



03088

UNIVERSIDAD NACIONAL 3
AUTONOMA DE MEXICO 29

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
UACPyP/CCH

Estudios sobre la regulación del gene
aprE que codifica para la subtilisina
en *Bacillus subtilis*.

TESIS

Que para obtener el grado de
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA

Presenta:

M.C. Jorge Olmos Soto

Cuernavaca, Morelos 1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM

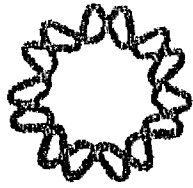


UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.



Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

RESUMEN

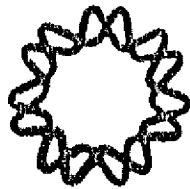
El gene *apre* de *B. subtilis* codifica para la proteasa alcalina también conocida como subtilisina. Su expresión está regulada por una compleja red de activadores y represores transcripcionales entre los que se encuentran las proteínas Hpr, DegU, SinR y SpoOA. Para entender el efecto que ocasionan algunas de estas proteínas reguladoras sobre la expresión de *apre*, se construyeron cepas de *Bacillus subtilis* en las cuales se combinaron las siguientes mutaciones; *degU32(Hy)*, *hpr2*, *sinR* y *spoOA9V*. Como resultado, se obtuvo que en todos los fondos genéticos analizados, las mutaciones *sinR* y *spoOA9V* disminuyeron la expresión del gene *apre* contrario a lo reportado por otros grupos. La producción de fosfatasa alcalina y la generación de esporas resistentes a calor, son consideradas marcadores celulares del proceso de esporulación. El análisis de estos parametros en las mutantes *sinR*, sugiere que el proceso de esporulación está siendo afectado y que esto, en parte, es responsable de la disminución de la expresión de *apre*.

Por otra parte, una delección del sitio de unión de la proteína SinR en la región de regulación de *apre*, mostró que el efecto causado por la mutación *spoOA9V* en la cepa silvestre, *hpr2* y *degU32(Hy)* se debe a la regulación ineficiente que ejerce la proteína SpoOA9V sobre el operón *sinRI*, lo que al parecer ocasiona un aumento en la concentración de SinR.

ASESOR DE LA TESIS

Dr. Francisco Bolivar Zapata





Instituto de Biotecnología

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Abstract

The *aprE* gene of *Bacillus subtilis* codes for the serine alkaline protease also known as subtilisin. Its expression is regulated by a complex network of activators and repressors which includes the products of *hpr*, *degU*, *sinR* and *spoOA*. To understand the effect of these gene products on subtilisin expression, strains carrying combinations of the mutations *degU32(Hy)*, *hpr2*, *sinR* and *spo0A9V* were constructed. We have found that in all the genetic backgrounds tested, the *sinR* and *spo0A9V* mutations decreased *aprE* expression. Also, by measuring alkaline phosphatase synthesis and heat resistant spores formation, as indicators of sporulation, we have found that some of the mutant strains showed alterations in the sporulation process. The results suggest that these alterations are partially responsible for the observed changes in *aprE* expression.

On the other hand, a deletion of the SinR binding site in the *aprE* regulatory region, showed that the effect produced by the *spo0A9V* mutation on the wild type, *hpr2* and *degU32(Hy)* strains, was induced by the inefficient regulation of the Spo0A9V protein over the *sinRI* operon.

ASESOR DE LA TESIS

Dr. Francisco Boliyar Zapata



Esta tesis se realizó en el Instituto de Biotecnología/UNAM, en el Departamento de Microbiología Molecular, bajo la dirección de los Dres. Francisco Bolivar Zapata y Fernando Valle Baheza.

"Si nuestras condiciones de vida nos permiten elegir cualquier profesión, vamos a elegir la que nos proporcione mayor dignidad... que brinde las mayores posibilidades de actuar en aras de la humanidad. La dignidad es lo que más eleva al hombre, lo que infunde nobleza suprema a su actividad y a todos sus anhelos, lo que le permite destacar...

"Pero la dignidad puede proporcionarla únicamente una profesión en la que no seamos instrumentos serviles, sino creadores independientes en su medio; una profesión que no requiera actos vituperables y que incluso el mejor pueda abrazar con orgullo...

"Si el hombre trabaja solo para sí, puede quizá ser un científico famoso, un gran sabio, un excelente poeta, pero jamás podrá ser un hombre perfecto y verdaderamente grande. La historia considera grandes a los hombres que, *trabajando para el bien común*, se ennoblecen a sí mismos; la experiencia destaca como más feliz al hombre que ha proporcionado la felicidad al mayor número de personas...

Marx.....

Agradecimientos

A mi madre por ser un ejemplo de lucha constante.

Al Dr. Francisco Bolivar Zapata por su confianza y apoyo

Al Dr. Fernando Valle Baheza por ser un ejemplo y un pilar fundamental durante mi formación académica.

Al Dr. Félix Recillas Targa por su apoyo incondicional

A Pedro Saucedo por la elaboración de las figuras.

A mis muy buenos amigos Ramón DeAnda, Norberto Cruz, Alfredo Martínez, Roberto Siguenza y Guillermo Gosset.

A mis compañeros

A Lidia

INDICE

Resumen..... 1

CAPITULO 1 INTRODUCCION

Antecedentes y Justificación..... 3

Objetivos..... 8

Generalidades..... 9

CAPITULO 2 MANUSCRITOS

Efecto de las mutaciones *sinR* y *degU32* (Hy) en la regulación del gene *apRE* de *B. subtilis*..... 17

Una proteína SpoOA totalmente funcional es requerida para la máxima expresión del gene *apRE* en *B. subtilis*..... 40

CAPITULO 3 DISCUSIÓN GENERAL

Discusión..... 44

Conclusiones..... 51

Perpectivas..... 52

REFERENCIAS..... 53

RESUMEN

El gene *aprE* de *B. subtilis* codifica para la proteasa alcalina también conocida como subtilisina. Su expresión está regulada por una compleja red de activadores y represores transcripcionales entre los que se encuentran las proteínas Hpr, DegU, SinR y SpoOA. Para entender el efecto que ocasionan algunas de estas proteínas reguladoras sobre la expresión de *aprE*, se construyeron cepas de *Bacillus subtilis* en las cuales se combinaron las siguientes mutaciones; *degU32(Hy)*, *hpr2*, *sinR* y *spOOA9V*. Como resultado, se obtuvo que en todos los fondos genéticos analizados, las mutaciones *sinR* y *spOOA9V* disminuyeron la expresión del gene *aprE* contrario a lo reportado por otros grupos. La producción de fosfatasa alcalina y la generación de esporas resistentes a calor, son consideradas marcadores celulares del proceso de esporulación. El análisis de estos parametros en las mutantes *sinR*, sugiere que el proceso de esporulación está siendo afectado y que ésto, en parte, es responsable de la disminución de la expresión de *aprE*.

Por otra parte, una deleción del sitio de unión de la proteína SinR en la región de regulación de *aprE*, mostró que el efecto causado por la mutación *spOOA9V* en la cepa silvestre, *hpr2* y *degU32(Hy)* se debe a la regulación ineficiente que ejerce la proteína SpoOA9V sobre el operón *sinRI*, lo que al parecer ocasiona un aumento en la concentración de SinR.

CAPITULO 1

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

OBJETIVOS

GENERALIDADES

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACION

El género *Bacillus* está constituido por uno de los grupos mas diversos de bacterias Gram-positivas, entre los cuales se encuentran microorganismos aerobios, aerobios facultativos y anaerobios. Tienen una morfología tipo barra 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 en el entendimiento de la expresión génica, particularmente en *B. subtilis*, han abierto nuevos campos para la utilización de *B. subtilis* y otros *Bacillus* en muchas áreas de investigación básica y aplicada (Harwood 1992; Slepecky 1992; Wong 1995).

B. subtilis es una bacteria generalmente reconocida como segura (GRCS), por la Food and Drug Administration (FDA) de los E.U.A (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; Pierce 1992). En estudios previos, muchos investigadores utilizaron a *B. subtilis* como la contraparte Gram-positiva de la bacteria Gram-negativa mejor conocida (*E. coli*) y, como un modelo para entender los mecanismos de diferenciación, estudiando el proceso de esporulación (Anagnostopoulos y Spizizen, 1961; 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 mas importantes. Algunos de estos sistemas utilizan la región de regulación del gene *aprE* (fig.1), el cual codifica para la enzima subtilisina, la proteasa más importante que produce *B. subtilis* (Jacobs 1995; Nagarajan et al. 1992; Nagarajan et al. 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; Pierce 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 area de gran interés para estudios básicos y aplicados.

Estudios sobre la regulación transcripcional del gene *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; SpoOA, SpoOH, AbrB, Hpr, DegU/DegS y SinR, entre otras (fig.2). 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.3). Por tal motivo, el estudio del gene *apRE* ha tenido un gran impacto en la industria biotecnológica en el área de producción, y en investigación básica, 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.

```

          -100          SpcOA
GGCGGCCGCA TCTGATGTCT TTGCT TGGCG AA TG TTCATC TTATTTCTTC CTCCTCTCA

          HPR (1)          -300
ATAATTTTTT CATTCTATCC CTTTTCTGTA A AGTTTATT TTCAGAATAC TTTTATCATC

          HPR (2)          SIN
ATG CTTTGAA AAAATATCAC GATAATATC AT TGTTCCTCA CGGAAGCACA CGCAGGTCAT

          SpOoA          -200
TTGAACGAAT TTT TTCGACA GGAATTTGCC GGGACTCAGG AGCATTAAAC CTAAAAAAGC

          DEGU
ATGACATTTT AGC ATAATGA ACATTTACTC ATGTCTATTT TCG TTCTTTT CTGTATGAAA

          -100          HPR (3)
ATAGTTATTT CGAGTCTCTA CGGAAATAGC GAGAGA TGAT ATACCTAAAT AGAGATA AAA

          -35          HPR (4)          -10          +1
TCATCTCAAA AAAATGGGTC TACTAAAATA TTATTCATC TA TACAATA AATTCACAGA
.....
          ABRB

ATAGTCTTTT AAGTAAGTCT ACTCTGAATT TTTTAAAAG GAGAGGGTAA AGAGTGAGAA
.....
          M R

```

Fig.1.- Sitios de unión de las proteínas reguladoras AbrB, Hpr, SinR y DegU, en la región de regulación del gene *apre*. Los rectángulos indican la secuencia de DNA con la cual interaccionan las proteínas Hpr, SinR y DegU. La línea punteada señala la región de DNA con la que interacciona la proteína AbrB. Según lo reportado para este gene, las proteínas AbrB, Hpr y SinR son represores y DegU y SpOoA son activadores. Estos sitios fueron determinados por medio de experimentos de "footprinting" *in vitro* para el caso de las proteínas Hpr, SinR y AbrB, por experimentos de delección para la proteína DegU y por análisis de secuencia para SpOoA (Gaur et al. 1991; Henner et al. 1988a; Kallio et al. 1991; Strauch y Ayazifar, 1995).

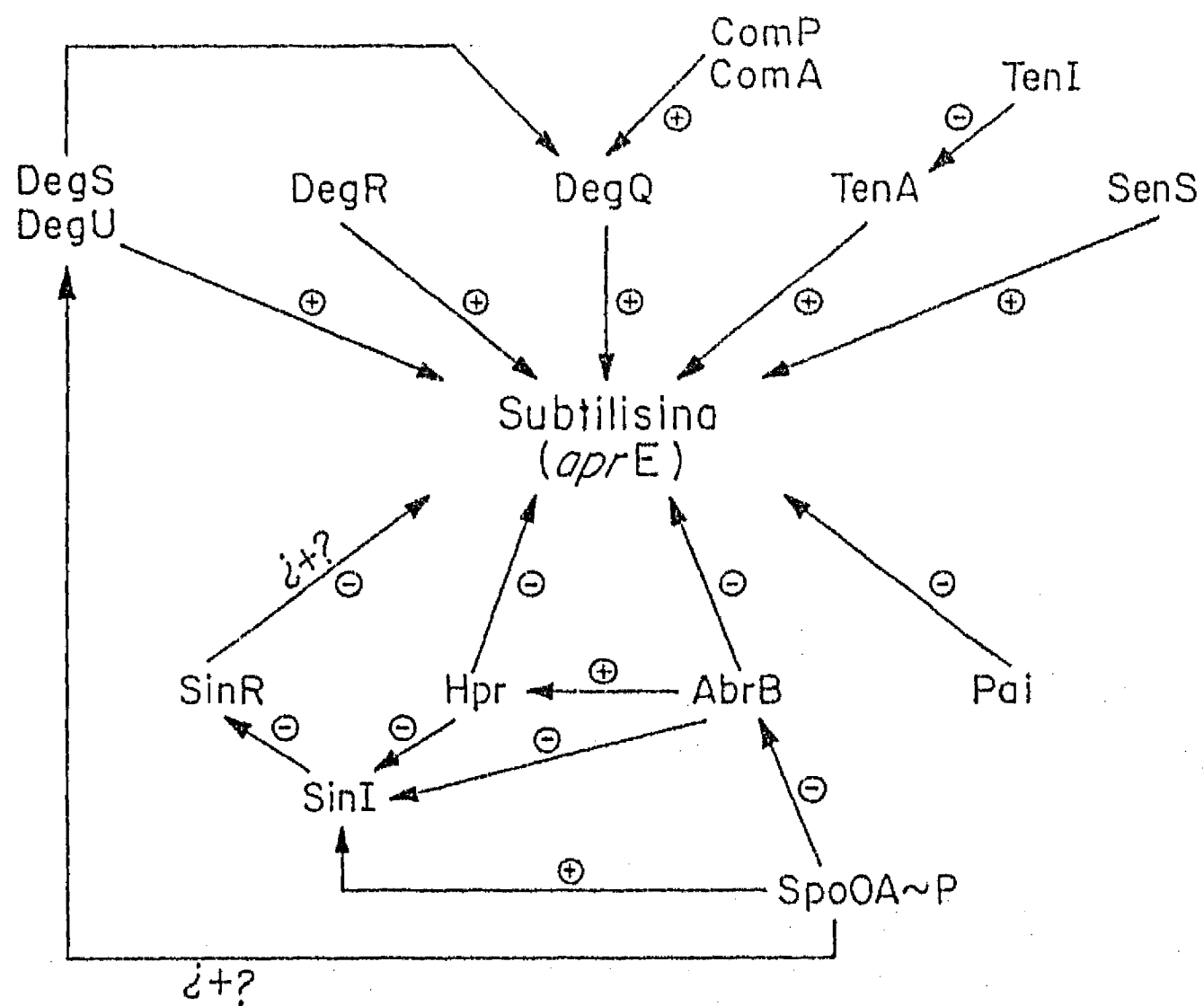


Fig.2.- Elementos y mecanismos de regulación involucrados en la expresión del gene *aprE*. Los reguladores negativos están indicados por (-) y los positivos por (+).

JUSTIFICACIÓN

Para poder entender como algunos de estos reguladores (SpoOA, SinR y DegU) operan sobre el gene *apRE*, y cual es la interrelación entre el proceso de esporulación y la regulación del gene *apRE*, es necesario definir las funciones de los productos de los genes reguladores, y tratar de determinar como estos interaccionan entre ellos durante el proceso de esporulación. De este modo, además de generar información básica acerca de los sistemas que en *B. subtilis* regulan la expresión de los genes durante el período de transición, podemos, también, desarrollar cepas más eficientes para la producción de subtilisina y por ende, de otras proteínas heterólogas que se pudieran expresar en *B. subtilis* bajo las señales de regulación del gene *apRE*.

Por otra parte, cabe recordar que el género *Bacillus* es muy amplio, por lo cual es importante considerar los conocimientos que se tienen y que se pueden producir a partir de las especies mejor conocidas como *B. subtilis* y, su posible relación con otras especies que conforman este género, las cuales, son poco o nada conocidas.

Dadas las características antes mencionadas, en nuestro laboratorio consideramos a *B. subtilis* como un sistema alternativo a *E. coli*, eficiente y económico, para la producción de proteínas de interés industrial, bajo las señales de regulación del gene *apRE*, así como para llevar a cabo estudios de investigación básica. En este sentido, aún falta contestar una serie de preguntas acerca de la regulación de este gene, por lo cual, se plantearon los siguientes objetivos.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Contribuir al estudio de los mecanismos involucrados en la regulación del gene *apRE*, y a entender mejor la relación entre la regulación de este gene y el proceso de esporulación en *B. subtilis*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

Estudiar el efecto que ocasionan las mutaciones *sinR*, *degU32(Hy)* y *spoOA9V*, en la expresión de *apRE* y el proceso de esporulación en *B. subtilis*.

GENERALIDADES

a) CRECIMIENTO VEGETATIVO

Es común que conforme los nutrientes en un cultivo celular empiezan a ser limitantes, las células en ese cultivo inician la entrada a la fase estacionaria y como consecuencia, activan varias respuestas de estrés (Strauch y Hoch, 1992a; Strauch y Hoch, 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 (fig.4) (Setlow 1994; Strauch y Hoch, 1992b). Además de las proteínas necesarias para la iniciación de la formación de la espora en *B. subtilis*, otras proteínas, las cuáles no son necesarias para la esporulación, son también sintetizadas durante esta misma etapa de desarrollo (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, poder 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: el desarrollo de competencia lo cual confiere a la célula la habilidad para captar moléculas de DNA del medio, la producción de antibióticos, la síntesis de flagelo para movilidad y la inducción completa del ciclo de Krebs, el cual, está parcialmente reprimido durante el crecimiento vegetativo (Strauch y Hoch, 1992a).

b) 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 y de las funciones antes mencionadas (Kunst et al. 1994; Strauch y Hoch, 1992a). Por lo tanto, a las proteínas AbrB, Hpr, SinR y DegU se les conoce como "reguladores del estado de transición". Este nombre se les da porque controlan múltiples funciones que se llevan a cabo durante el estado de transición, esto es, entre el final del crecimiento vegetativo y el inicio de la fase estacionaria y/o de esporulación (fig.4). Por otra parte, aunque ninguna de las mutaciones conocidas en estos reguladores del estado de transición, afectan significativamente la formación de la espora, hay evidencias que indican que algunos de los genes que codifican para estas proteínas 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).

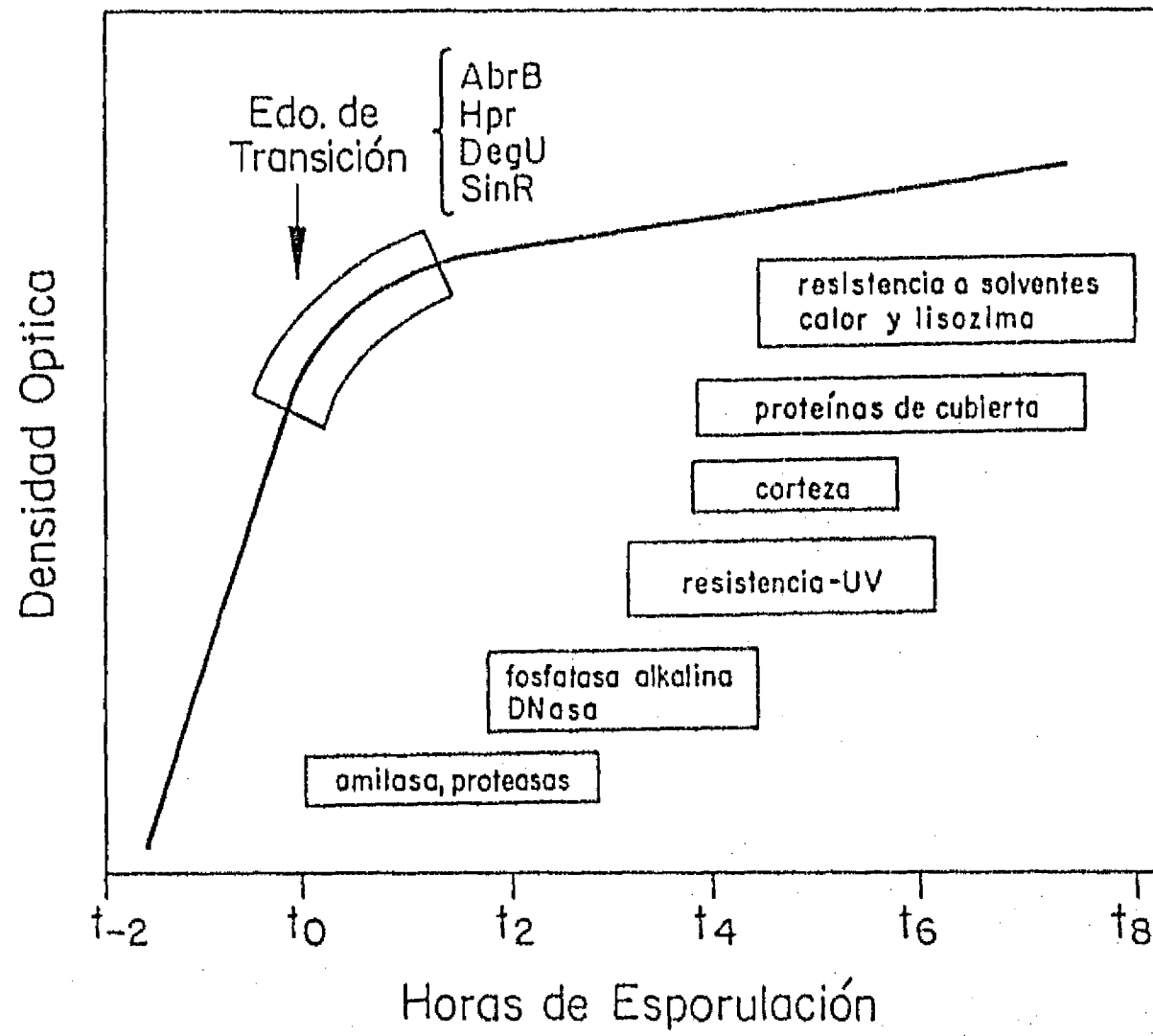
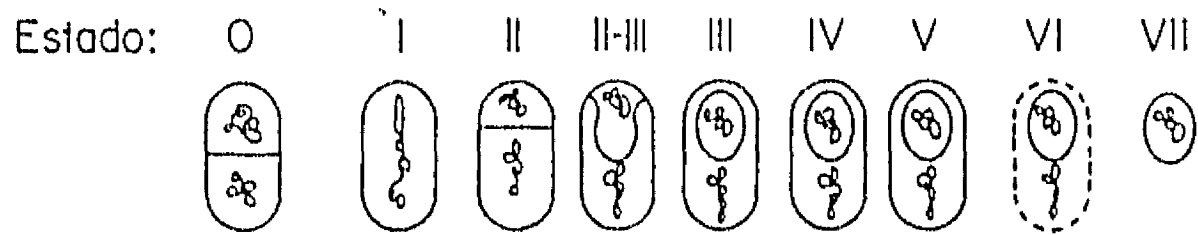


Fig.4.- Tiempos idealizados para la producción de diferentes marcadores celulares durante el proceso de esporulación de *Bacillus subtilis*.

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 (Kunst et al. 1994; Strauch y Hoch, 1992a).

GENE *sinR*-PRODUCTO PEPTIDICO PROTEÍNA SinR

El gene *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 gene forma parte de un operón dicistrónico y es precedido por un gene llamado *sinI*, el cual codifica para la proteína SinI constituida por 57 residuos de aminoácidos. La función de SinI es inactivar a la proteína SinR a través de interacciones proteína-proteína durante el final de 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* (fig.5) (Gaur et al. 1988).

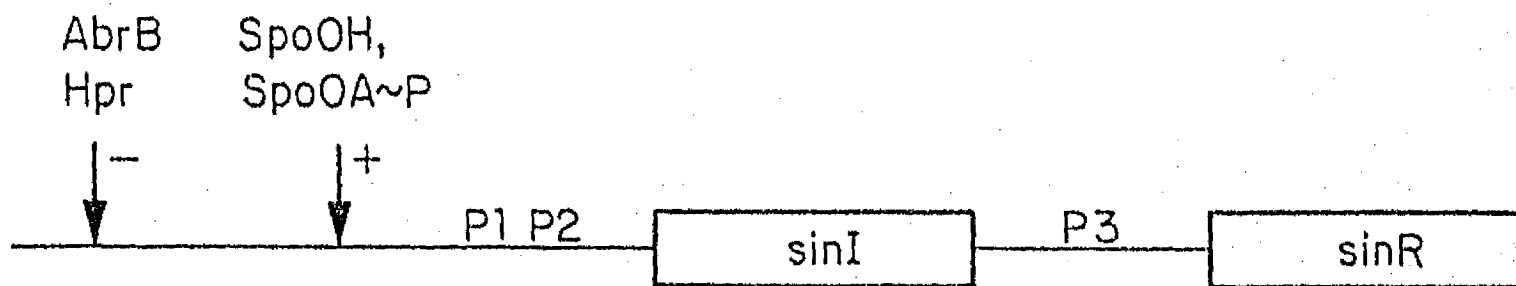


Fig.5.- Esquema general de la regulación del operón *sinIR*. En fase exponencial, el gene *sinR* es transcrito a partir del promotor P3, debido a que los promotores P1 y P2 se encuentran reprimidos por las proteínas AbrB y Hpr. Estos promotores no pueden ser activados por la proteína SpoOA, porque ésta solo es activa una vez que se encuentra fosforilada. Lo anterior ocurre al inicio de la esporulación, siendo este el momento en el cual se inicia la síntesis de SinI.

Los niveles de expresión de *sinI* se incrementan al final del tiempo conocido como T_0 y requieren de las proteínas SpoOA-P y SpoOH (*sigH*). Por el contrario, el gene *sinR* es expresado constitutivamente, pero la proteína sólo se detecta al inicio de la esporulación y su expresión es independiente de las proteínas SpoOA-P y SpoOH (Gaur et al. 1988). La inactivación del gene *sinR* en el cromosoma conlleva a la pérdida de la habilidad para desarrollar competencia, movilidad 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 13,000 Da (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.1). Este abarca de la posición -263 a la -216 y es adyacente a un sitio de unión de la proteína reguladora Hpr (Gaur et al. 1991; Strauch y Hoch, 1992a).

Asimismo, se ha propuesto que SinR se une a otra región localizada muy cerca del promotor de *aprE*, lo cual hasta ahora no se ha podido demostrar.

GENES *degS/degU* Y SUS CORRESPONDIENTES PRODUCTOS PEPTÍDICOS LAS PROTEÍNAS DegS/DegU

Mientras los reguladores del estado de transición AbrB, Hpr y SinR ejercen un efecto negativo sobre la expresión del gene *aprE*, una variedad de estudios han señalado que los productos de los genes *degS* y *degU* se encuentran implicados en activar su transcripción durante el estado de transición (fig.2) (Henner et al. 1988a; Msadek et al. 1991). 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 muy conservada de proteínas procarióticas. Esta familia cuenta con un sistema que transmite señales por medio de dos componentes (Henner et al. 1988b). DegS es una quinasa que se autofosforila en respuesta a 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).

Combinando ahora las observaciones mencionadas con un análisis de naturaleza molecular de varias mutaciones en *degU* y *degS*, ha sido posible plantear la siguiente hipótesis: 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 movilidad (Msadek et al. 1990). Cabe recordar que una cepa con una mutación en *sinR*, también es deficiente en competencia y movilidad y que sobreproduce proteasas extracelulares.

Por otra parte, un análisis de delección (Henner et al. 1988a) enfocado a localizar los sitios de unión de DegU en la región de regulación del gene *aprE*, sugirió que el fragmento de

DNA involucrado abarcaba desde la posición -164 a la -141 (fig.1). Sin embargo, es importante mencionar que en experimentos de "footprinting" *in vitro* utilizando DegU y la región de regulación de *aprE*, no se ha podido localizar el sitio de unión para esta proteína.

c) PROCESO DE ESPORULACIÓN

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.4). La formación de esta estructura es un ejemplo extremo de la adaptación de *B. subtilis* al medio e involucra a más de 80 genes (Kunkel 1991). En el inicio de la esporulación, la proteína SpoOA, la cual funciona como represor y activador, juega un papel central (fig.3). El gene *spoOA* es transcrito a partir de dos promotores, Pv y Ps. Pv es activado por el factor de transcripción E σ^A , lo cual proporciona un nivel basal de síntesis de SpoOA en células en crecimiento vegetativo. Ps es regulado por E σ^H , el cual produce un incremento súbito en la síntesis de SpoOA al inicio de la esporulación (Chibazakura et al. 1991; Yamashita et al. 1989).

La proteína SpoOA pertenece a la familia de reguladores bacterianos de dos componentes (Stock et al. 1989). La fosforilación de SpoOA es la clave en el control del inicio de la esporulación (fig.6). El fosfato es transferido a SpoOA 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-cinasas, codificadas por los genes *kinA* y *kinB*, pueden transferir el fosfato a la proteína SpoOF la cual a su vez transfiere el fosfato a un segundo acarreador llamado SpoOB. La proteína SpoOB es el donador directo del fosfato a SpoOA. Esta vía puede permitir que mediante sensores ambientales, tanto internos como externos, se controle el nivel de SpoOA fosforilada de una manera rápida y precisa (Grossman 1991). Congruente con esta idea, se ha demostrado que las cinasas KinA y KinB pueden responder a diferentes señales.

SpoOA-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 SpoOA-P es responsable de la activación de ciertos genes específicos de la esporulación, como lo son los operones *spoIIA* (Perego et al. 1991), *spoIIG* (Satola et al. 1991; 1992), *spoIIE* (York et al. 1992) y el gene *sinI* (Bai et al. 1992) (figs.3 y 5).

Por otra parte, se sabe que algunas mutaciones en *spoOA* bloquean la esporulación en su fase inicial y eliminan la producción de proteasas extracelulares (subtilisina) (Strauch y Hoch, 1992a). Otras mutaciones, como la denominada *spoOA9V*, bloquea la esporulación en el estadio II (fig.4). Sin embargo, al parecer esta mutación produce niveles normales de subtilisina (Perego et al. 1991).

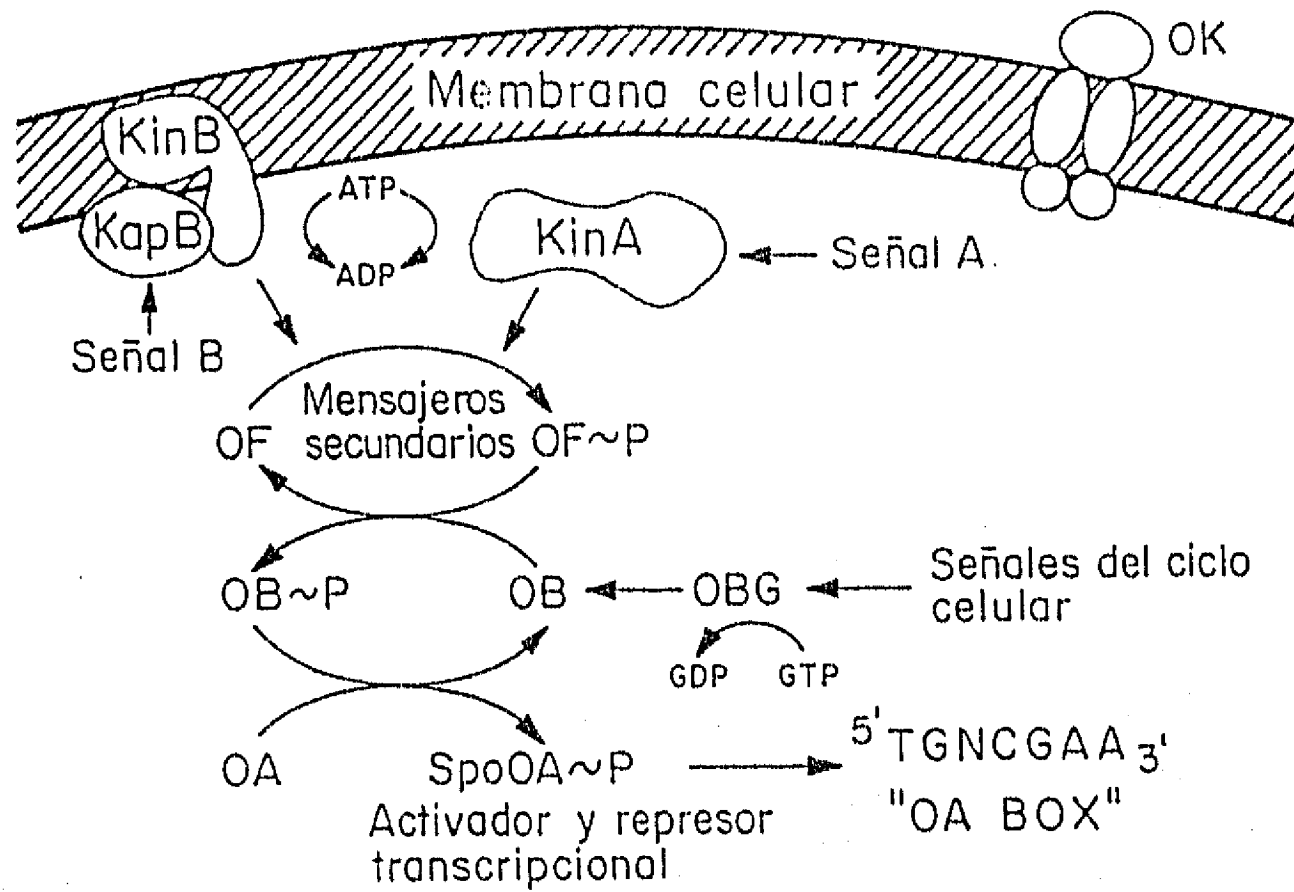


Fig.6.- Transducción del fosfato. Mecanismo por el cual se transmiten ciertas señales metabólicas, ambientales y de densidad celular, al aparato transcripcional para dar inicio a la esporulación. En este sistema, como producto final, la proteína SpoOA queda fosforilada.

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) 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 censada por la célula la concentración de GTP y cómo se transmite la señal al aparato transcripcional.

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 por crecimiento de células a alta densidad. El 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 acerca de la naturaleza de dichos factores y, menos aún, de cómo su presencia es censada e interpretada.

3) Ciclo celular.

En su etapa más temprana la esporulación claramente comprende una 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.4). 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).

"Todo lo que una persona
puede imaginar, otras podrán
hacerlo realidad"

Julio Verne.....

"No te quedes pensando"

CAPITULO 2

MANUSCRITOS

EFECTO DE LAS MUTACIONES *sinR* Y
degU32(Hy) EN LA REGULACION DEL
GENE *apre* DE *B. subtilis*.

(EN REVISIÓN EN MGG)

EFFECTS OF sinR AND degU32(Hy) MUTATIONS ON THE REGULATION OF THE aprE GENE IN Bacillus subtilis.

Jorge Olmos¹, Eugenio Ferrari², Francisco Bolivar¹ and Fernando Valle¹.

¹Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Postal 510-3. Cuernavaca, Morelos 62271, México.

²Genencor International Inc. 180 Kimball Way. South San Francisco, CA 94080.

Author for correspondence: Fernando Valle

Tel: (52)(73) 114900 Fax: (52)(73) 172388

E-mail: valle@ibt.unam.mx

1 Table, 5 Figures

Abstract

The aprE gene of B. subtilis codes for the serine alkaline protease also known as subtilisin. Its expression is regulated by a complex network of activators and repressors which includes the products of hpr, degU and sinR. To understand the effect of these gene products on subtilisin expression, strains carrying combinations of the mutations degU32(Hy), hpr2 and sinR were constructed. We have found that in all the genetic backgrounds tested, the sinR null mutation decreased aprE expression. Also, by measuring alkaline phosphatase synthesis and heat resistant spores formation, as indicators of sporulation, we have found that some of the mutant strains showed alterations in the sporulation process. The results suggest that these alterations are partially responsible for the observed changes in aprE expression.

Keywords: sporulation process, proteases, gene regulation, transition state regulators.

INTRODUCTION

The aprE gene codes for the extracellular protease subtilisin and has been used as a model to understand the complex regulatory network that controls gene expression during the transition stage and the stationary phase in B. subtilis (Kunst et al. 1974; Ferrari et al. 1985; Ferrari et al. 1986; Ferrari et al. 1988). AprE expression is controlled by several regulators, such as DegU/DegS (Henner et al. 1988b; Kunst et al. 1988; Msadek et al. 1990), AbrB (Strauch et al. 1989), Hpr (also known as scoC) (Kallio et al. 1991), and SinR (Gaur et al. 1991; Mandic-Mulec et al. 1992; Bai et al. 1992). Furthermore, direct binding of AbrB, Hpr and SinR to the aprE regulatory region, has been demonstrated by in vitro gel retardation assays and/or footprinting analysis (Gaur et al. 1991; Kallio et al. 1991; Strauch et al. 1989).

A B. subtilis strain carrying the degU32(Hy) mutation overproduces several degradative enzymes, it forms filaments and is deficient in competence and motility.

On the other hand, SinR is a dual function regulatory protein exerting both positive and negative effects on gene expression. Inactivation of sinR results in an increase in extracellular proteases activities, filamentous growth, loss of competence and motility, and a deficiency in autolysin production (Gaur et al. 1986; Bai et al. 1992). SinR binds to the aprE promoter on the region located between -217 to -263 with respect to the transcription start point (Gaur et al. 1991). Furthermore, it is known that high levels of SinR repress production of extracellular proteases and the expression of an aprE::lacZ fusion (Gaur et al. 1986; Gaur et al. 1991).

Based in all these results, it is generally assumed that SinR is a direct acting

repressor of aprE. A prediction of this model is that a sinR null mutation might elevate aprE expression. However, to our knowledge this experiment has never been reported. Furthermore, the effect of such mutation in strains with phenotypes that overproduce extracellular enzymes like hpr2 and/or degU32(Hy), has not been described.

Considering that a better understanding of the interactions between different regulators is necessary to comprehend aprE regulation, and specially because of the similarities between some of the sinR and degU32(Hy) phenotypes, we decided to study in more detail the combined effects of these two mutations on aprE expression. In some experiments the hpr2 mutation was also analyzed.

MATERIALS AND METHODS

Strains and Plasmids

The bacterial strains used in this work are listed in Table 1. E. coli JM101, transformed by standard procedures (Sambrook et al. 1989), was used for plasmid construction and amplification. B. subtilis strains were derived from BG125 (Ferrari et al. 1986). The transformation protocol was as described by Anagnostopoulos and Spizizen (1961). The pSG35.1 and pJF751 integrative plasmids have been described previously (Ferrari et al. 1985; Ferrari et al. 1988). Plasmid paprlacZ was constructed as described in Fig.1, using standard gene cloning techniques (Sambrook et al. 1989).

Growth media and antibiotics

LB medium (Sambrook et al. 1989) was used for routine liquid growth,

maintenance of E. coli and B. subtilis strains. To study aprE expression and the sporulation process in B. subtilis, Schaeffer's sporulation medium (Schaeffer et al. 1965) was utilized. Depending on the B. subtilis strain used (Table 1), Chloramphenicol (Cm) and/or Phleomycin (Pm) were used at 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ in LB plates.

Enzymatic assays

The β -galactosidase activity of the B. subtilis strains was measured as previously reported (Ferrari et al. 1985). Extracellular subtilisin activity was quantified using the synthetic substrate N-succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanalide in conditions optimal for alkaline proteases activity (T. Graycar Pers. comm.). Briefly, culture supernatants were assayed in 1 ml of final volume, containing 10 μl of a 20 mg ml^{-1} stock solution of N-succinyl-L-Ala-L-Ala-L-Pro-L-Phe-p-nitroanalide dissolved in Dimethyl Sulfoxide (DMSO), 890 μl of a solution of 0.1 M Tris pH 8.6 at 25°C and 100 μl of supernatant. The assays measured the increase in absorbance at 410 nm min^{-1} due to hydrolysis and release of p-nitroanaline ($\epsilon_{410} = 8480/\text{M cm}$, Estell et al. 1985).

Measurements of sporulation process markers

To measure APase activity and heat resistant spores by the methods described by Nicholson and Setlow (1990), 1.5 ml samples were taken from the same cultures used for β -galactosidase assays.

Results

Expression of the aprE::lacZ translational fusion

Studies on aprE expression using an aprE::lacZ translational fusion, in wild type (wt), hpr2 and degU32(Hy) strains have been reported (Ferrari et al. 1985; Ferrari et al. 1986; Henner et al. 1988a). These studies have shown that the highest specific subtilisin production rate is obtained between stage 0 and II of sporulation. In addition, it is known that hpr2 and degU32(Hy) have a synergistic effect on aprE expression (Ferrari et al. 1995). As mentioned in the introduction, we were interested in studying in more detail the effect of sinR null mutation in aprE expression, in a wt background or in strains carrying the hpr2 and/or degU32(Hy) mutations. For this purpose, we constructed a set of isogenic strains carrying one or more of these mutations (Table 1), and measured the level of aprE expression using the aprE::lacZ translational fusion described in Fig. 1. The β -galactosidase levels obtained in shake flask cultures of wt, hpr2 and degU32(Hy) strains (Fig. 2) were similar to those reported by others (Ferrari et al. 1986). Interestingly, in all genetic backgrounds tested, specially in the degU32(Hy) strain, the interruption of sinR caused a drastic decrease on β -galactosidase levels, without changing its timing and profile of expression (Fig. 2B). These results were unexpected because, as mentioned before, the sinR null phenotype is associated with higher expression of extracellular proteases (Gaur et al. 1986), and several lines of evidence indicate that SinR could be a direct acting repressor of aprE. This discrepancy could be explained by assuming that the sinR null mutation has a positive effect on the expression of one or more proteases other

than AprE. To test this hypothesis, we decided to analyze the extracellular protease production in more detail. The first parameter analyzed was the total extracellular proteases activity as described in Materials and methods. Because the strains used are deleted for the npr gene and the assays were performed at pH 8.6, measurements should detect primarily subtilisin and other protease(s) active in alkaline conditions. Figure 3A shows that the sinR null mutant produced about two-fold more extracellular proteases than the parent strain. This result is in good agreement with previously reported data (Gaur et al. 1986). However, in a degU32(Hy) background, the sinR null mutation, appears to have a negative effect by decreasing the extracellular proteases level to 50% of the degU32(Hy) parental strain (Fig. 3A). Next, we compared the total extracellular proteases production in two B. subtilis strains in which both, the neutral and alkaline proteases structural genes have been deleted. As shown in Fig. 3B, it is evident that compared with the control strain, the sinR mutant produced a higher level of total extracellular proteases. These results confirm that the sinR null mutation decreases aprE expression, while increases the level of one or more unidentified protease(s).

Alterations on the sporulation process.

As an attempt to understand how the sinR null mutation affect aprE expression, we decided to analyze some other events of the sporulation process like expression of APase, timing of heat-resistant spores appearance and sporulation efficiency of the cultures. APase expression is an indicator of the stage II in the sporulation process

as defined by the appearance of a completed asymmetric septum (Gaur et al. 1986). Appearance of heat resistant spores indicates completion of the sporulation process. The sporulation efficiency is a measurement of the fraction of the culture that was able to differentiate into heat-resistant spores. This fraction varies depending on the media composition and genetic background (Schaeffer et al. 1965; Chung et al. 1994).

In the wt strain, as shown in Fig. 4, the APase specific production rate increased first at T_2 (7.5 h), and synthesis resumed later on, around T_8 , as described by others (Bookstein et al. 1990). However, in sinR and/or degU32(Hy) mutants, the peak of APase production was reached very early in the sporulation process, between T_2 and T_3 and their APase level was 2 and 5-fold higher, respectively, than in the wild type strain. Our results confirm a previous report that demonstrated that the sinR null mutation resulted in the expression of stage II genes one hour earlier (Mandic-Mulec et al. 1992). To our knowledge, the observation that the degU32(Hy) mutation affects APase has not been reported.

The changes in the level and timing of APase expression for all the analyzed strains, were also reflected in the appearance of heat-resistant spores. In all tested mutants mature spores appears much earlier than in the wt strain (Fig 5). Furthermore, the degU32(Hy) strain sporulated at the same level as the wt strain, but strains carrying the sinR null mutation sporulate at a frequency twice as high as the wt. This difference, however, was only observed by measuring the sporulation percentage 12 h after T_0 (Fig. 5).

We want to stress the point that strains lacking SinR sporulate with higher efficiency

than the wt strain, has been reported previously (Mandic-Mulec et al. 1992). However, the earlier detection of heat-resistant spores has not been reported for these two genetic backgrounds.

DISCUSSION

It has been reported that SinR is a repressor of stage II events, thus preventing a premature commitment to a dormant stage (Mandic-Mulec et al. 1992; Louie et al. 1992). The absence of this regulatory circuit in a sinR null mutant, could increase the size of the subpopulation completing stage II, i.e. the number of cells committed to sporulate. As a consequence, some of the events that follow septum formation, such as APase activity and the appearance of heat resistant spores, could occur early and/or in a higher fraction of the cell population. Furthermore, by changing the time frame in which certain genes are turned on or off, the absence of SinR could also affect some of the events preceding septum formation. For instance, if in a wild type strain the expression of a gene last 2 h, time needed to overcome the repressive effect of SinR and proceed to the next stage, in absence of the repressor, this period of time could be shorter. This is an important factor to consider since, in the wild type strain, the expression of aprE ceases around T_3 (Fig. 2A). Hence shortening the subtilisin expression period could explain the observed negative effect of sinR null mutations on aprE.

Another aspect to consider is the fact that in a sporulating culture of B. subtilis, only a subpopulation of cells actually produces mature heat-resistant spores (Schaeffer et al.

1965). Furthermore, recently it has been shown that cells that do not produce spores, are unable to express some of the earliest induced developmental genes that are directly activated by Spo0A~P (Chung et al. 1994). It is conceivable that mutations in some of the transition state regulators could also affect the behavior of those subpopulations.

Considering that aprE expression is coupled to a developmental process in which the magnitude and the timing of a cascade of responses is monitored and controlled constantly. It is therefore reasonable to expect that some of the effects caused by mutations in certain transition state regulators alter subtilisin expression by altering the sporulation process. It should be mentioned that to date no transition state regulators mutations affecting solely aprE expression have been described. Finally it should be emphasized that some of the mutations studied affected the sporulation program changing the timing and by increasing the fraction of cells capable of forming heat resistant spores. These results suggest that in B. subtilis there is a mechanism that controls the percentage of cells which will undergo sporulation, while other members of the population perform other activities. Such mechanism would assure that, in an adverse environment, part of the population will produce spores to insure survival, while other cells can resume exponential growth as soon as the appropriate conditions arise. It appears that B. subtilis cultures behave more like a well programmed microbial society where there is a division in the roles that certain subpopulations perform, to ensure the continuous permanence of this microorganism in its ecological niches.

REFERENCES

- 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
- Bookstein C, Edwards C, Kapp N, Hulett M (1990) The Bacillus subtilis 168 alkaline phosphatase III gene: Impact of a phoAIII mutation on total alkaline phosphatase synthesis. J Bacteriol 172:3730-3737
- 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 176:1977-1984
- Estell DA, Graycar TP, Wells JA (1985) Engineering an 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 expression, assayed using a Subtilisin- β -Galactosidase gene fusion. In: Hoch JA, Setlow P (eds) Molecular biology of microbial differentiation. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp 180-184
- Ferrari E, Howard SM, Hoch J (1986) Effect of stage 0 mutations on subtilisin expression. J Bacteriol 166:173-179
- 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, Jarnagin AS, Schmidt BF (1995) 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

Gaur NK, Dubnau E, Smith I (1986) Characterization of a cloned Bacillus subtilis gene that inhibits sporulation in multiple 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

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

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

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 56:1481-1489

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

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

Msadek T, Kunst F, Henner D, Klier A, Rapoport G, Dedonder 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 degS and degU. J Bacteriol 172:824-834

Nicholson WL, 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

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

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

Schaeffer P, Millet J, Aubert J (1965) Catabolite repression of bacterial sporulation. Proc Natl Acad Sci USA 54:704-711

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

Figure Legends

Figure 1. Construction of the *paprlacZ* plasmid. The 634 bp DNA fragment containing the *aprE* regulatory region isolated from pSG35.1 was cloned into pJF751. Resulting plasmid (*paprlacZ*) allows integration into the *aprE* locus by a single crossover event.

Figure 2. Expression of the *aprE::lacZ* fusion. (A) LacZ levels in the *wt* (BB83), *hpr2* (BB84), *sinR* (BB85), *sinR hpr2* (BB86), *degU32(Hy)*(BB87) and *sinR degU32(Hy)*(BB88) strains. T_0 in the X axis indicate the beginning of the sporulation. Due to the high level of β -gal produced by the BB87 and BB88 strains and to fit the data in the plot, a break in the scale for the Y axis indicated by the symbol // was introduced. (B) To determine the time at which the maximal *aprE* expression was achieved, the β -gal specific production rate was calculated and plotted.

Figure 3. Total extracellular alkaline proteases levels. (A) Measurements of the *wt* (BB80), *sinR* (BB11), *degU32(Hy)*(BB17) and *sinR degU32(Hy)*(BB18) strains. (B) Extracellular proteases detected in *npr aprE* (BB89) and *npr aprE sinR* (BB90) strains. T_0 indicate the initiation of the sporulation.

Figure 4. Alkaline phosphatase specific production rate in the *wt* (BB83), *sinR* (BB85), *degU32(Hy)*(BB87) and *sinR degU32(Hy)*(BB88) strains. T_0 indicate the initiation of the sporulation.

Figure 5. Formation of heat resistant spores in strains with wt (BB83), sinR (BB85), degU32(Hy)(BB87) and sinR degU32(Hy)(BB88) genetic backgrounds. Samples were taken at different time points, diluted serially in phosphate buffer, 0.1 ml samples were plated on LB agar plates to determine the total number of colony forming units. The rest of the sample was heated at 80°C for 10 min and plated on LB agar plates. The percentage of the population that survived heat treatment was calculated and plotted. T_0 indicate the initiation of the sporulation.

Table 1. Bacterial Strains

<u>Strain</u>	<u>Description</u>	<u>Source</u>
<u>B. subtilis</u>		
IS432	<u>sinR::cat metB5 hisA1 leuA8</u>	M. Strauch
IS720	<u>sinR::pm metB5 hisA1 leuA8</u>	E. Ferrari
BB11	BB80 <u>sinR::cat</u>	This work
BB17	BB80 <u>degU32 (Hy)</u>	E. Ferrari
BB18	BB80 <u>sinR::cat degU32 (Hy)</u>	This work
BB80	<u>Δnpr hisA glyB</u>	E. Ferrari
BB82	<u>Δnpr hisA hpr2</u>	E. Ferrari
BB83	BB80 <u>aprE::lacZ cat</u>	This work
BB84	BB82 <u>aprE::lacZ cat</u>	This work
BB85	BB83 <u>sinR::pm</u>	This work
BB86	BB84 <u>sinR::pm</u>	This work
BB87	BB83 <u>degU32 (Hy)</u>	This work
BB88	BB83 <u>sinR::pm degU32 (Hy)</u>	This work
BB89	BB80 <u>nprE18 ΔaprE3</u>	This work
BB90	BB89 <u>sinR::cat</u>	This work
<u>E. coli</u>		
JM101	<u>supE thi (lac-proAB) [F' traD36 proAB lacI^qZ M15]</u>	Lab stock

Abbreviations: pm, pleomycin gene; cat, chloramphenicol acetyltransferase gene.

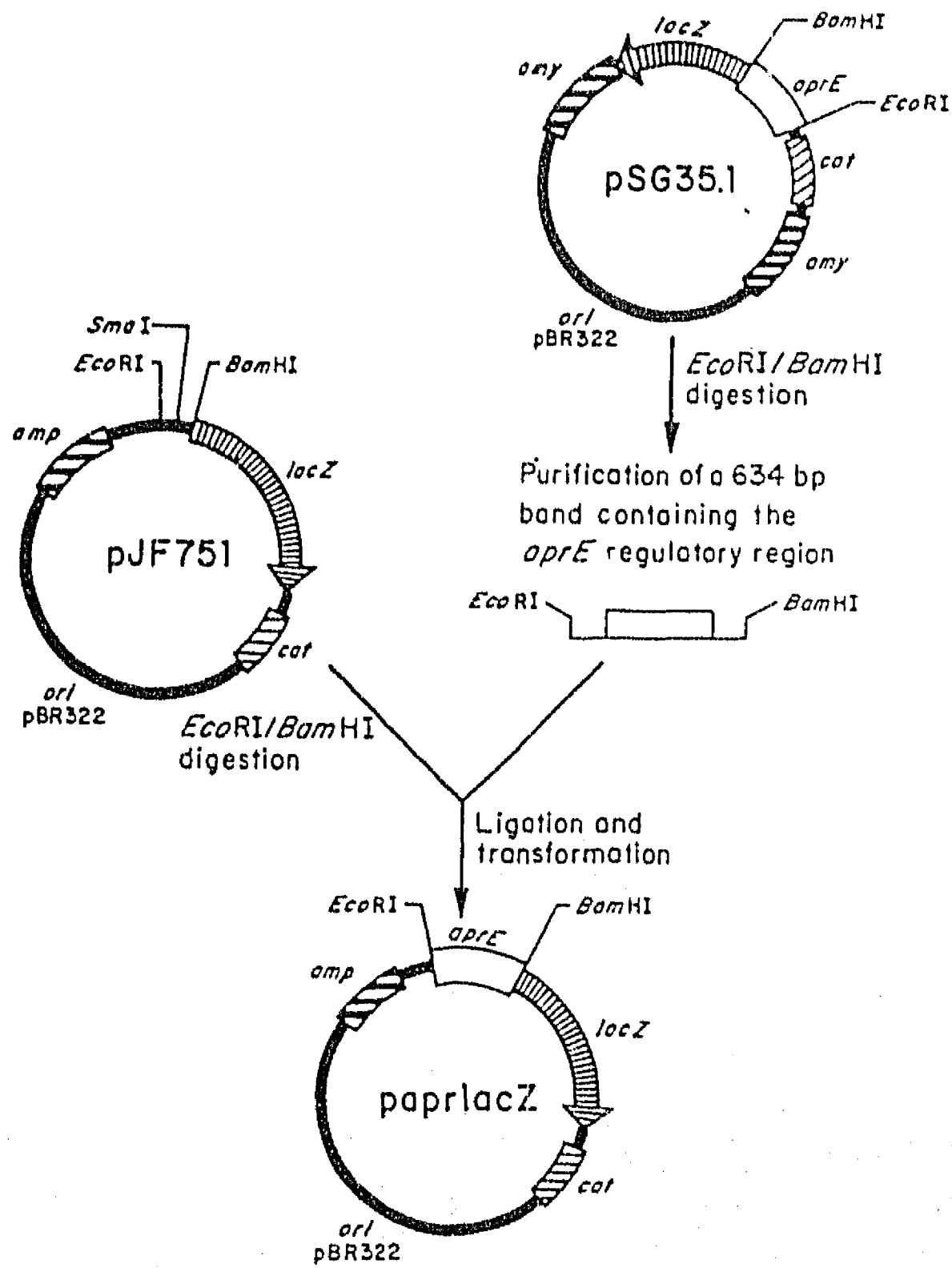


Fig. 1

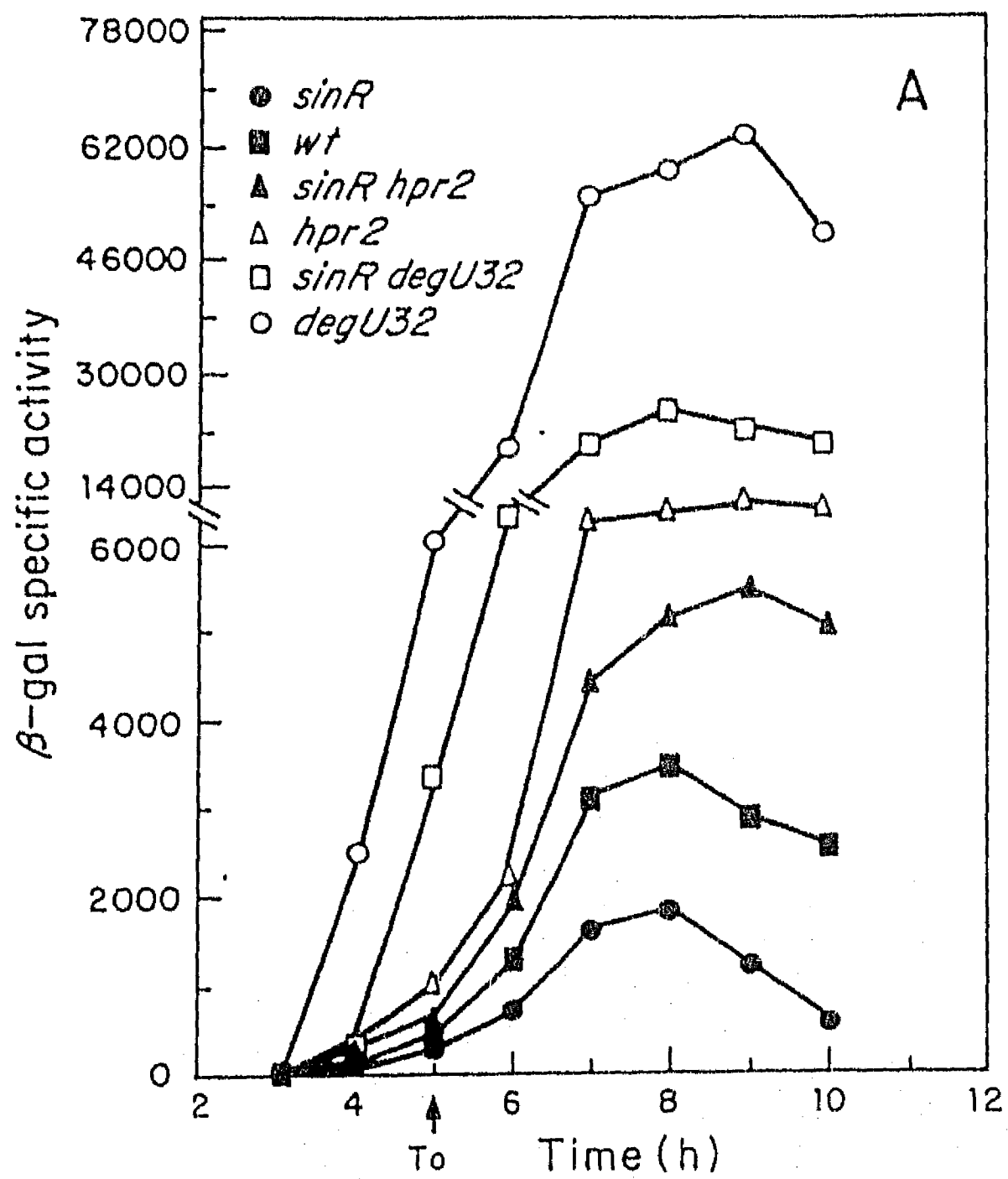


Fig. 2

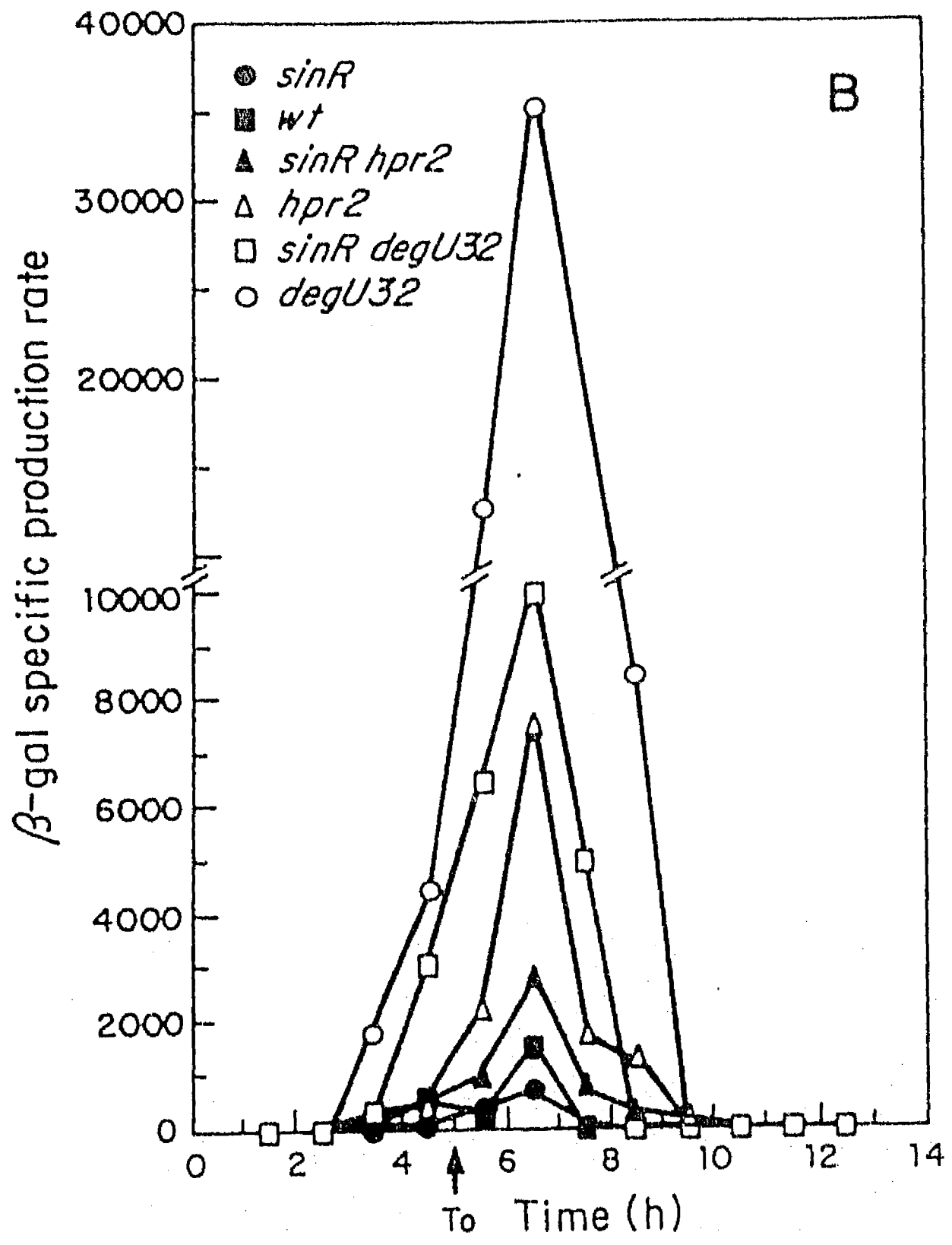
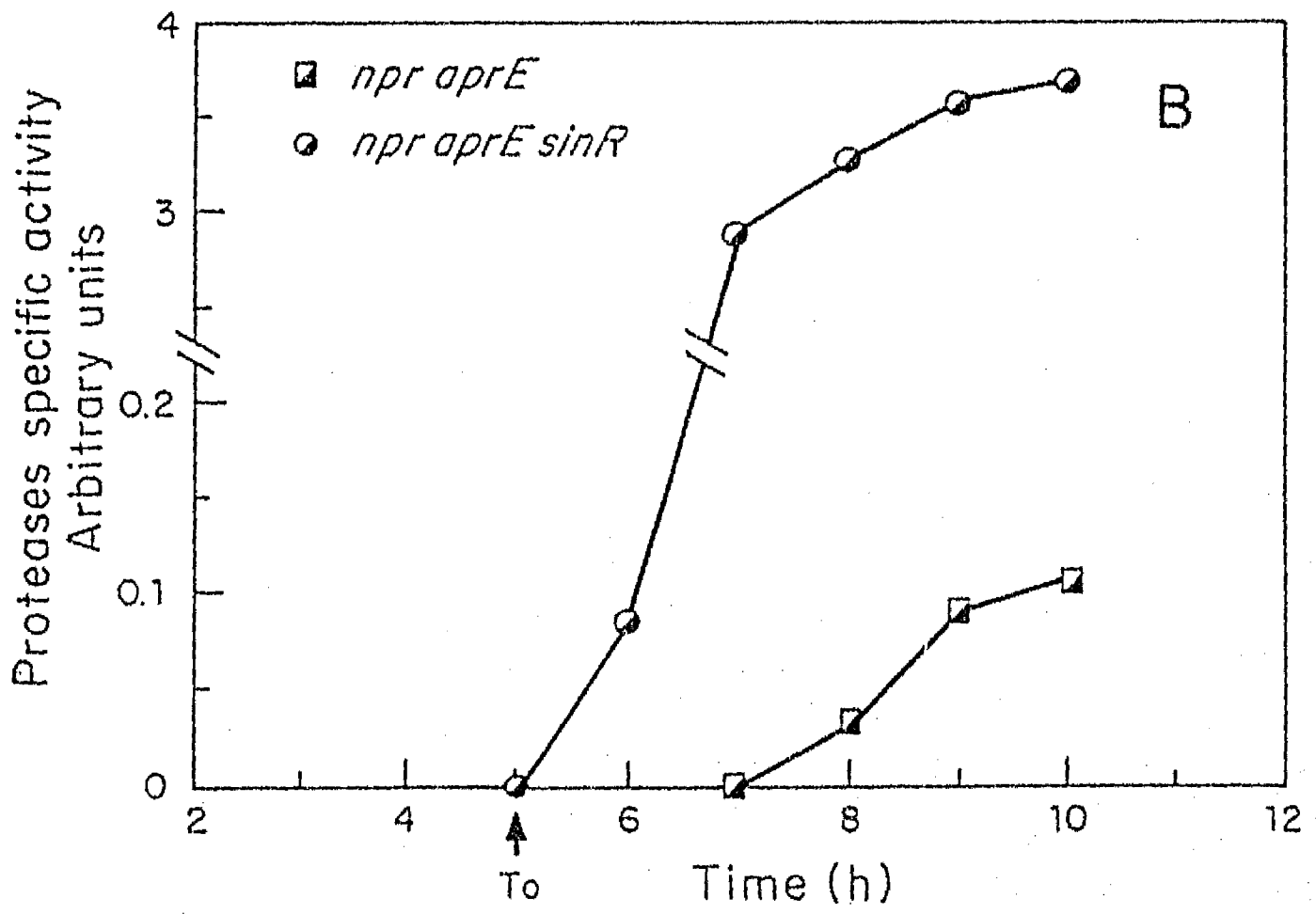
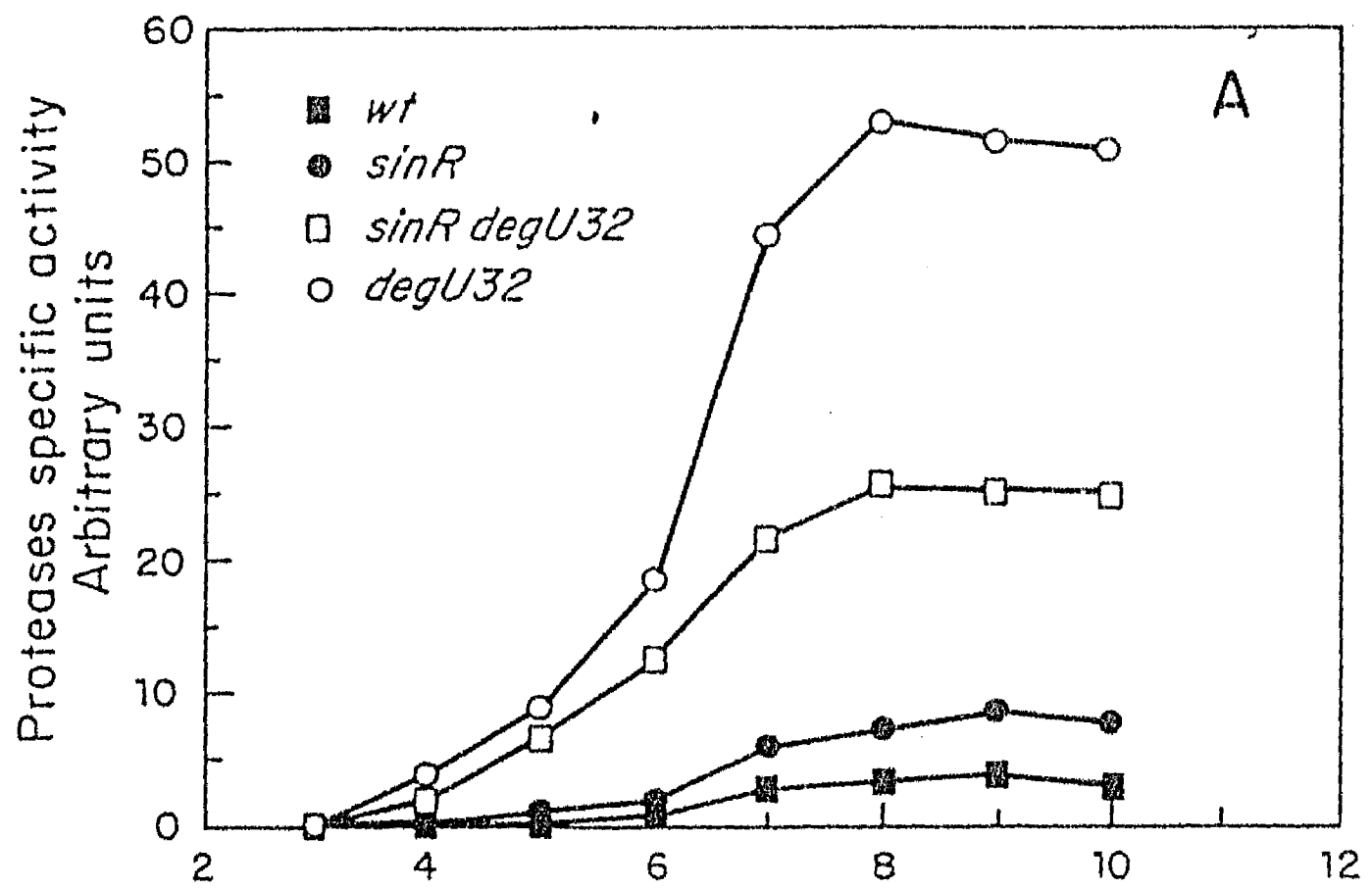


Fig. 2



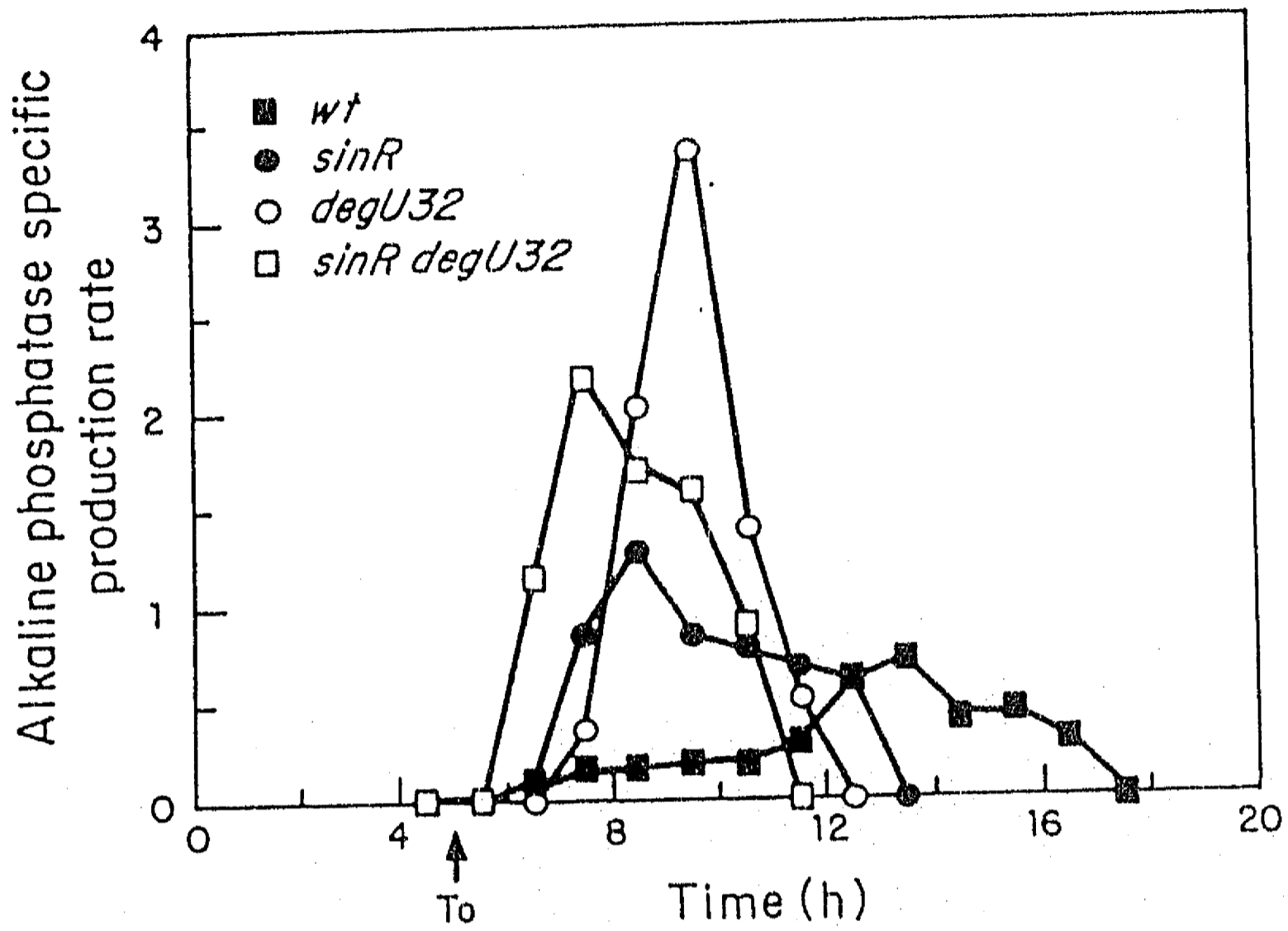


Fig. 4

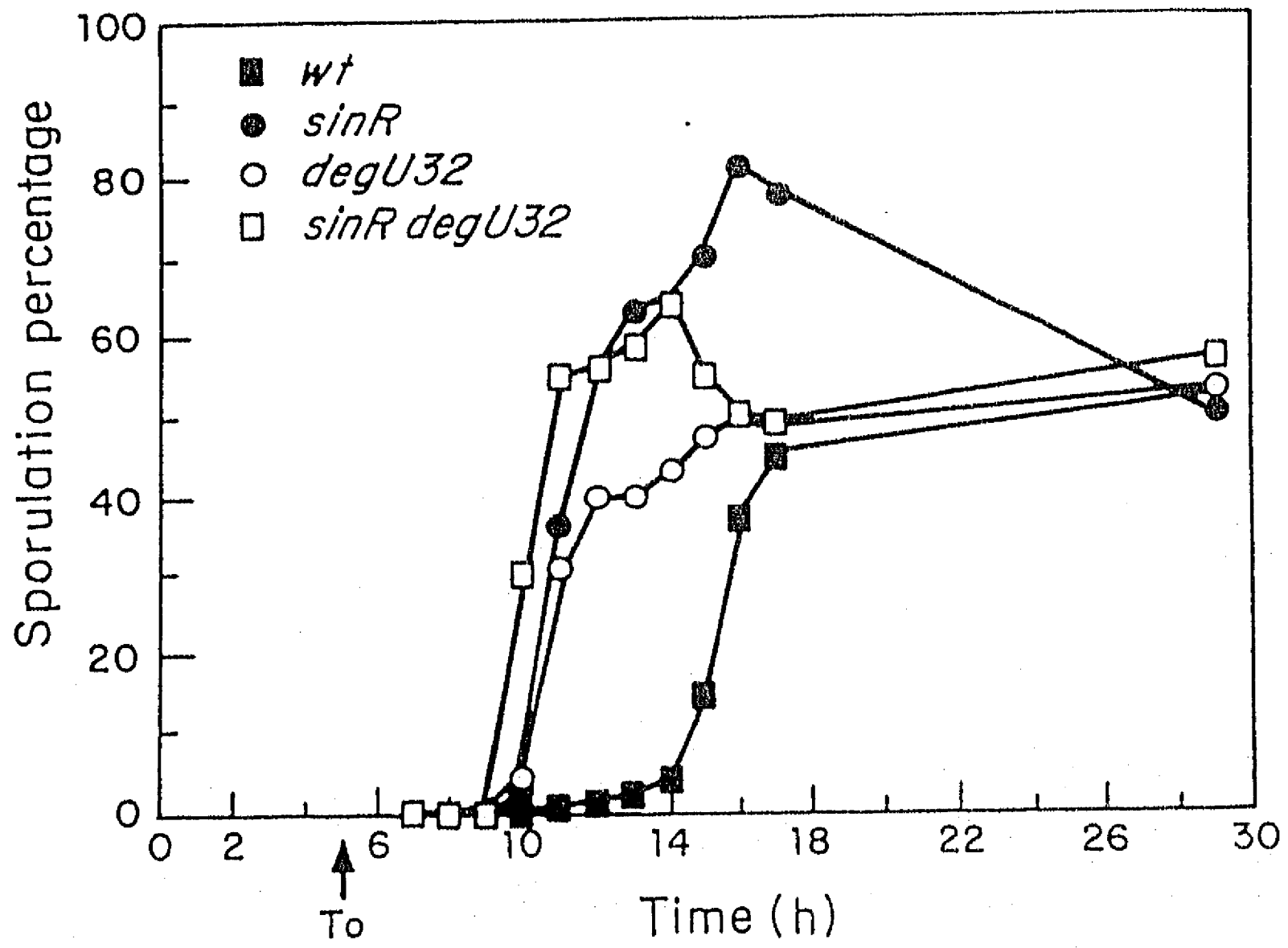


Fig. 5

UNA PROTEINA SpooA TOTALMENTE
FUNCIONAL ES REQUERIDA PARA LA
MÁXIMA EXPRESIÓN DEL GENE *apre*
EN *Bacillus subtilis*.

A functional Spo0A is required for maximal *aprE* expression in *Bacillus subtilis*

Jorge Olmos^a, Victor Bolaños^a, Stuart Causey^b, Eugenio Ferrari^b, Francisco Bollvar^a,
Fernando Valle^{a,*}

^aMolecular Microbiology Department, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos 62271, Mexico

^bGenencor International Inc., 180 Kimball Way, South San Francisco, CA 94080, USA

Received 15 December 1995

Abstract The initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* is under control of the transcriptional factor Spo0A. Most Spo0A mutants fail to initiate the sporulation process and all the sporulation initiated processes such as the synthesis of subtilisin. However, the product of *spo0A9V*, one of the several *spo0A* mutants characterized, distinguishes itself in the fact that, while it appears to effectively repress *abrB*, it fails to activate the *spoIIA* operon. The aim of this study was to examine the effect of the *spo0A9V* mutation on *aprE* expression and we found that in different genetic backgrounds, the *spo0A9V* mutation has a negative effect on *aprE::lacZ* expression.

Key words: Sporulation; *abrB* expression; β -Galactosidase fusion; Phosphorelay; Transition state regulator

1. Introduction

The initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* is under control of the Spo0A transcriptional factor. Spo0A belongs to a large family of phosphorylation-activated signal transduction proteins that regulate adaptative responses in bacteria [1]. It is phosphorylated by a complex phosphorelay that includes several components needed to integrate multiple signals [2]. The *spo0A* gene product regulates negatively the *abrB* gene [3,4], a repressor of several genes which transcription is initiated during the transition between exponential growth and stationary phase [5]. As a positive effector, Spo0A is indispensable for activating the expression of at least three important stage II genes or operons [6]. Different mutants of *spo0A* gene have been isolated. Among them, the *spo0A9V* gene product (Spo0A9V) represses *abrB* but fails to activate the *spoIIA* operon. Also, as deduced from qualitative assays on milk plates, when a strain carries the *spo0A9V* allele, the production of extracellular proteases appears normal [7]. These data support the suggestion that in a strain carrying the *spo0A9V* mutation, it is possible to dissociate the positive and negative regulatory properties of Spo0A [7].

The *aprE* gene of *Bacillus subtilis* codes for the extracellular protease subtilisin and its expression is controlled by Spo0A, AbrB and several other regulators [8]. In the present study we examined the effect of the *spo0A9V* mutation on *aprE* expression. We have found that in different genetic backgrounds, the *spo0A9V* mutation has a negative effect on *aprE* expression.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and plasmids

The genotypes of bacterial strains used in this work are listed in Table 1. All strains are derivatives of BG125 [9]. Strain JH13541 was kindly provided by J. Hoch. The rest of the strains were constructed for this study using the method described by Anagnostopoulos and Spizizen in [10]. To measure *aprE* gene expression we used an *aprE::lacZ* fusion integrated in the *amy* locus, as previously described [9].

2.2. β -Galactosidase assays

B. subtilis cells carrying pSG35.1 and pSub-204 (Fig. 1) were grown at 37°C in Schaeffer's sporulation media [11]. At regular time intervals, samples of 1 ml were taken and assayed for β -galactosidase specific activity as described in [9].

2.3. Plasmid construction

Plasmid pSub-204 was constructed using standard recombinant DNA techniques. A DNA fragment that contains part of the *aprE* regulatory region was generated using the polymerase chain reaction (PCR) and the synthetic primers Sub1 and Sub2. The sequence of the primers is the following: 5'GGAATTCGGACTCAGGAGC-ATTTAACC3' (Sub1); 5'CGGGATCCCGTTAACGCAAAACA-CAAGC3' (Sub2). These primers hybridize with the -204 to -185 region of the *aprE* regulatory region and from the +83 to +100 of the *aprE* structural gene respectively [12]. The recognition sequence for the *EcoRI* or *BamHI* restriction enzymes were introduced in the primers to facilitate the cloning of the DNA fragment into pSG35.1 (see Fig. 1).

3. Results and discussion

Since the mutation *spo0A9V* generates a Spo0A protein that can still repress *abrB* efficiently, but cannot activate the transcription of the *spoIIA* operon [7], we were interested in studying the effect of such mutation on *aprE* expression in different genetic backgrounds. For such a purpose we constructed the *B. subtilis* strains described in Table 1. It is important to mention that *hpr2* [13] and *degU32* [14-16] mutations cause *aprE* overexpression and that their effects are synergistic [9-17]. We measured *aprE* expression using an *aprE::lacZ* fusion in all these strains. In all the analyzed strains, β -galactosidase peaked between 2 and 3 h after ending exponential growth (data not shown). To facilitate comparisons between strains, the β -galactosidase specific activities reached at T_2 were compared. As can be seen in Table 2, the *spo0A9V* mutation had a negative effect, even in the strains carrying the *degU32* or *hpr2* mutations that cause *aprE* over-expression. The level of β -galactosidase activity was approximately 5-fold lower in the *spo0A9V* background in all the analyzed strains. We believe that such difference is small for a qualitative assay, like the measurement of halos on skim milk plates, and could explain the discrepancy between

*Corresponding author. Fax: (52) (73) 17-2388.
E-mail: valle@pbr322.ceingeb.unam.mx

our data and the ones reported in [7]. This suggestion is also supported by the fact that milk plates reflect more accurately the levels of the neutral protease NprE.

These data suggest that a fully functional Spo0A is needed for an adequate *aprE* expression. Since *abrB* is regulated normally in a *spo0A9V* background [7], Spo0A should have another role on *aprE* expression (see below). The fact that the negative effect of *spo0A9V* was observed even in a *hpr2* mutant, suggests that this effect is not due to a secondary effect on *hpr*. It is also clear that the *degU32* mutation does not overcome the repressive effect of *spo0A9V*.

A possible explanation for these results could be that in the *spo0A9V* mutant, SinR activity is not adequately regulated. SinR is a regulator that prevents premature expression of stage II sporulation genes [18-20]. Its overproduction has a negative effect on *aprE* expression [21]. Furthermore, purified SinR binds to a specific region on the *aprE* regulatory region [22]. It is known that SinR is regulated by the action of SinI by protein-protein interaction, and that in a *spo0A* mutant, *sinI* is repressed [23].

To test this hypothesis, we analyzed again the effect of *spo0A9V* mutation in *wt*, *hpr2* and *degU32* strains. However, in this set of experiments, we used an *aprE* regulatory region devoided of the SinR binding site as shown in Fig. 1: it is known that such regulatory region is insensitive to SinR repression [12,18]. Essentially, this construction is the same as the one reported previously [12] in plasmid pSG35.8 and integrated into the *amy* locus. However, because we have found that some of the original construct carry an uncharacterized deletion on the *aprE* regulatory region, we built a new plasmid called pSub-204 carrying the upstream region of the *aprE* promoter up to the -204 position (*PaprE*₋₂₀₄) (Fig. 1). The correct integration and size of this fusion was corroborated by PCR (data not shown).

After measuring β -galactosidase levels in these strains (Table 3) it was found that in a *wt* background, after deleting the SinR binding site of the *aprE* regulatory region, the negative effect of the *spo0A9V* mutation disappeared. The same results was obtained in an *hpr2* background. Here is important to mention that as previously reported, and by unknown reasons, the effect of the *hpr2* mutation on this shorter version of the *aprE* regulatory region, is lost [12]. Furthermore, *PaprE*₋₂₀₄ lost partially its capacity to respond to the *degU32* mutation. However, in this genetic background, the

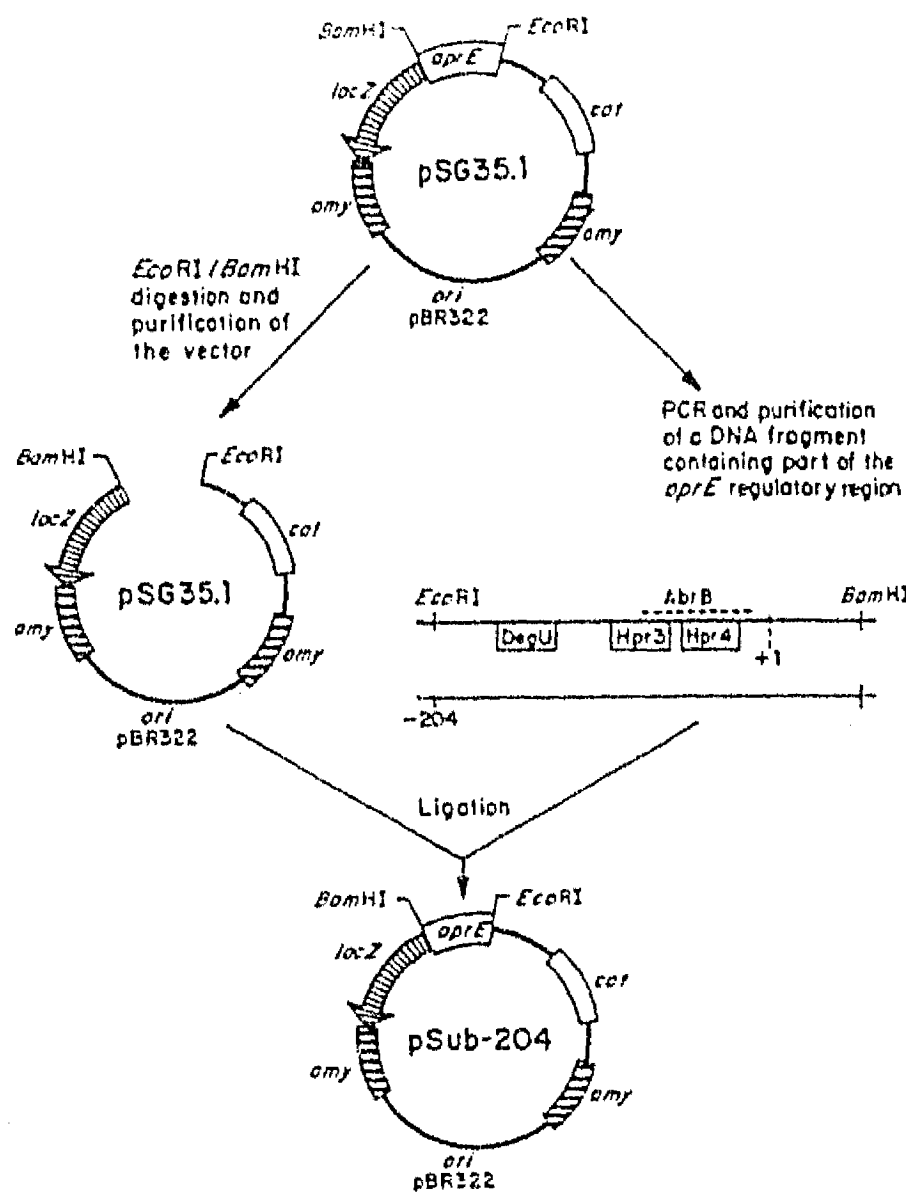


Fig. 1. Construction of plasmid pSub-204. Using PCR and synthetic oligonucleotides Sub1 and Sub2 (see section 2), a DNA fragment comprising part of the *aprE* regulatory region was obtained. It contains the putative DegU recognition site, two of the Hpr binding sites (Hpr3 and Hpr4) and the AbrB binding site previously located [17,3]. These sites as well as other relevant features of this DNA fragment are also indicated.

repression factor due to the *spo0A9V* mutation was similar (see Tables 2 and 3).

These data indicate that part of the negative effect of the *spo0A9V* mutation is due to the binding of SinR to the *aprE* regulatory region. However in a *degU32* background, a fully functional Spo0A is required for maximal expression.

Recently it has been reported that a mutation in *spo0A* gene codon 97, suppressed the sporulation defect caused by the

Table 1
Bacterial strains

Strain	Genotype or description	Source and/or Ref.
BB17	BB80 <i>degU32</i>	E. Ferrari
BB80	Δnpr <i>hisA</i> <i>glyB</i>	E. Ferrari
BB82	Δnpr <i>hisA</i> <i>hpr2</i>	E. Ferrari
BB809	BB80 <i>amy</i> (<i>aprE</i> : <i>lacZ</i>) <i>cat</i>	This work
BB810	BB82 <i>amy</i> (<i>aprE</i> : <i>lacZ</i>) <i>cat</i>	This work
BB811	BB809 <i>degU32</i>	This work
BB812	BB80 <i>amy</i> (<i>paprE</i> ₋₂₀₄ : <i>lacZ</i>) <i>cat</i>	This work
BB813	BB82 <i>amy</i> (<i>paprE</i> ₋₂₀₄ : <i>lacZ</i>) <i>cat</i>	This work
BB814	BB812 <i>degU32</i>	This work
JH13541	<i>spo0A9V</i> <i>phe</i>	J. Hoch
BB815	BB809 <i>spo0A9V</i>	This work
BB816	BB810 <i>spo0A9V</i>	This work
BB817	BB811 <i>spo0A9V</i>	This work
BB818	BB812 <i>spo0A9V</i>	This work
BB819	BB813 <i>spo0A9V</i>	This work
BB820	BB814 <i>spo0A9V</i>	This work

Table 2
 β -Galactosidase specific activity of the *PaprE::lacZ* fusion at T₂

	wt	<i>spo0A9V</i>	Ratio wt/ <i>spo0A9V</i>
wt	2,262	394	5.7
<i>hpr2</i>	10,500	2446	4.3
<i>degU32</i>	55,600	8835	6.3

spo0A9V mutation. This suppression was evident only in the presence of a mutation in the *spo0H* locus [24]. This result support the hypothesis that Spo0A interacts directly with the transcription machinery [7].

The fact that *spo0A9V* revertants required a mutation on *spo0H* is important because apparently δ^H transcribes a diverse group of genes that play important roles in the bacterium responses to nutrient depletion, and it is required to amplify the response initiated by Spo0A-P [25]. In this sense, it is known that a deletion of *spo0H* lowers *aprE::lacZ* expression approximately five-fold [26], the same value observed in the *spo0A9V* mutants.

Based on these, it is possible to speculate that in a *spo0A9V* mutant, some genes of the δ^H regulon that require a direct interaction between Spo0H and Spo0A-P. are not properly activated or repressed.

Finally, the data presented in this paper support the notion that in *B. subtilis*, the *aprE* gene can be expressed at different levels; one is obtained in wt strains under normal laboratory conditions, and is controlled by Spo0A mainly through the action of SinR. Another level is only obtained through the action of *degU32* mutation, and requires a fully functional Spo0A. This level of expression depends on an unidentified signal.

Acknowledgements: This work was supported by Grant IN205994 from the Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) UNAM.

References

- [1] Msadek, T., Kunst, F. and Rapoport, G. (1993) in: *Bacillus subtilis* and Other Gram-Positive Bacteria (J.A. Hoch and R. Losick eds.) pp. 729-745. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- [2] Burbulys, D., Trach, K.A. and Hoch, J.A. (1991) *Cell* 64, 545-552.
- [3] Strauch, M., Webb, V., Spiegelman, G. and Hoch, J.A. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 1801-1805.
- [4] Chibazakura, T., Kawamura, F. and Takahashi, H. (1991) *J. Bacteriol.* 173, 2625-2632.

Table 3
 β -Galactosidase specific activity of the *PaprE₋₂₀₄::lacZ* fusion at T₂

	wt	<i>spo0A9V</i>	Ratio wt/ <i>spo0A9V</i>
wt	1194	1024	1.1
<i>hpr2</i>	1273	972	1.3
<i>degU32</i>	23813	4353	5.5

- [5] Strauch, M.A., Spiegelman, G., Perego, M., Johnson, W., Burbulys, D. and Hoch, J.A. (1989) *EMBO J.* 8, 1615-1621.
- [6] Moran, C.P. (1991) *Res. Microbiol.* 142, 841-845.
- [7] Perego, M., Wu, J.J., Spiegelman, G. and Hoch, J.A. (1991) *Gene* 100, 207-212.
- [8] Valle, F. and Eugenio, F. (1989) in: *Regulation of Prokaryotic Development* (I. Smith, R.A. Slepecky and P. Setlow eds.) pp. 131-146, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- [9] Ferrari, E., Howard, S.M. and Hoch, J. (1986) *J. Bacteriol.* 166, 173-179.
- [10] Anagnostopoulos, C. and Spizizen, J. (1961) *J. Bacteriol.* 81, 741-746.
- [11] Schaeffer, P., Millet, J. and Aubert, J. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 54, 704-711.
- [12] Henner, D.J., Ferrari, E., Perego, M. and Hoch, J. (1988) *J. Bacteriol.* 170, 296-300.
- [13] Kallio, P.T., Fagelson, J.E., Hoch, J. and Strauch, M. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 13411-13417.
- [14] Kunst, F., Pascal, M., Lepesant-Kejzarova, J., Lepesant, J., Billault, A. and Dedonder, R. (1974) *Biochimie* 56, 1481-1489.
- [15] Kunst, F., Debarbouille, M., Msadek, T., Young, M., Mauel, C., Karamata, D., Klier, A., Rapoport, G. and Dedonder, R. (1988) *J. Bacteriol.* 170, 5093-5101.
- [16] Msadek, T., Kunst, F., Henner, D., Klier, A., Rapoport, G. and Dedonder, R. (1990) *J. Bacteriol.* 172, 824-834.
- [17] Ferrari, E. (1995) *Gene Expression in Bacilli*, US Patent No. 5387521.
- [18] Bai, U., Mandic-Mulec, I. and Smith, I. (1992) *Genet. Dev.* 7, 139-148.
- [19] Louie, P., Lee, A., Stansmore, K., Grant, R., Ginther, C. and Leighton, T. (1992) *J. Bacteriol.* 174, 3570-3576.
- [20] Mandic-Mulec, I., Gaur, N., Bai, U. and Smith, I. (1992) *Bacteriol.* 174, 3561-3569.
- [21] Gaur, N.K., Dubnau, E. and Smith, I. (1986) *J. Bacteriol.* 168, 860-869.
- [22] Gaur, N.K., Oppenheim, J. and Smith, I. (1991) *J. Bacteriol.* 173, 678-686.
- [23] Gaur, N.K., Cabane, K. and Smith, I. (1988) *J. Bacteriol.* 170, 1046-1053.
- [24] Bramucci, M., Green, B., Ambulos, N. and Youngman, P. (1995) *J. Bacteriol.* 177, 1630-1633.
- [25] Smith, I., Mandic-Mulec, I. and Gaur, N. (1991) *Res. Microbiol.* 142, 831-839.
- [26] Ferrari, E., Henner, D.J., Perego, M. and Hoch, J. (1988) *J. Bacteriol.* 170, 289-295.

"Lo único que me preocupa,
además del hambre de los niños, es
saber si estoy cumpliendo con
las expectativas que visionó
para mí, el ser que me puso
en este cuerpo, en este
espacio y en este tiempo"

JOS.....

CAPITULO 3

DISCUSIÓN

EFECTO DE LAS MUTACIONES *sinR* y *degU32*(Hy) SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GENE *aprE*

El gene *aprE* ha servido como modelo para tratar de entender los mecanismos fisiológicos y moleculares que controlan la expresión de los genes en el estado de transición, comprendido entre el final de la fase exponencial, el inicio de la fase estacionaria y/o de la esporulación en *B. subtilis*. Algunas de las proteínas reguladoras que controlan la expresión de *aprE* ya han sido identificadas, entre las más importantes se encuentran las proteínas *AbrB*, *Hpr*, *DegU*, *SinR*, *SpoOH* y *SpoOA*. Sin embargo, aunque se conoce cuales de ellos son reguladores positivos y cuales negativos, el mecanismo de regulación que ejercen estas proteínas sobre el gene *aprE* no está bien determinado. En este contexto, en el presente trabajo se desarrolló una serie de experimentos *in vivo*, con el objeto de entender mejor el papel de las proteínas *DegU*, *SinR* y *SpoOA* en la expresión del gene *aprE*, así como para tratar de determinar la relación entre el proceso de esporulación y la expresión de *aprE*.

Durante el análisis de la expresión de *aprE* identificamos que las mutaciones en *SINR*, creadas por la inserción de los genes que confieren resistencia a cloranfenicol y fleomicina (Tabla 1, manuscrito 1), disminuían en un 50% la sobreexpresión de la fusión transcripcional *aprE::lacZ* causada por las mutaciones *hpr2* y *degU32*(Hy). Además, los niveles de β -galactosidasa-subtilisina producidos en la cepa silvestre, fueron afectados de manera similar cuando la mutación *sinR* está presente (fig.2A). Estos resultados mostraban un comportamiento contradictorio a lo reportado para la proteína *SinR* (Gaur et al. 1986; 1988; 1991), por lo cual, para corroborarlos se midió directamente del medio de cultivo la actividad proteolítica de subtilisina en otro grupo de cepas, las cuales compartían la delección del gene *nprE*, que codifica para la proteasa neutra (*NprE*), la proteasa extracelular más importante después de subtilisina (fig.3A), lo que ocasionaba que la actividad proteolítica extracelular se debiera casi exclusivamente a subtilisina. Como conclusión obtuvimos que ambos grupos de cepas presentaron una disminución de aproximadamente el 50% en la síntesis de subtilisina cuando introducíamos la mutación *SINR* (fig.2A y 3A). Cabe señalar que en estos experimentos la cepa BB11 presentó un aumento en la síntesis de proteasas extracelulares produciendo el doble de actividad con respecto a la cepa silvestre, resultado que va de acuerdo con lo reportado (fig.3A) (Gaur et al. 1986). Para saber si el aumento en la síntesis de proteasas extracelulares en la mutante BB11 se debía al aumento en la síntesis de subtilisina, se construyó una cepa donde se deletaron las dos proteasas extracelulares mayoritarias (subtilisina y proteasa neutra) y se le introdujo la mutación *SINR*. Esta construcción fue hecha con la finalidad de demostrar que el aumento en la actividad de proteasas extracelulares en la cepa BB11 no fue debido al incremento en la síntesis de subtilisina, sino al incremento de una o más de las proteasas minoritarias que al parecer si son reprimidas por *SinR* (fig.3B).

Tomando en cuenta que SinR es una proteína reguladora que ejerce efecto positivo y negativo en la expresión de varios genes (Gaur et al. 1991), la primera hipótesis que surgió acerca del comportamiento presentado por las mutantes con el genotipo *sinR*, fue que SinR en vez de ser un represor de la expresión de *apRE* podría ser un coactivador. Sin embargo, Smith y colaboradores han descrito que SinR es un represor de varios de los genes que se expresan en el estadio II de la esporulación y de la síntesis de proteasas, en particular de subtilisina, ya que SinR se une fuerte y específicamente en un sitio que abarca la posición -263 a la -217 relativo al sitio de inicio de la transcripción del gene *apRE*; esta supuesta represión es apoyada por experimentos realizados *in vivo* donde una cepa de *B. subtilis* que lleva una delección que termina en la posición -244 de la región de regulación de *apRE* es insensible a la represión por SinR cuando esta proteína se encuentra sobreexpresada (Henner et al. 1988a). Estos resultados sugieren que el sitio de unión para SinR, en la región de regulación de *apRE*, es esencial *in vivo* para que esta proteína pueda ejercer su acción sobre la expresión de este gene. Hay que señalar que estos resultados solo se han determinado en condiciones de sobreexpresión.

Analizados los datos obtenidos de las mediciones de β -galactosidasa-subtilisina, proteasas y las funciones descritas para SinR, creemos que estos resultados podrían ser interpretados de dos maneras:

1) Está ampliamente reportado que la proteína SinR es un represor de algunos de los genes que se expresan en el estadio II. Esta represión tiene como principal objetivo prevenir la formación prematura de septo y por ende la formación de la espora (Mandic-Mulec et al. 1992; Louie et al. 1992). La ausencia de este circuito regulatorio en una mutante *sinR*, podría incrementar el tamaño de la subpoblación celular que completa el estadio II, el número de células que terminan la esporulación y, como consecuencia alterar el tiempo y el nivel de expresión de algunos de los genes y eventos que siguen a la formación de septo, tales como la actividad de fosfatasa alcalina y la aparición de esporas resistentes a calor. Además, alterando el tiempo en el cual se prenden o se apagan ciertos genes, la ausencia de SinR podría también afectar algunos de los eventos que preceden la formación de septo. Por ejemplo, si en una cepa silvestre la expresión de un gene dura de T_0 a T_2 , tiempo necesario para sobrepasar el efecto represivo de SinR y proceder al siguiente estadio, en ausencia de este represor, este período de tiempo puede ser más corto. Este es un factor importante para considerar cuando en una cepa silvestre la expresión de *apRE* termina alrededor de T_3 (fig.2A). Por lo tanto, creemos que por acortar el período de expresión de *apRE* se podría explicar el efecto negativo producido para este gene en las mutantes *sinR* (fig. 2B y 4).

2) Que SinR a niveles fisiológicos, no sea un represor del gene *apRE*, si no un coactivador.

Tratando de comprobar la primera hipótesis, se construyó un grupo de cepas en las cuales se analizaron varios marcadores celulares (subtilisina- β galactosidasa, fosfatasa alcalina y esporas resistentes a calor). De los resultados de estas mediciones se puede concluir lo siguiente:

A) Aunque las mutaciones *sinR* y *degU32(Hy)* alteran morfología celular, competencia y movilidad desde la fase exponencial, el tiempo en el cual se inicia la entrada a la fase de esporulación en estas células no se afectó (resultados no mostrados).

B) Asimismo, el tiempo en el cual se alcanzó la máxima producción de β -galactosidasa-subtilisina en las cepas construidas tampoco se alteró (fig. 2B, manuscrito. 1). Las dos observaciones anteriores indican que las mutaciones analizadas al parecer no afectaron el tiempo de entrada ni el del primer estadio de la esporulación.

C) Sin embargo, los resultados de fosfatasa alcalina y esporas resistentes a calor (fig. 4 y 5, manuscrito. 1) muestran que tanto con la mutación *sinR*, así como con la mutación *degU32(Hy)*, el período y el nivel de expresión de estos marcadores se vieron alterados drásticamente. Esta alteración en los tiempos de expresión, trajo como consecuencia que se suscitara un fenómeno de sobrelapamiento entre el período en el cual se produce subtilisina, con el de producción de fosfatasa alcalina. Este sobrelapamiento se presentó de una manera más marcada en las cepas con el genotipo *sinR* (fig. 2 y 4, manuscrito. 1), lo cual como se mencionó en la primera hipótesis, podría ser la causa principal de la disminución en la síntesis de subtilisina en las cepas con esta mutación. Esta idea puede explicar porque los resultados obtenidos con β -galactosidasa-subtilisina en las cepas con el genotipo *sinR*, presentaron una disminución en la actividad, y en parte también explica los resultados obtenidos con la cepa *degU32(Hy)* (fig. 2, manuscrito. 1). Esto último, porque la cepa *degU32(Hy)* a diferencia de las cepas *sinR*, inició la producción de fosfatasa alcalina una hora después de que se alcanzó la máxima producción de β -galactosidasa-subtilisina (fig. 2B y 4, manuscrito. 1), lo cual podría dar tiempo suficiente para sintetizar subtilisina de manera normal. Sin embargo, esta idea no explica porque la mutación *degU32(Hy)* adelantó los tiempos de expresión de manera similar a como lo hizo la mutación *sinR*. Una hipótesis para explicar los cambios en los tiempos y los niveles de expresión de los marcadores analizados en la cepa *degU32(Hy)*, es que esta mutación al parecer induce un fenómeno de sincronización en una subpoblación celular (fig. 4 y 5). Algunos efectos comparables de sincronización han sido reportados (Chung et al. 1994, Ireton and Grosman, 1992). Esta idea no es tan extraña si recordamos que esta proteína pertenece a una familia de proteínas llamada de dos componentes, las cuales son reguladas por señales metabólicas, ambientales y/o de densidad celular (Albright et al. 1989, Msadek et al. 1990). Por lo tanto pensamos que la mutación *degU32(Hy)* pudo inducir el inicio de la esporulación en forma sincronizada, afectando la relación de estas señales y/o alterando el umbral de las células para responder a ellas, y como consecuencia produjo

un aumento en la síntesis de subtilisina y fosfatasa alcalina.

Adicionalmente, aunque está reportado que la mutación *degU32(Hy)* incrementa la frecuencia de transcripción del gene *aprE* (Henner et al. 1988b), no está claramente demostrado cual es el mecanismo de activación que utiliza. Como ya se mencionó, en los experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* no se ha encontrado el sitio de unión de esta proteína en la región reguladora de *aprE*. Tampoco ha sido establecido si la proteína DegU actúa indirectamente a través de otra proteína accesoria sobre *aprE* ó a través de la inducción de un cambio conformacional en la estructura del DNA. También se desconoce como actúa DegU sobre la expresión de fosfatasa alcalina, cabe mencionar que a la fecha no existe ningún reporte donde se mencione que DegU regula la expresión o actividad de fosfatasa alcalina. Por los motivos mencionados anteriormente, creemos que es factible la idea de que si más células por unidad de tiempo inician el proceso de esporulación en forma sincronizada, el aumento en la síntesis de subtilisina y fosfatasa alcalina pueden parecer como un aumento en la frecuencia de transcripción. Además, tomando en cuenta la pleiotropicidad que ocasiona esta mutación, es posible que la alteración en la síntesis de estos marcadores sea una combinación de varios de los factores antes mencionados.

Por todo lo anterior, se podría decir que la expresión de *aprE* está acoplada a un proceso de desarrollo en el cual, la magnitud y el tiempo de respuesta de cada uno de los eventos es monitoreado y controlado constantemente. Por tal motivo, es razonable esperar que algunos de los efectos causados por mutaciones en los reguladores del estado de transición, alteren la expresión de subtilisina, fosfatasa alcalina y esporas resistentes a calor, de manera indirecta al alterar el proceso de esporulación. En este sentido, a la fecha no se ha descrito ninguna mutación en los reguladores del estado de transición que afecte únicamente la expresión de *aprE*. Asimismo, hay que enfatizar que algunas de las mutaciones estudiadas afectaron el proceso de esporulación, modificando el tiempo é incrementando la fracción de células capaces de formar esporas resistentes a calor.

Estos resultados sugieren que en *B. subtilis* existe un mecanismo que controla el porcentaje de células que van a formar espora, mientras otros miembros de la población desarrollan otras actividades (fig. 4 y 5). Tal mecanismo puede asegurar que, en un ambiente adverso, parte de la población forme esporas para asegurar su sobrevivencia, mientras la otra parte puede reiniciar el crecimiento exponencial, tan pronto y como las condiciones se tornen apropiadas. Finalmente, pareciera que un cultivo de *B. subtilis* se comporta como una sociedad microbiana bien programada, donde hay una división en los papeles que desempeñan ciertas subpoblaciones celulares, lo cual haría más factible la permanencia de este microorganismo en su entorno ecológico.

Por otra parte, aunque los resultados obtenidos apoyan la primera hipótesis, no podemos descartar la segunda, la cual como ya se mencionó, trata la posibilidad de que SinR en vez de actuar como represor actue como coactivador en la expresión de *aprE*. Por lo tanto, se tiene contemplado trabajar más sobre esta idea.

EFECTO DE LA MUTACIÓN *spoOA9V* SOBRE LA EXPRESIÓN DE SUBTILISINA

La iniciación de la esporulación en *B. subtilis* está bajo el control del factor transcripcional SpoOA. La mayoría de las mutantes *spoOA* no pueden iniciar el proceso de esporulación, ni eventos como la síntesis de subtilisina. Sin embargo, el producto de la mutación *spoOA9V*, una de las mutaciones *spoOA* caracterizadas, se distingue de las demás porque puede reprimir la expresión de *abrB* y, por ende, iniciar al parecer de manera eficiente el proceso de esporulación. Por otra parte, esta mutación no puede activar la transcripción del operón *spoIIA* el cual está encargado de dar inicio a la formación de septo y como consecuencia, de producir una spora madura (Moran 1991).

En este trabajo, se estudió en diferentes fondos genéticos el efecto de la mutación *spoOA9V* en la expresión del gene *apre*. Para tal propósito, se construyeron las cepas de *B. subtilis* descritas en la Tabla 1, manuscrito 2. La fusión *apre::lacZ* se utilizó en todas las cepas para determinar la expresión de *apre* y, como se puede observar en la Tabla 2 del manuscrito 2, la mutación *spoOA9V* provocó una disminución de la síntesis de β -galactosidasa-subtilisina de aproximadamente 5 veces en todos los fondos genéticos analizados. Más adelante, se demostró que en la cepa silvestre y en la *hpr2*, este efecto se debía únicamente a la regulación ineficiente que estaba ejerciendo la proteína SpoOA9V, sobre el operón *sinRI* lo cual estaba provocando un aumento en la concentración de la proteína SinR, que según lo reportado, provoca una represión de la expresión de *apre* (Gaur 1991). Lo anterior se confirmó utilizando una región de regulación de *apre* deletada hasta la base -204, la cual elimina el sitio de unión de SinR (fig.1, manuscrito 2) y restaura el 100% de la expresión de *apre* en ambas cepas (Tabla 3, manuscrito 2).

Hay otros aspectos que se pueden concluir como resultado de este trabajo además de lo discutido en el manuscrito 2. Uno de ellos, es que a pesar de que la región reguladora de *apre* cuenta con dos secuencias consenso perfectas para la unión de la proteína SpoOA (fig.1, manuscrito 1), estos sitios parecieran no ser funcionales, ni tampoco que esta proteína actúe directamente con el complejo transcripcional. Lo anterior se deduce porque en la cepa silvestre y/o en la *hpr2* en combinación con la delección -204 y la mutación *spoOA9V*, en las cuales se elimina la represión por SinR, la expresión de *apre* se restaura completamente como si la mutación *spoOA9V* no existiera (Tabla 3, manuscrito. 2). Lo anterior no considera el 50% de disminución que ocurre en la expresión de *apre* cuando se elimina con la delección -204, el sitio de unión de SinR (Tabla 3, manuscrito 2). Estos resultados indican que en las condiciones analizadas, la proteína SpoOA9V no pareciera estar llevando a cabo ningún efecto directo sobre la expresión de *apre*, en la cepa silvestre ni en la *hpr2*. Sin embargo, este no es el caso para la cepa con las mutaciones *spoOA9V/degU32* (Hy) y la delección -204, la cual sigue presentando el efecto negativo en la síntesis de β -galactosidasa-subtilisina causado por la mutación *spoOA9V*, aun cuando se hayan eliminado

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

con la delección, el efecto represivo causado por SinR y los probables sitios de unión para la proteína SpoOA9V en la región de regulación de *aprE* (Tabla 3, manuscrito. 2). De estos resultados se podría especular lo siguiente: a) que SpoOA y DegU32(Hy) pudieran estar interactuando y como consecuencia de una interacción deficiente, por efecto de la mutación *spoOA9V*, esto trajera como resultado la disminución en la expresión de *aprE*. Este efecto puede ser visualizado con la mutante DegU32(Hy), pero no con la proteína DegU silvestre, b) que SpoOA9V, como se mencionó en el manuscrito, estuviera afectando los niveles normales de algún otro activador transcripcional como SigH, el cual pudiera estar interactuando directa o indirectamente con el complejo transcripcional y esto resultara en la disminución de la síntesis de subtilisina, c) que SpoOA regulara directa o indirectamente la expresión de *degU*.

CONCLUSIONES

Del análisis de los resultados obtenidos con las mutaciones estudiadas se pueden concluir varios puntos importantes:

- 1.- SinR evita el acortamiento del período de síntesis de subtilisina, previniendo la expresión temprana de los genes *spoII* y/o la septación. Para esto, es indiferente que se encuentre presente ó no su sitio de unión a *apRE*.
- 2.- A concentraciones fisiológicas normales, SinR es indispensable para obtener la máxima expresión de *apRE*, necesitando para esto su sitio de unión en la región de regulación de este gene.
- 3.- A concentraciones fisiológicas anormales (sobreexpresión), SinR actúa como un represor al parecer de manera directa, ya que cuando se elimina su sitio de unión, esta represión se abate.
- 4.- La mutación *sinR* además de alterar el período y los niveles de expresión de subtilisina, fosfatasa alcalina y esporas resistentes a calor, también altera la expresión de una proteasa minoritaria que no ha sido identificada.
- 5.- La mutación *degU32*(Hy) induce un fenómeno de sincronización en una subpoblación celular, lo cual produce como consecuencia la alteración de los períodos y los niveles de expresión de fosfatasa alcalina y esporas resistentes a calor de manera similar a como lo hace la mutación *sinR*. Es posible que esta sincronización sea la responsable del aumento en la síntesis de subtilisina; sin embargo, hay que realizar otros experimentos para demostrar esto.
- 6.- La proteína *SpoOA9V* disminuye la síntesis de subtilisina en la cepa silvestre y en la cepa con la mutación *hpr2*, por alterar al parecer la regulación del operón *sinRI*.
- 7.- Con una delección de la región de regulación de *apRE* que llega hasta la base -204 y que elimina el sitio de unión de SinR, se demostró que la proteína *SpoOA*, al menos en las condiciones analizadas, no actúa directamente sobre la región de regulación ni el complejo transcripcional de este gene.
- 8.- Las proteínas *SpoOA* y *DegU32*(Hy) interactúan de alguna manera en la expresión de *apRE*.

Han transcurrido más de 10 años desde que se inició el estudio de la regulación de la expresión del gene *apRE*, lo que ha permitido reunir una gran cantidad de información acerca de los mecanismos que gobiernan su regulación. Sin embargo, los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que todavía falta

mucho por hacer para poder entender los complejos mecanismos que regulan la expresión del gene *aprE* en *B. subtilis*. En este sentido a continuación se mencionan algunos de los trabajos que se podrían realizar.

PERSPECTIVAS

1.- Tomando en cuenta que a concentraciones fisiológicas, SinR es indispensable para obtener la máxima expresión de *aprE* y, que para esto necesita su sitio de unión en la región de regulación de este gene, queda por determinar si SinR actúa como activador o co-activador en la expresión de *aprE*.

2.- Dado que las mutaciones en los reguladores del estado de transición permiten sobreexpresar subtilisina y, a su vez, ocasionan varios efectos pleiotrópicos, se buscarán mutaciones en la región de regulación que nos permitan, si es posible, sobreexpresar subtilisina sin utilizar las mutaciones antes mencionadas.

3.- Según resultados preliminares de experimentos de "footprinting" *in vivo*, desarrollados durante el doctorado, el sitio de unión de SinR determinado por "footprinting" *in vitro* en la región de regulación de *aprE*, se encuentra igualmente protegido en la mutante *sinR* que en la *hpr2* durante las primeras horas de la esporulación. Lo anterior, sugiere la interacción de otra proteína en esa región. En este sentido, se podría determinar que proteína es la que está llevando a cabo esta protección y cual es la función que desempeña en la expresión de *aprE*.

4.- Establecer que tipo de interacción existe entre las proteínas SpoOA y DegU32(Hy) en la regulación de *aprE*.

5.- Establecer que tipo de interacción existe entre las proteínas SpoOA y SigH en la regulación de *aprE*.

6.- Determinar, porque con la delección -204 y la mutación *hpr2* no hay sobreexpresión de *aprE*.

REFERENCIAS

Albright ML, Huala E, Ausubel MF (1989) Prokaryotic signal transduction mediated by sensor and regulator protein pairs. *Annu Rev Genet* 23:311-336

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. *Genes and Dev* 7:139-148

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

Burbulys D, Trach KA, Hoch JA (1991) Initiation of sporulation in *Bacillus subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* 64:545-552

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

Chung DJ, Stephanopoulos G, Ireton K, Grossman DA (1994) Gene expression in single cells of *Bacillus subtilis*: Evidence that a threshold mechanism controls the initiation of sporulation. *J Bacteriol* 176:1977-1984

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

Dahl MK, Msadek 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

Debabov VG (1982) The industrial use of bacilli. In: Dubnau DA (ed) *The molecular biology of the bacilli*, vol 1. Academic Press, New York. pp 331-370

Dunn G, Jeffs P, Mann H, Torgersen DM, Young M (1978) The relationship between DNA replication and the induction of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* 108:189-195

Ferrari E, Jarnagin 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 HS, Sonenshein AL, Tipper DJ (eds) *In sporulation and germination*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp 1-12

Gaur NK, 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 a cloned *Bacillus subtilis* gene that inhibits sporulation in multiple 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

Grossman AD (1991) Integration of developmental signal and the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Cell* 65:5-8

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

Harwood CR (1989). Introduction to the biotechnology of *Bacillus*. In: Harwood CR (ed) *Bacillus*, biotechnology handbooks, vol. 2, Plenum Press, New York., pp 1-4

Harwood CR (1992) *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *TIBTECH* 10:247-256

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

Hitchins AD, Slepecky RA (1969) Bacterial spore formation as a modified prokaryotic cell division. *Nature* 223:804-807

Ireton K, Grossman DA (1992) Interactions among mutations that cause altered timing of gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 174:3185-3195

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

Jacobs MF (1995) Expression of the subtilisin Carlsberg-encoding gene in *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis*. *Gene* 152:69-74

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

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 PJ, Moran CP, Youngman P (eds) *Regulation of bacterial differentiation*. American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp 1-20

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

López JM, Marks LL, Freese E (1979) The decrease of guanine nucleotides initiates sporulation of *Bacillus subtilis*. *Biochem Biophys Acta* 587:238-252

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

Moran CP (1991) Expression of stage II genes during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Res Microbiol* 142:841-845

Msadek T, Kunst F, Henner D, Klier A, Rapoport G, Dedonder 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 *degS* 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* 173:2366-2377

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 (1993) Secretion of streptavidin from *Bacillus subtilis*. *Applied Environmental Microbiol* 59:3894-3898

Olmos SJ, Bolaños V, Causey S, Ferrari E, Bolivar F, Valle F (1996) A functional SpoOA is required for maximal *aprE* expression in *Bacillus subtilis*. *FEBS* in press.

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

Perego M, Wu J, Spiegelman GB, Hoch JA (1991) Mutational dissociation of the positive and negative regulatory properties of the SpoOA sporulation transcription factor of *Bacillus subtilis*. *Gene* 100:207-212

Pierce AJ (1992) Engineered *Bacillus subtilis*-based subtilisin production systems: Physiological, genetic and morphological consideration. Ph.D. Thesis, pp 10-11

Priest FG (1989) Products and applications. In: Harwood CR (ed) *Bacillus*, biotechnology handbooks, vol. 2. Plenum Press, New York. pp 293-322

Priest GF (1993) Systematics and ecology of *Bacillus*. 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 3-16

Satola SW, Baldus JM, Moran CP (1992) Binding of SpoOA stimulates *spoIIG* promoter activity in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 174:1448-1453

Satola SW, Kirchman PA, Moran CP (1991) SpoOA binds to a promoter used by sigma A RNA polymerase during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:4533-4537

Setlow P (1993) Spore structural proteins. 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 801-809

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

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

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

Stock JB, Ninfa AJ, Stock AM (1989) Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev* 53:450-490

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

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

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

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

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

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

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

Wang LF, Wong SL, Lee SG, Kalyan N, Hung PP, Hilliker S, Doi RH (1988) Expression and secretion of human atrial natriuretic α -factor in *Bacillus subtilis* using the subtilisin signal peptide. *Gene* 69:39-47

Wong SL (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, Kawamura F, Yoshikawa H (1989) Dissection of the expression signals of the *spoOA* gene of *Bacillus subtilis*: glucose sporulation-specific expression. *J Gen Microbiol* 135:1335-1345

York K, Kenney TJ, Satola S (1992) SpoOA controls the sigA-dependent activation of *Bacillus subtilis* sporulation-specific transcription unit *spoIIIE*. *J Bacteriol* 174:2648-2658

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