controlling degradative enzyme synthesis and competence in *Bacillus subtilis*. In: Piggot P.J., Moran C.P., Youngman P. (eds) Regulation of bacterial differentiation. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp 1-20

Kunst F, Pascal M, Lepesant-Kejzlarova J, Lepesant J, Billault A, Dedonder R (1974) Pleiotropic mutations affecting sporulation conditions and the synthesis of extracellular enzymes in *Bacillus subtilis* 168. *Biochimie* 56:1481-1498

Kunst F, Debarbouille M, Msadek T, Young M, Mauel C, Karamata D, Klier A, Rapoport G, Dedonder R (1988) Deduced polypeptides encoded by the *Bacillus subtilis* *sacU* locus share homology with two-component sensor-regulator systems. *J. bacteriol.* 170:5093-5101

Lee, K., Holland-Staley, C. A., Cunningham, P. R. (1996). Genetic analysis of the

Shine-Dalgarno interaction: Selection of alternative functional mRNA-rRNA combinations. RNA Cambridge University Press 2:1270-1285

Li, H., Katherine, J., Martin and Robert Schleif (1988). Alternative DNA loops regulate the arabinosa operon in *E. coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85:5444-5448

López, J.M., Dromeric, A., Freese, G. (1981). Response of guanoside 5-triphosphate concentration to nutritional changes and its significance for *Bacillus subtilis* sporulation. J. Bacteriol. 146: 605-613

López, J.M., Marks, L.L., Freese, G. (1979). The decrease of guanine nucleotides initiates sporulation of *Bacillus subtilis*. Biochem Biophys Acta 587:238-252

López, J.M., Uratani-Wong, B., Freese, G. (1980). Catabolite repression of enzyme synthesis does not prevent sporulation. J. Bacteriol. 141:1447-1449

Louie P, Lee A. Stansmore K, Grant R, Ginther C, Leighton T (1992) Roles of *spoD*, *spollF*, *spollJ*, *spollN*, and *sin* in regulation of *Bacillus subtilis* stage II sporulation-specific transcription. J. Bacteriol. 174:3570-3576

Jacobs, M.F. (1995). Expression of the subtilisin Carsberg-encoding gene in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. Gene 152:69-74

Mandic-Mulec I, Gaur N, Bai U, Smith I (1992) Sin, a stage-specific repressor of cellular differentiation. J. Bacteriol. 174:3561-3569

Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). "Molecular Cloning: A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.

Matthews, K. S. (1992). DNA lopping. Microbiol. Rev. 56:123-136.

Messing, J. (1979). A multipurpose cloning system based on single-stranded DNA sequencing. Nucleic Acids res. 9:309

Msadek T, Kunst F, Henner D, Klier A, Rapoport G, Dendoder R (1990) Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *Bacillus subtilis*: Expression of the regulatory genes and analysis of mutations in *gegS* and *degU*. J. Bacteriol. 172:824-834

Msadek T, Kunst F, Klier A, Rapoport G, (1991). DegS-DegU and ComP- ComA modulator-effector pairs control expression of the *Bacillus subtilis* pleiotropic regulatory gene *degQ*. J. Bacteriol. 173:824-834

Nagarajan, V., Albertson, H., Chen, M., Ribbe, J. (1992). Modular expression and secretion vectors for *Bacillus subtilis*. Gene 114:121-126

Nagarajan, V., Ramaley, R., Albertson, H., Chen, M., Che, M. (1993). Secretion of streptavidin from *Bacillus subtilis*. Applied. Environmental Microbiol. 59:3894-3898

NicholsonWL, Setlow P (1990) Sporulation, germination and outgrowth. In : Harwood CR, Cutting SM (eds) Molecular Biological Methods for *Bacillus*, John Wiley and Sons, USA., pp 435-439

Perego, M., Spiegelman, G.B., Hoch, J.A. (1988). Structure of the gene for the transition state regulator, *abrB*: regulator synthesis is controlled by the *spo0A* sporulation gene in *Bacillus subtilis*. Molec. Microbiol. 2:689-699

Perego, M., Spiegelman, G.B., Hoch, J.A. (1991). Mutational dissociation of the positive and negative regulatory properties of the Spo0A sporulation transcription factor of *Bacillus subtilis*. Gene. 100:207-212

Perez-Martin, J. And Espinoza, M. (1994) J. Mol: biol.241:7-17.

Pierse, A.J. (1992). Engineered *Bacillus subtilis* – based subtilisin production systems: Physiological, genetical and morphological consideration. Ph. D. Thesis, pp 10-11

Priest, G.F. (1989). Products and applications. In: Harwood, C.R.(ed) *Bacillus*, biotechnology handbooks, vol. 2. Plenum Press; New York. Pp 293-322

Priest, G.F. (1993). Systematics and ecology of *Bacillus*. In: Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., Losick, R. (eds) *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp 3-16

Rocha, E. P., Danchin, A., Viari A. (1999). Translation in *Bacillus subtilis*: roles and trends of initiation and termination, insights from a genome analysis. *Nucleic Acids Res.* 27:3567-3576

Robertson, J.B., Gocht, M., Marahiel, M.A. and Zuber, P. (1989). AbrB, a regulator of gene expression in *Bacillus*, interacts with the transcription initiation regions of a sporulation gene and an antibiotic biosynthesis gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:8457-61.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual* (2nd edn) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Satola, S.W., Kirchman, P.A., Moram, C.P. (1991). Spo0A binds to a promoter used by sigma A RNA polymerase during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:4533-4537.

Schleif, R. (1992). DNA looping. *Annu. Rev. Biochem.* 61:199-223.

Setlow, P. (1993). Spore structural proteins. In: Sonenshein, A.L., Hoch, J.A., Losick, R. (eds) *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp 801-809

Setlow, P. (1994). DNA structure, spore formation, and spore properties. In: Piggot, J.P. Moran, P.C., Youngman, P. (eds) *Regulation of bacterial differentiation*. American Society for Microbiology, Washington, D. C., pp 181-194

Shaeffer, P., Millet, J and Aubert, J. (1965) Catabolic repression of bacterial sporulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 54, 704-711.

Shore, D., Langowski, J. Baldwin, R. L. (1981). DNA flexibility studied by covalent closure of short fragments into circles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78:4833-4837.

Sonenshein, A.L. (1989). Metabolic regulation of sporulation and other stationary-phase phenomena. In: Smith I, Slepecky R. A., Setlow P. (eds) Regulation of procaryotic development: Structural and functional analysis of sporulation and germination. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp 109-130

Stock, J.B., Ninfa, A.J., Stok, A.M. (1989). Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. Microbiol. Rev. 53:450-490

Strauch, M.A. and Ayazifar, M. (1995). Bent DNA is found in some but not all, regions recognized by the *Bacillus subtilis* AbrE protein. Mol Gen. Genet. 246:756-760.

Strauch, M.A. and Hoch, J.A. (1992a). Control of postexponential gene expression by transition state regulators. In: Doi, H.R., McGloughlin, M. (eds) Biology of Bacilli: Applications to industry. Butterworth-Heinemann, Boston., pp 105-121

Strauch, M.A. and Hoch, J.A. (1992b). Sporulation in prokaryotes and lower eukaryotes. Current Opinion in Genetics and Development 2:799-804

Strauch, M.A. and Hoch, J.A. (1993). Signal transduction in *Bacillus subtilis* sporulation. Current Opinion in Genetics and Development 3:203-212

Strauch MA, Splegeiman G, Peregó M, Johnson W, Burbuys D, Hoch JA (1989) The transition state transcription regulator AbrB of *Bacillus subtilis* is a DNA binding protein. EMBO J. 8:1615-1621

Strauch M.A., Webb, V., Splegeiman, G., Hoch, J.A. (1990). The Spo0A protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of *abrB* gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1801-1805

Slepecky, A.R. (1992) What is a *Bacillus*. In: Doi, H.R., McGloughlin, M. (eds) *Biology of Bacilli: Applications to industry*. Butterworth-Heinemann, Boston., pp 1-21

Valle, F., Ferrari, E. (1989). Subtilisin: a redundantly temporally regulated gene. In: Smith I, Slepecky A.R., Setlow P. (eds). *Regulation of prokaryotic development*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp 131-146

Waldburger, L., González, D., Chambliss, G.H. (1993). Characterization of a new sporulation factor in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 175:6321-6327

Wang, L.F., Wong, S.L., Lee, S.G., Kalyan, N., Hung, P.P., Hilliker, S., Doi, R.H. (1988). Expression and secretion of human atrial natriuretic a-factor in *Bacillus subtilis* using the subtilisin signal peptide. *Gene.* 69:39-47

Wong, S.L. (1995). Advances in the use of *Bacillus subtilis* for the expression and secretion of heterologous proteins. *Current Opinion in Biotechnol.* 6:517-522

Yamashita, S., Kamwamura, F., Yoshikawa, H. (1989). Dissection of the expression signals of the *spo0A* gene of *Bacillus subtilis*: glucose sporulation- specific expression. *J. Gen. Microbiol.* 135:1335-1345

York, K., Kenney, T.J., Satola, S. (1992). *Spo0A* controls the sigA-dependent activation of *Bacillus subtilis* sporulation-specific transcription unit *spoIIIE*. *J. Bacteriol.* 172:2648-2658

Zukowski, M.M. (1992). Production of commercially valuable products. In: Doi, H.R., McGloughlin, M. (eds) *Biology of Bacilli: Applications to industry*. Butterworth-Heinemann, Boston., pp 311-337