



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

EVALUACIÓN DEL PAPEL DE Spo0B COMO FACTOR LIMITANTE EN EL PROCESAMIENTO DE INFORMACIÓN Y TOMA DE DECISIONES EN EL SISTEMA DE ESPORULACIÓN DE *Bacillus subtilis*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Lic. Nori Castañeda Gómez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Dr. Mario Soberón Chávez
[Instituto de Biotecnología, UNAM](#)

Cuernavaca, Morelos. Julio 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó bajo la asesoría de la Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos, el apoyo durante el diseño experimental del proyecto de la Dra. Diana X. Sahonero Canavesi en el Laboratorio de Genómica Computacional adscrito al Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México campus Morelos y con el apoyo económico brindado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) correspondiente al CVU 779313 bajo el programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas. Además, se realiza un amplio reconocimiento al Programa de Apoyo a los Estudiantes del Posgrado (PAEP) por permitir mi asistencia a un curso gracias al apoyo monetario otorgado. Agradezco al proyecto 2015-02-887 Conacyt Fronteras de la Ciencia y al proyecto PAPIIT: IN202118.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis a mis padres, Francisco Javier Castañeda Bahena y Norma Gómez Landa, por todas sus enseñanzas y apoyo, y por siempre creer en mí plenamente y en lo que puedo lograr.

A mi hermano, Francisco Castañeda Gómez, que me impulsa siempre a dar lo mejor de mí y a ser mejor persona. Por nuestro amor apache que sólo los dos entendemos y por tener un corazón tan puro.

A mis abuelitos, por sus grandes enseñanzas a lo largo de estos años y por su cuidado. Por promover la paz y el amor dentro de la familia.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Rosa María Gutiérrez Ríos** por su guía y empeño continuos. También me gustaría agradecer por la confianza brindada y el apoyo incondicional dado.

A la **Dra. Diana Ximena Sahonero Canavesi** por la herencia de sus enseñanzas, en especial a nivel experimental. Por tu amistad y apoyo incondicionales, por la chispa que siempre te ha caracterizado y por el impulso y confianza que has mostrado hacia mí desde siempre.

Al **Dr. Enrique Merino Pérez** por su interés en el crecimiento continuo de los miembros del laboratorio.

A **M. B. María Luisa Tabche Barrera**, por su gran trabajo para que tengamos el material necesario para trabajar, por la enseñanza de buenas prácticas y por sus consejos experimentales y de vida.

Al **Dr. Raúl Noguéz**, por su amplia disposición para apoyarme con teoría experimental y por su amistad.

A mis amigos y compañeros del laboratorio, por su apoyo y compañía en los tiempos felices y en los difíciles, en especial a **Nataly y Diana Barceló**. Por brindarme un ambiente muy cálido, respetuoso, ordenado y lleno de buenas prácticas para trabajar. También quiero agradecer por todas las sugerencias y consejos teóricos brindados durante la realización de este trabajo.

A los miembros de mi comité tutor **Dr. Mario Soberón Chávez** y **Dr. Víctor H. Bustamante Santillán** por el enriquecimiento del presente trabajo con sus valiosas opiniones y correcciones y por la frecuente motivación dada.

Al **Dr. Rafael Peña Miller** y **J. Carlos R. Hernández** por la colaboración y enseñanzas durante el desarrollo de la técnica de microfluídica.

A la **Dra. Yvonne Jane Rosenstein**, al **Dr. Ángel Francisco Flores Alcantar**, a **M. en C. Esmeralda Soriano** y al **grupo Galindo** por asesoría técnica y préstamo de equipos.

A **Rosalva González**, por su disposición, amabilidad y por su gran trabajo administrativo.

A los miembros de docencia **Antonio Guillén** y **Gloria Villa** por su continua disposición y amabilidad durante la realización de múltiples trámites.

A los miembros de mi jurado de titulación, gracias por sus aportes, sugerencias y por el tiempo invertido en la revisión de esta tesis.

A mis dos mejores amigos, **Ángel Santiago (Chavo)** y **Alejandro Román** por su incomparable amistad y por el hecho de que más que amigos, son mis hermanos.

A mis amigos **Andi, Gaby, Diana Hernández, Ricardo** y **Luigui** por sus múltiples consejos, apoyo y por los momentos divertidos que hemos pasado juntos.

A mis cariños, **Lambda, Kira** y **Puchis** por alegrar mis días y darme mucho amor.

A todos los amigos y familiares que me acompañaron en esta travesía.

CONTENIDO

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
INDICE DE FIGURAS.....	6
INDICE DE TABLAS.....	8
TABLA DE ABREVIATURAS	9
RESUMEN.....	10
ABSTRACT	12
I. INTRODUCCIÓN.....	13
Procesamiento de la información en sistemas biológicos.....	13
Sistemas de transducción de señales en bacterias.....	13
Diferenciación celular en sistemas biológicos.....	15
II. ANTECEDENTES.....	16
Bacillus subtilis como modelo de estudio	16
<i>Bacillus subtilis</i> y la heterogeneidad del comportamiento	17
Los reguladores globales influyen la diferenciación celular en <i>B. subtilis</i>	17
Esporulación en <i>B. subtilis</i>	19
Fosforrelevo del inicio de la esporulación de <i>B. subtilis</i>	19
Formación de la endoespora	20
Evaluación de la fuente de la estocasticidad del inicio de la esporulación.....	22
Comportamiento bimodal durante el proceso de esporulación.....	22
Spo0B como paso limitante en el flujo de fosfato dentro del fosforrelevo.....	22
III. HIPÓTESIS.....	28
IV. OBJETIVOS.....	28
V. MATERIALES Y METODOLOGÍA	29
5.1 Construcción de un sistema que permita la modulación del gen spo0B	29
5.1.1 Construcción de la cepa Δ spo0B.....	29
5.1.2 Modulación de los niveles de expresión de <i>spo0B</i> y de otros componentes del fosforrelevo.....	31
5.1.3 Construcción de reporteros fluorescentes para el seguimiento del proceso de esporulación	32
5.2 Evaluación de la dinámica de esporulación.....	33
5.2.1 Protocolo de esporulación en cultivo líquido	33
5.2.2 Análisis de las muestras	33

5.2.3	Protocolo de esporulación acoplado a microfluídica.....	36
VI.	DISCUSIÓN Y RESULTADOS.....	38
6.1	Construcción de un sistema que permita la modulación del gen <i>spo0B</i>	38
6.1.1	Construcción y evaluación de la capacidad de esporulación de la cepa $\Delta spo0B$	39
6.1.2	Modulación de los niveles de expresión de <i>spo0B</i> y de otros componentes del fosforrelevo.....	44
6.1.3	Integración de reporteros fluorescentes en <i>B. subtilis</i>	47
6.2	Evaluación de la capacidad de esporulación en <i>B. subtilis</i>	51
6.2.1	Inducción de la esporulación en <i>B. subtilis</i> WT	52
6.2.2	Inducción de la esporulación en <i>B. subtilis</i> de la cepa $\Delta spo0B/P_{Hy}spo0B::amyE/P_{spoIIQ^-}GFP::sacA/P_{spoIIA^-}DsRed::lacA$	53
6.2.3	Ausencia de esporulación en la cepa $\Delta spo0B/P_{Hy}spo0B::amyE/P_{spoIIQ^-}GFP::sacA/P_{spoIIA^-}DsRed::lacA$ durante la inducción con IPTG	61
7	CONCLUSIONES	67
8	PERSPECTIVAS	67
9	BIBLIOGRAFÍA.....	69
10	APÉNDICE.....	73
10.1	Técnicas moleculares frecuentemente utilizadas durante este trabajo	73
10.1.1	Extracción de DNA genómico de <i>B. subtilis</i>	73
10.1.2	Extracción de DNA plasmídico utilizando perclorato de sodio.....	74
10.1.3	PCR en colonia.....	74
10.1.4	Precipitación de DNA con butanol.....	75
10.2	Plásmidos y oligonucleótidos utilizados.....	76
10.2.1	Tabla de oligonucleótidos utilizados en este trabajo	76
10.2.1	Tabla de plásmidos utilizados en este trabajo.....	77
10.3	Técnicas microbiológicas frecuentemente utilizadas en este trabajo	78
10.3.1	Preparación de células competentes de <i>E. coli</i>	78
10.3.2	Protocolo de transformación de <i>E. coli</i>	78
10.3.3	Protocolo de transformación mediante inducción de competencia natural en <i>B. subtilis</i>	78
10.3.4	Protocolo de inducción de la esporulación de <i>B. subtilis</i>	79
10.3.5	Tinción de esporas con verde de malaquita	80
10.4	Medios y soluciones	81
10.4.1	Transformación por inducción de competencia natural en <i>B. subtilis</i>	81
10.4.2	Inducción de la esporulación en <i>B. subtilis</i>	82

INDICE DE FIGURAS

Número de figura	Página
Figura 1. Organización de un sistema de dos componentes prototípico y un sistema fosforrelevo en bacterias.....	14
Figura 2. Representación esquemática de los distintos tipos celulares que se diferencian en comunidades de <i>Bacillus subtilis</i>	18
Figura 3. Esquema del fosforrelevo que inicia la esporulación en <i>B. subtilis</i>	20
Figura 4. Ciclo de esporulación de <i>Bacillus subtilis</i>	21
Figura 5. Modelo del módulo de señalización de esporulación.....	23
Figura 6. Simulación del tiempo antes de esporular como función de la variación de la concentración de Spo0B.....	24
Figura 7. Esquema del empalme de los fragmentos para la construcción de la fusión 0BU _p _spec_Dw.....	30
Figura 8. Esquema del vector pDR111_GFP(Sp) utilizado para clonar los genes del fosforrelevo y modular su expresión.....	31
Figura 9. Esquema del protocolo de esporulación utilizando los medios CH y SM.....	34
Figura 10. Diagrama de una cámara de Neubauer.....	35
Figura 11. Diagrama de un chip tipo quimiostato.....	36
Figura 12. Esquema del efecto de la direccionalidad de los sitios <i>loxP</i> en el sistema de recombinación Cre-Lox.....	39
Figura 13. Esquema del flujo de las modificaciones genéticas realizadas en el locus del operón <i>spo0B-obgE</i>	40
Figura 14. PCR de comprobación del reemplazo de <i>spo0B</i> por casete de resistencia a espectinomicina.....	40
Figura 15. PCR de comprobación de la escisión del casete de espectinomicina utilizando la técnica de recombinación Cre-lox.....	41
Figura 16a. Tinción de células $\Delta spo0B$ durante inducción de la esporulación en tiempo 0 y 5 posteriormente a la resuspensión en medio SM.....	43
Figura 16b. Morfología de una célula que esporula.....	44
Figura 17. Plásmidos construidos para la inducción de la expresión de genes del fosforrelevo.....	46
Figura 18. Comprobación de las clonas $\Delta spo0B/P_{Hy}-spo0B::amyE$	46
Figura 19. Comprobación de clonas $P_{Hy}-spo0F::amyE$ y $P_{Hy}-kinA::amyE$...	47
Figura 20. Representación de los reporteros $P_{spoIIA}-DsRed$ y $P_{spoIIQ}-GFP$...	48
Figura 21. Comprobación de la integración del vector $P_{spoIIQ}-GFP_pSac-Cm$	48
Figura 22. Características del vector pBS2E-RFP.....	50
Figura 23. Comprobación de la integración de $P_{spoIIA}-DsRed-pBS2E$ en el locus <i>lacA</i>	51
Figura 24. Comprobación de la integración de $P_{spoIIA}-DsRed-pBS2E$ en el locus <i>lacA</i>	51

Figura 25. Proporción de células WT que forman septos asimétricos a lo largo del tiempo en medio SM.....	53
Figura 26. Expresión dinámica de <i>spo0B</i>	54
Figura 27. Circuitos de regulación que controlan la producción y activación de Spo0A.....	56
Figura 28. Chip tipo <i>mother machine</i>	57
Figura 29. Línea del tiempo del experimento de microfluídica.....	59
Figura 30. Representación de pulsos de inducción con distintas concentraciones de IPTG.....	59
Figura 31. Mecanismos que generan defectos celulares durante la sobreexpresión de una proteína.....	64
Figura 32. Modelo de inhibición de fenotipo mediante subunidades compartidas de dos complejos distintos.....	64

INDICE DE TABLAS

Número de tabla	Página
Tabla 1. Ejemplos de parámetros utilizados en el modelo.....	26
Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de la fusión 0BUp_spec_Dw.....	30
Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la clonación de los genes del fosforrelevo.....	31
Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de la fusión PspollQ-GFP.....	32
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de la fusión PspollA_DsRed.....	32
Tabla 6. Características morfológicas diferenciales entre la cepa $\Delta spo0B$ y la cepa WT.....	42
Tabla 7. Promedio de porcentajes de esporulación en la cepa WT en medio SM.....	52
Tabla 8. Aumentos en la concentración de los componentes del fosforrelevo durante la inducción de la esporulación en medio SM.....	55
Tabla 9. Promedio de porcentajes de esporulación en las cepas WT y P _{Hy} spo0B en medio SM.....	60
Tabla 10. Inducción masiva de la esporulación mediante la sobreexpresión sutil de KinA en medio LB.....	65
Tabla S1. Oligonucleótidos utilizados durante este trabajo.....	76
Tabla S2. Plásmidos utilizados durante este trabajo.....	77
Tabla S3. Componentes de las sales de <i>Bacillus</i> 10X.....	81
Tabla S4. Componentes de los medios TF1 y TF2.....	81
Tabla S5. Componentes de la preparación del medio CHI+II.....	82
Tabla S6. Componentes de la preparación de 100 ml de medio CH III..	82
Tabla S7. Componentes de la preparación de la solución A.....	83
Tabla S8. Componentes de la preparación de la solución B.....	83
Tabla S9. Componentes de la preparación de los medios CH y SM.....	84

TABLA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
μg	Microgramo
μl	Microlitro
ATP	Adenosín trifosfato
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BGSC	Bacillus Genetic Stock Center
cAAs	Casaminoácidos
CH	Medio rico utilizado durante protocolo de esporulación
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DegU~P	DegU en su versión fosforilada
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido
KinA~P	KinA en su forma fosforilada
LB	Luria-Bertani
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mQ	Mili Q
ng	Nanogramo
O.N.	<i>Over Night</i>
pb	Pares de bases
PBS	Amortiguador fosfato salino
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SM	Medio mínimo sintético de resuspensión utilizado durante protocolo de esporulación
Spo0A~P	Spo0A en su forma fosforilada
Spo0F~P	Spo0F en su forma fosforilada
T.A.	Temperatura ambiente
TCS	Sistema de dos componentes
UFC	Unidades formadoras de colonias
WT	Cepa silvestre

RESUMEN

Es común observar que cuando una población bacteriana isogénica es estimulada en un ambiente homogéneo por una determinada señal, las células individuales de esta población no se comportan de la misma manera. Este comportamiento heterogéneo es de cierta forma evidente en procariotes capaces de diferenciarse, tales como la bacteria formadora de esporas *Bacillus subtilis*.

Se ha demostrado que cuando una población de *B. subtilis* es inducida para la formación de esporas, inicialmente solo una pequeña proporción elige este destino dentro de otras posibilidades de diferenciación que *B. subtilis* tales como célula mótil o célula caníbal, como ejemplos. La heterogeneidad del inicio de la esporulación en *B. subtilis* ha sido modelo de estudio de la toma de decisiones en sistemas biológicos por años. A pesar de ello, aún es pobremente entendido cómo es que una célula elige qué destino celular seguir.

La cascada que controla el inicio de la esporulación en *B. subtilis* es una versión más compleja de un sistema de dos componentes, denominado fosforrelevo. La mayoría de los componentes de este fosforrelevo y otros aspectos relacionados tales como sus circuitos de regulación, han sido evaluados experimentalmente para estudiar su papel como agentes que determinan que el regulador maestro Spo0A alcance el nivel de activación apropiado para iniciar el proceso de esporulación en una célula. En estudios previos realizados por otros grupos de trabajo, se ha denotado al fosforrelevo como el sistema que principalmente produce el ruido que dirige el comportamiento estocástico del inicio de la esporulación, sin señalar a ningún elemento específico como el responsable. Por otro lado, en comparación con el resto de los componentes del fosforrelevo, la fosfotransferasa Spo0B ha recibido poca atención. Análisis bioinformáticos realizados en nuestro laboratorio, así como características específicas de *spo0B*/Spo0B descubiertas experimentalmente en otros grupos de trabajo, apoyan su papel como un factor limitante para la fosforilación de Spo0A.

El principal objetivo de este trabajo fue construir un sistema que permita evaluar si la expresión de *spo0B* controla la proporción de células que inician el proceso de esporulación en una población. Para ello, los genes *spo0B*, *kinA*, y *spo0F* fueron clonados bajo el promotor inducible con IPTG, $P_{\text{hyperspank}}$, e insertados en el genoma de *B. subtilis* en cepas separadas. Debido a los bajos niveles de expresión de *spo0B* en comparación con otros componentes del fosforrelevo, el gen fue escindido de su locus nativo para evitar la expresión de fondo en la cepa $P_{\text{hyperspank}}\text{-spo0B::amyE}$. Adicionalmente, los genes reporteros $P_{\text{spoilQ}}\text{-GFP}$ (esporulación tardía) y $P_{\text{spoilA}}\text{-DsRed}$ (esporulación temprana), se insertaron en cada una de estas tres cepas.

El análisis de la cepa $\Delta\text{spo0B } P_{\text{hyperspank}}\text{-spo0B::amyE}$ muestra que previamente a la inducción con IPTG, las células expresan al gen *spo0B*. Esta característica no es adecuada para un sistema en el que la concentración de un gen es excepcionalmente baja de forma nativa dentro de la célula, como es *spo0B*. Por ello, en este trabajo se sugieren opciones para abordar las dificultades presentadas respecto al control de la expresión de *spo0B*. Adicionalmente, al inducir la expresión de Spo0B incluso en concentraciones bajas, no se forman esporas en la población, por lo que se sugieren experimentos posteriores para el

análisis de este efecto. Finalmente, este trabajo permitió montar diversas técnicas en el laboratorio relacionadas a la manipulación genética y estudio de *B. subtilis*, así como la exploración de técnicas novedosas como microfluídica.

ABSTRACT

It is common to observe that when an isogenic bacterial population in a homogeneous environment is stimulated by a determinate signal, the individual cells in the population do not behave in the same manner. This heterogeneous behavior is kind of evident in procaryotes capable of differentiating, such as the spore forming bacteria *Bacillus subtilis*.

It has been demonstrated that when a *B. subtilis* population is induced to form spores, initially only a small proportion of the population choses spore fate between other possible options such as miner cell or cannibal cell. The heterogeneity of initiation of sporulation in *B. subtilis* has been a model of study of decision making in biologic systems for years. In spite of it, is still poorly understood how a cell chooses which cell fate to follow.

The cascade that governs the initiation of sporulation in *B. subtilis* is a more complex version of a two-component system (TCS), named phosphorelay. Most of the components of this phosphorelay and other related aspects such as the regulatory loops of the cascade have been evaluated experimentally to test if they are the element that determines that the master regulator Spo0A reaches the appropriate activation level to initiate the sporulation process in a cell. In previous studies in other groups, the phosphorelay as a whole has been pointed as the system that mainly generates the noise that drives the stochastic behavior of entry into sporulation, without signaling any specific element as the responsible. On the other hand, in comparison to the other components of the phosphorelay, the phospho-transferase Spo0B has received little attention. Bioinformatic studies developed in our research group, as well as specific characteristics of *spo0B*/Spo0B discovered experimentally in others, support the role of Spo0B as a limiting factor for Spo0A phosphorylation.

The main objective of this work was to build a system that allows us to evaluate if the expression of *spo0B* controls the proportion of cells that initiates the sporulation process in a population. In order to test this, *spo0B*, *kinA*, and *spo0F* genes were cloned under an IPTG inducible promoter, $P_{\text{hyperspank}}$, and inserted in *B. subtilis* genome in separate strains. Due to the low *spo0B* expression levels in comparison with other phosphorelay components, the gene was excised from its native locus to avoid background expression in the strain $P_{\text{hyperspank}}\text{-spo0B::amyE}$. Additionally, the reporter genes $P_{\text{spoIIQ}}\text{-GFP}$ (late sporulation) and $P_{\text{spoIIA}}\text{-DsRed}$ (early sporulation) were added to each of these strains.

Analysis of the strain $\Delta\text{spo0B } P_{\text{hyperspank}}\text{-spo0B::amyE}$ shows that previously to IPTG induction, cells express *spo0B*. This feature is not suitable for a system in which the concentration of a gene is exceptionally low natively within the cell, such as *spo0B*. Therefore, in this work we suggest options to address the *spo0B* expression control. Additionally, by inducing the expression of *spo0B* even in low concentrations, no spores were formed in the population, so subsequent experiments are suggested for the analysis of this effect. Finally, this work allowed to standardize several techniques in the laboratory related to genetic manipulation and study of *B. subtilis*, as well as the exploration of novel techniques such as microfluidics.

I. INTRODUCCIÓN

Procesamiento de la información en sistemas biológicos

Para sobrevivir, los organismos deben adaptarse a cambios ambientales repentinos que ejercen una presión selectiva y, por lo tanto, sus posibilidades de sobrevivencia dependen de su capacidad para responder en forma rápida y precisa. La adaptación a estos cambios está estrechamente ligada a la adecuada percepción, procesamiento y transmisión de los estímulos que generen respuestas celulares apropiadas. La percepción y procesamiento intracelular de estos estímulos se lleva a cabo por circuitos moleculares que detectan y amplifican las señales, permitiendo así la generación de respuestas específicas (Barba-Ostria, 2014).

La adaptación a estímulos ambientales en bacterias está mediada principalmente por la expresión de reguladores transcripcionales, incluyendo proteínas serina-treonina cinasas, factores sigma de función extracitoplásmica, y sistemas de transducción de señales de dos componentes (Bretl *et al.*, 2011).

Sistemas de transducción de señales en bacterias

Los sistemas de dos componentes o TCS según sus siglas en inglés *Two Component System*, tienen funciones esenciales en eventos de señalización tales como comunicación célula-célula, adaptación al medio ambiente y patogénesis en el caso de organismos patógenos (Wang, 2012). Estos sistemas son uno de los medios predominantes a través de los cuales las bacterias perciben, responden y se adaptan a cambios en el ambiente en el que se encuentran, así como a su estado intracelular (Laub and Goulian, 2007). Estos se encuentran representados ampliamente en bacterias, así como en determinadas arqueas, y algunos grupos de eucariotes tales como hongos, plantas y mohos mucilaginosos, pero se encuentran ausentes en mamíferos (Bretl *et al.*, 2011; Wang, 2012; Barba-Ostria, 2014).

Estos sistemas consisten de dos proteínas, una histidina cinasa sensora y un regulador de respuesta. Las señales que activan estos sistemas promueven el estado fosforilado del regulador de respuesta, que es generalmente la forma que lleva a cabo funciones específicas dentro de las que se encuentran la unión a DNA y catálisis de reacciones bioquímicas.

Las proteínas histidina cinasa sensoras se encuentran generalmente como proteínas integrales de membrana que funcionan como dímeros, aunque también existen formas citoplasmáticas. En la **figura 1** se puede observar cómo el dominio *input* de la histidina sensora cinasa responde a señales a través de la activación del dominio autocinasa, que se fosforila a partir de ATP en un residuo histidina conservado. Posteriormente, la proteína sensora cinasa interactúa con el dominio receptor del regulador de respuesta transfiriendo el grupo fosforilo al regulador de respuesta en un residuo aspartato que también está conservado. La fosforilación del regulador de respuesta genera cambios conformacionales activando su dominio *output* o de acción, el cual lleva a cabo funciones específicas tales

como regulación transcripcional, unión a RNA, interacción proteína-proteína u otras actividades enzimáticas (Mitrophanov and Groisman, 2008; Bretl *et al.*, 2011; Barba-Ostria, 2014).

Existen versiones más complejas de los sistemas de transducción de señales de dos componentes, denominados fosforrelevo. Los fosforrelevo también son mediadores clave de la transducción de señales en bacterias (Mitrophanov and Groisman, 2008) y permiten la convergencia de una mayor cantidad de puntos de regulación dentro de la cascada tanto a nivel de fosfotransferencia como a nivel de regulación transcripcional de sus componentes respecto a los TCS. Estos sistemas también contienen una histidina cinasa sensora y un regulador de respuesta terminal con las mismas características antes mencionadas. La proteína sensora cinasa inicialmente transfiere el grupo fosfato a un regulador de respuesta en su residuo aspartato conservado que carece de un dominio *output* o de acción. El regulador de respuesta transfiere el grupo fosforilo a una proteína fosfotransferasa que contiene un residuo histidina. Este tercer componente funge posteriormente como fosfodoador al regulador de respuesta terminal, que sí posee un dominio *output* capaz de generar respuestas celulares (**Figura 1**) (Mitrophanov and Groisman, 2008; Bretl *et al.*, 2011).

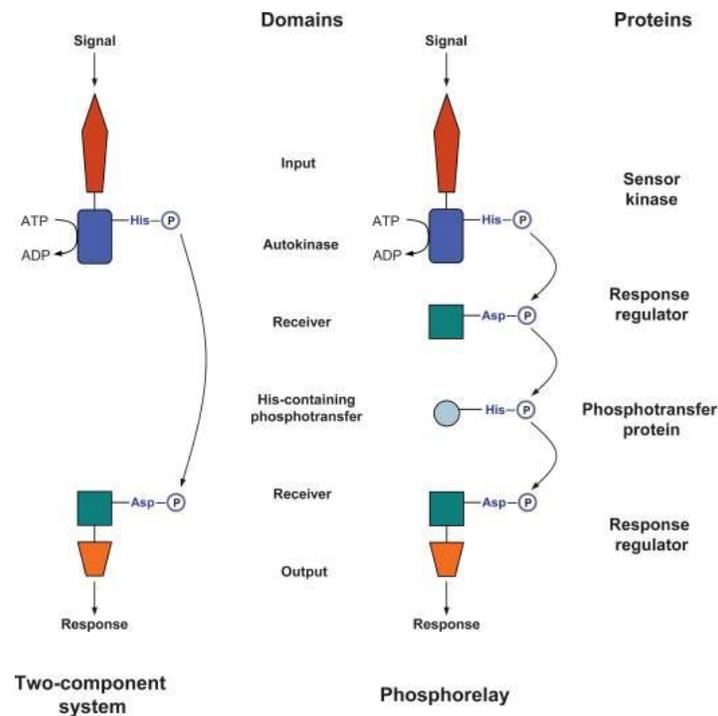


Figura 1. Organización de un sistema de dos componentes prototípico (A) y un sistema fosforrelevo en bacterias. Figura tomada de Mitrophanov and Groisman, 2008.

Frecuentemente, los fosforrelivos regulan fenómenos celulares complejos tales como desarrollo y control de ciclo celular en bacterias. Dentro de estos se incluye, formación de heterocistos en cianobacterias, esporulación en *Myxococcus xanthus*, desarrollo y formación de cuerpos fructíferos en *Dictyostelium* (Revisado en Hoch, 2000), mientras que en *B. subtilis* se encuentra un fosforrelivo que dirige a la célula hacia el destino de célula caníbal, productora de matriz o hacia la formación de endoespora.

Diferenciación celular en sistemas biológicos

A pesar de que generalmente la diferenciación se relaciona con eucariotes pluricelulares, las bacterias también tienen cierta capacidad de diferenciación durante la cual se desarrollan en determinados tipos celulares con funciones especializadas. Se conoce que *B. subtilis* puede presentar los distintos tipos celulares de célula móvil, caníbal, productora de matriz o de surfactinas, competente, minera o espora, que coexisten dependiendo de las condiciones ambientales.

Sin embargo, *Bacillus* no es el único género de bacterias capaz de diferenciarse. Por ejemplo, el organismo acuático *Caulobacter crescentus* tiene heterogeneidad innata incorporada en su población. Para lograr la replicación, *Caulobacter* se divide asimétricamente para producir dos células genéticamente idénticas, pero morfológicamente distintas: las células *swarmer*, que son capaces de nadar utilizando un flagelo, y las células *stalked*, que se adhieren a las superficies. Sólo las células *stalked* pueden replicar su DNA y por lo tanto las células *swarmer* deben diferenciarse primero en células *stalked* antes de replicarse. Otro ejemplo son las cianobacterias fotosintéticas, tales como *Anabaena* sp. que crecen en filamentos y, bajo condiciones limitantes de nitrógeno, alrededor del 5-10% de las células organizadas en filamentos se diferencian en heterocistos, que son células especializadas en la fijación de nitrógeno. Esta diferenciación es esencial porque las células vegetativas producen oxígeno a través de la fotosíntesis y el heterocisto protege a las enzimas fijadoras de nitrógeno sensibles al oxígeno producido por sus vecinos. Existe una interdependencia entre estos dos tipos de células, ya que los heterocistos suministran a las células vegetativas con nitrógeno fijado y la proporción fotosintética de la población provee al resto con carbono y agentes reductores. Un ejemplo más complejo es *Myxobacteria*, que son microorganismos sociales que, tras la inanición, coordinan su comportamiento para formar montículos denominados cuerpos fructíferos en los que participan miles de células. Sólo las células dentro de los montículos son capaces de diferenciarse en esporas metabólicamente inactivas. Sin embargo, incluso cuando los cuerpos fructíferos se han formado, un subconjunto de células denominado varillas periféricas mantienen el crecimiento vegetativo fuera de los cuerpos fructíferos, presumiblemente listos para aprovechar cualquier cambio repentino en la disponibilidad de nutrientes. (Revisado en Lopez *et al.*, 2009 a).

En estos organismos, se denota que pueden existir distintos programas de diferenciación presentes en las células isogénicas individuales de una población, aunque el ambiente que los envuelve sea el mismo. A pesar de que se esperaría que las células tuvieran un

comportamiento idéntico debido a que provienen de un ancestro clonal y albergan genomas idénticos, cada vez existen más reportes en los que no se observa esta conducta. El concepto lógico de que las células rodeadas de una señal homogéneamente distribuida responderían de forma equitativa a una señal, fue desplazada por la observación de subpoblaciones de células en cultivos dispersos, concepto que se conoce como heterogeneidad de comportamiento celular (López and Kolter, 2010). En la actualidad, se conoce que el efecto estocástico o ruido en la expresión genética influye en las amplias variaciones entre célula y célula observadas en poblaciones isogénicas (Elowitz *et al.*, 2002). Estas fluctuaciones ocurren en una diversidad de procesos celulares, dentro de los que se encuentran la tasa de transcripción, traducción y degradación de genes, transcritos o proteínas, la difusión e interacción de componentes celulares en el citoplasma y repartición no equitativa de componentes entre célula y célula durante la división celular. Esto provoca que, a pesar de encontrarse bajo un mismo ambiente, el paisaje de posibilidades de respuesta de las células sea muy variado.

El comportamiento heterogéneo es más notorio en procariotes multipotenciales, es decir, procariotes que tienen la capacidad de diferenciarse en distintos tipos celulares. Tal es el caso de *B. subtilis*; un modelo que permite el análisis de comportamientos complejos. Debido a que presenta rutas de diferenciación relativamente simples, este organismo ha sido un sistema modelo para el estudio de toma de decisiones de destinos celulares durante el desarrollo.

II. ANTECEDENTES

Bacillus subtilis como modelo de estudio

La bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis* ha sido objeto de estudio intensivo por alrededor de seis décadas. Esta bacteria es aerobia, no patógena y fue inicialmente clasificada como una bacteria de suelo, pero su capacidad de crecer en diversos ambientes acuáticos y terrestres; desde la superficie de raíces de algunas plantas hasta el tracto gastrointestinal de algunos animales, se conoce bien en la actualidad (Harwood, 2007; Freyre-González *et al.*, 2013). Esta capacidad de adaptarse a distintos ambientes ha sido atribuida principalmente a la formación de endosporas, lo cual ocurre en determinadas condiciones de estrés e inanición (Freyre-González *et al.*, 2013), pero adicionalmente, *B. subtilis* presenta un esquema de adaptación determinado “*bet-hedging*”, que consiste en que subpoblaciones de células de una población expresan distintos grupos de genes previamente al estrés ambiental, lo cual genera una diversidad de fenotipos que le permitiría a la población sobrevivir a condiciones diferenciales de crecimiento futuras y promover la aptitud biológica de la especie (Davis and Isberg, 2016).

***Bacillus subtilis* y la heterogeneidad del comportamiento**

Las distintas subpoblaciones de células especializadas de *B. subtilis* coexisten. La coordinación e interacción entre estos tipos celulares requiere amplia comunicación extracelular dirigida principalmente por la percepción de señales secretadas autoproducidas. Estas señales extracelulares activan un grupo de proteínas sensoras cinasas, que responden fosforilando a tres proteínas reguladoras maestras, **Spo0A**, **DegU** y **ComA**. Cada regulador activado (fosforilado) inicia un programa específico de diferenciación mientras que al mismo tiempo reprime otros programas de diferenciación. Esto permite a la célula diferenciarse en respuesta a una señal específica, incluso en la presencia de otra señal, posiblemente conflictiva. La subpoblación de células móviles solo está presente cuando ninguno de los programas de diferenciación celular está activo y son mutuamente excluyentes a cualquier otro tipo de célula especializada. En contraste con la subpoblación de células móviles, el resto de los tipos de células generalmente comparten los programas de diferenciación y a veces se superponen (Revisado en López and Kolter, 2010).

Los reguladores globales influyen la diferenciación celular en *B. subtilis*

La fosforilación del regulador DegU, como se denota en la **figura 2**, genera la expresión de la maquinaria responsable de la producción y secreción de proteasas, resultando en la diferenciación de la subpoblación minera. Este tipo celular tiene la capacidad de degradar tanto productos secretados por otras células en la población, así como productos liberados por células muertas dentro de la fase estacionaria. La función de esta maquinaria de degradación es proveer nutrientes extra a la comunidad al degradar proteínas exógenas en péptidos más pequeños y polisacáridos en mono o disacáridos que pueden ser utilizados más fácilmente por las células (Lopez *et al.*, 2009). De forma similar, la fosforilación de ComA induce la ruta hacia la producción de surfactinas. Adicionalmente, una fracción de las células productoras de surfactinas sigue un segundo proceso de diferenciación hacia células competentes. Finalmente, la fosforilación de Spo0A activa las cascadas hacia la producción de matriz y canibalismo cuando hay bajas concentraciones de Spo0A fosforilado en la célula, mientras que cuando hay altas concentraciones, se inducen los genes de esporulación (Revisado en López and Kolter, 2010).

En una biopelícula de *B. subtilis*, distintas subpoblaciones de tipos celulares coexisten y exhiben diferentes patrones de distribución espacio-temporal. La diferenciación en subpoblaciones es un requisito clave para la formación de la arquitectura de una colonia compleja porque la ausencia de uno de esos reguladores clave dan como resultado defectos dramáticos en la colonia morfológica. La expresión de genes requerida para la motilidad es conferida cuando los reguladores mencionados anteriormente se encuentran en un estado no fosforilado. Cuando las células se vuelven sésiles, los reguladores maestros **DegU**, **ComA** o **Spo0A** se activan en respuesta a la presencia de diversas señales extracelulares, lo que disminuye la población de células móviles y favorece la diferenciación de los diferentes tipos celulares (Revisado en Mielich-Süss and Lopez, 2015).

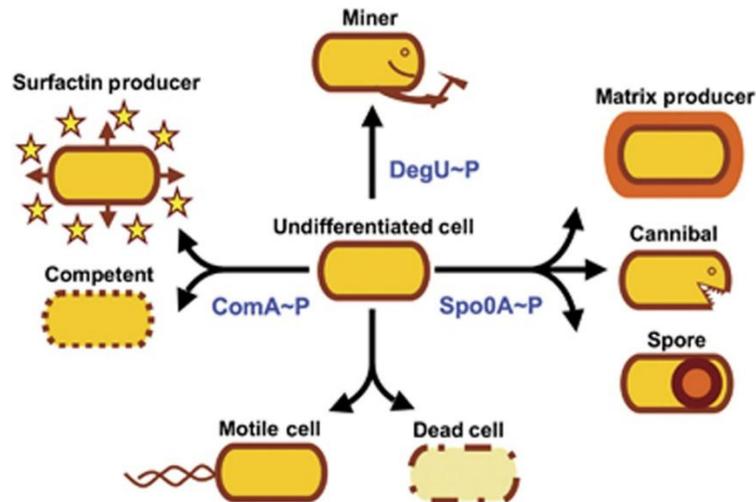


Figura 2. Representación esquemática de los distintos tipos celulares que se diferencian en comunidades de *Bacillus subtilis*. Figura tomada de López and Kolter, 2010.

Las células móviles posicionadas en la capa inferior de la biopelícula contribuyen a la expansión de la comunidad, mientras que los productores de matriz localizados en el núcleo producen principalmente la matriz extracelular y mantienen su rigidez. Las esporas están presentes en estructuras aéreas en la parte superior de la biopelícula, que facilitan su dispersión. Células DegU~P, localizadas preferentemente en la superficie de la biopelícula adheridas al agar, favorecen la formación de la capa BslA que recubre la biopelícula. El patrón de distribución espaciotemporal de células competentes y los productores de surfactina son aún desconocidos debido al pequeño tamaño de esta subpoblación, lo cual impide su detección en las comunidades en general (Revisado en Mielich-Süss and Lopez, 2015).

Cómo es que las células eligen un destino celular al presentarse varias posibilidades, es una pregunta fundamental y pobremente entendida (Kuchina., 2013). También se desconoce cómo es que los sistemas multipotenciales de diferenciación alcanzan una elección de destino celular decisiva manteniendo la habilidad de responder a cambios en el ambiente (Kuchina *et al.*, 2011). Un sistema modelo para el estudio de cómo es que las redes de regulación del desarrollo determinan el destino celular es la formación de esporas en la bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis* (Chastanet *et al.*, 2010) debido a que se ha observado que a pesar de que las células se encuentren en un mismo ambiente que induce esporulación, solo una proporción de la población inicia la diferenciación hacia este destino.

Esporulación en *B. subtilis*

Las esporas son un tipo celular que permite la preservación y propagación de la información genética de determinados organismos al enfrentarse a condiciones austeras. Por ejemplo, limitación de oxígeno y/o nutrientes. Las esporas funcionan como un mecanismo de defensa tanto temporal como espacial de condiciones locales no favorables para el crecimiento rápido (Nicholson, 2002). Estas estructuras son un tipo celular altamente resistente y longevo (Errington, 2003). Las endosporas son producidas por linajes antiguos de bacterias, tales como el género de anaerobios *Clostridium* y aerobios de diversos géneros, de los cuales el mejor estudiado es *Bacillus* (Errington, 2003).

La esporulación es un proceso energéticamente costoso debido a que requiere reorganización morfológica celular significativa, por lo que la decisión de la célula de esporular está sujeta al resultado de la integración de múltiples señales a través de una compleja red de regulación de la expresión genética, dentro de la que se encuentra un fosforrelevo controlando el inicio de la esporulación, el cual se describe más a continuación.

Fosforrelevo del inicio de la esporulación de *B. subtilis*

Durante la cascada del fosforrelevo del inicio de la esporulación de *B. subtilis*, están involucradas cinco histidina cinasas - KinA, KinB, KinC, KinD y KinE - que se autofosforilan para transferir el grupo fosforilo a Spo0F, la fosfotransferasa reguladora de respuesta (Bijlsma and Groisman, 2003). La histidina cinasa que fosforila principalmente Spo0F, es KinA, de la cual no se conoce cuál es la señal que induce su actividad (Mitrophanov and Groisman, 2008). Spo0F fosforilada (Spo0F~P) transfiere el grupo fosforilo a Spo0B (Fujita and Losick, 2005 a). Finalmente, Spo0B~P transfiere el grupo fosforilo, y así activa al factor maestro de la transcripción, Spo0A, del cual se ha demostrado que más de 520 genes (más del 10% de todos los genes de *B. subtilis*) están directa o indirectamente bajo su control (Fawcett *et al.*, 2000). De estos, alrededor de 120 están regulados de manera directa.

Por otro lado, los grupos fosforilo son sustraídos del fosforrelevo mediante la acción de proteínas que fosfatan a Spo0F~P y Spo0A~P (Fujita and Losick, 2005 a). Este sistema se puede observar en la **figura 3**. Las proteínas conectoras modulan los niveles de las formas activas de reguladores de respuesta al actuar sobre los varios posibles pasos que determinan su estado de fosforilación o su actividad (Mitrophanov and Groisman, 2008). Los conectores Sda y KipI bloquean la activación del fosforrelevo al inactivar la autofosforilación de KinA. Los conectores RapA, RapB, Rap E y RapH promueven la fosfatación del regulador de respuesta Spo0F~P; los conectores Spo0E, YisI y YnzD actúan de forma similar sobre Spo0A~P. La expresión de los conectores está controlada por condiciones de crecimiento, estado de la maquinaria de replicación y desarrollo de competencia (a través de la actividad de ComA y ComK) los reguladores clave de los genes de competencia (Mitrophanov and Groisman, 2008).

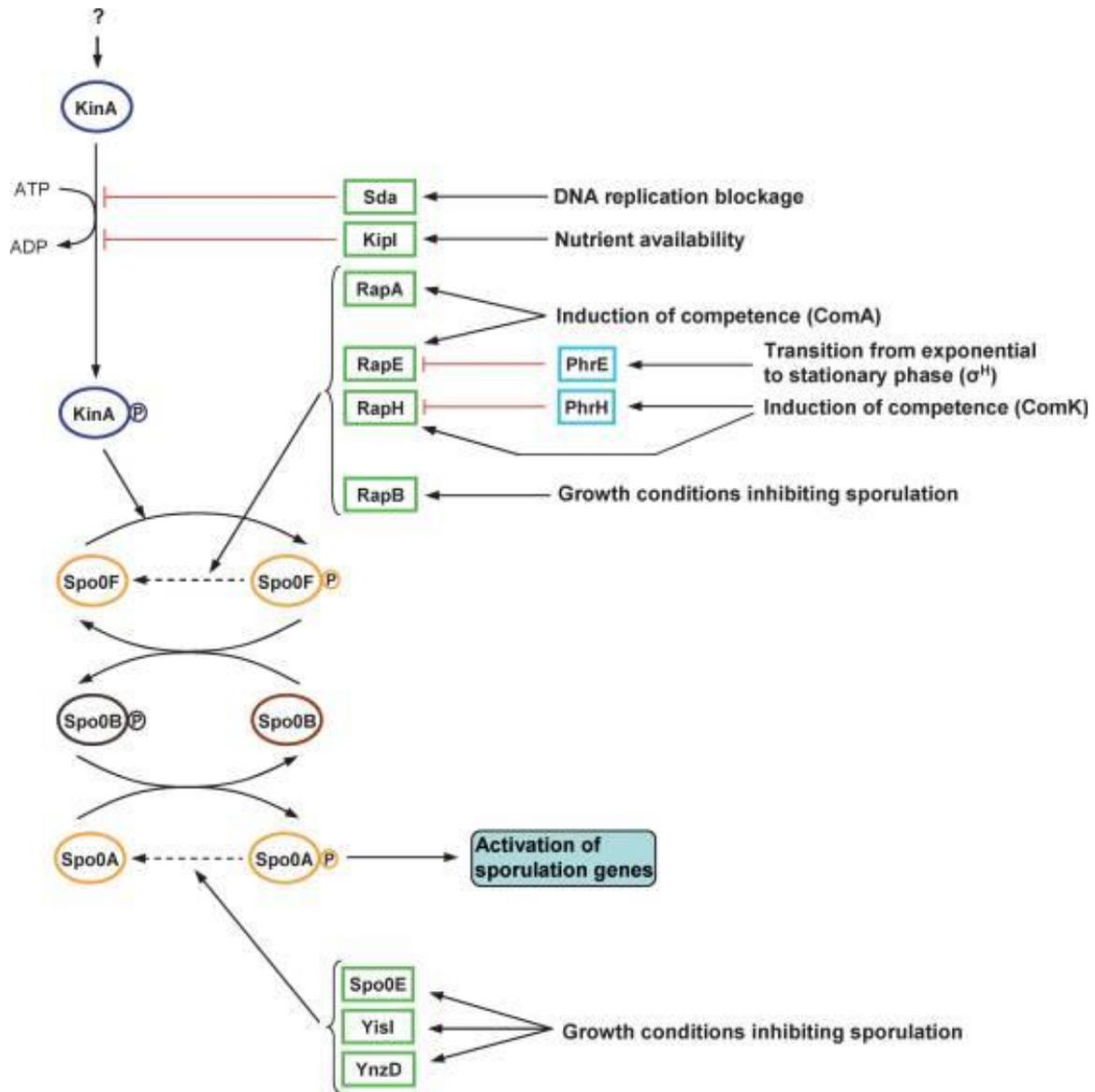


Figura 3. Esquema del fosforrelevo que inicia la esporulación en *B. subtilis*. Se observa que los conectores de sistemas de dos componentes pueden inhibir la autofosforilación de la proteína sensora o promover la fosfatación del regulador de respuesta fosforilado. Figura tomada de Bretl *et al.*, 2011.

Formación de la endoespora

El estímulo principal de la esporulación es la inanición, aunque también es importante que la densidad de población sea alta (Errington, 2003). En la **figura 4**, se muestra el esquema de los pasos clave para la formación de la endoespora de *B. subtilis*. La esporulación inicia con la etapa 0, en la cual el cromosoma se encuentra duplicado, pero no hay ningún cambio morfológico aún. Posteriormente, durante la etapa I, los cromosomas se condensan y se anclan a los orígenes de replicación que se encuentran en los polos de la célula. El primer

evento morfológico durante el inicio de la formación de la endospora es la división asimétrica de la célula, durante la etapa II. La formación del septo asimétrico es un evento clave en el desarrollo de la espora, ya que inicia una cascada de cambios en la expresión genética que involucra diferentes programas de expresión genética en las dos células; llevados a cabo por los factores σ^F , activo en la prespora y σ^E que se vuelve activo en la célula madre. La división celular en bacterias es llevada a cabo por una maquinaria conservada que involucra a la proteína FtsZ, un homólogo bacteriano de la proteína tubulina. Esta proteína también participa durante la formación del septo que da origen a la división asimétrica durante la esporulación. La acumulación de FtsZ y la síntesis de la proteína específica de esporulación SpoIIIE, provocan el reposicionamiento de FtsZ en dos anillos separados, cada uno cerca de un polo de la célula. Este reposicionamiento provoca que FtsZ se redistribuya en forma helicoidal del centro de la célula a los polos. Estos anillos Z cerca de los polos usualmente no son iguales y sólo uno de ellos es el que formará el septo (Errington, 2003).

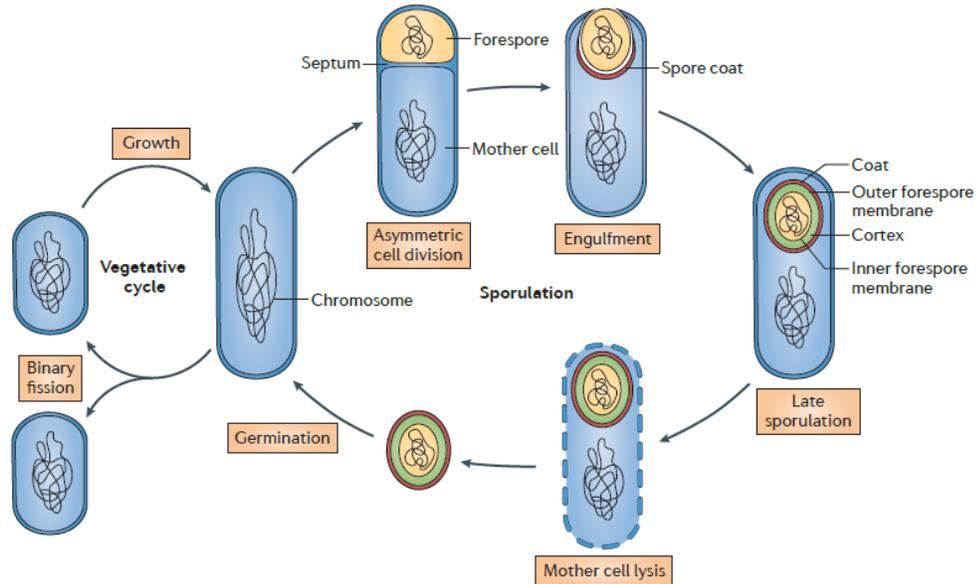


Figura 4. Ciclo de esporulación de *Bacillus subtilis*. Este esquema simplificado muestra los eventos clave del ciclo. Figura tomada de Errington *et al.*, 2003.

Posterior a la división asimétrica, ocurre el engullimiento de la prespora (Etapa III). La finalización del engullimiento es seguida por la formación de la corteza (Etapa IV) y el abrigo de la espora (Etapa V). El proceso continúa con la maduración de la misma (Etapa VI) y termina en la muerte por lisis de la célula madre (Etapa VII) y la liberación de una célula hija latente que puede resistir amenazas como calor, radiación y químicos tóxicos (Errington, 2003; Schultz *et al.*, 2009; Tan and Ramamurthi, 2014).

Evaluación de la fuente de la estocasticidad del inicio de la esporulación

Comportamiento bimodal durante el proceso de esporulación

El proceso a través del cual sólo una fracción de las células en una población dispersa se diferencia es conocida como bimodalidad, debido a la distribución bimodal de la expresión génica en la que una población genéticamente idéntica se bifurca (López and Kolter, 2010). El concepto de moda de un conjunto de datos, se refiere al valor que aparece más frecuentemente en dicho conjunto. Este comportamiento bimodal se ha logrado observar en procesos de desarrollo como esporulación, motilidad y formación de matriz extracelular en *B. subtilis* (Revisado en López and Kolter, 2010).

Como se ha mencionado anteriormente, el inicio de la esporulación está determinado por un fosforrelevo que está sujeto a tres circuitos de retroalimentación positiva. A pesar de ello, la decisión final de esporular es estocástica debido a que sólo una porción de la población esporula aún en condiciones óptimas (Chastanet *et al.*, 2010). Este fenómeno se conoce como biestabilidad o heterogeneidad de esporulación (Jong *et al.*, 2010). Un sistema biestable es un tipo de sistema bimodal en el que a pesar de las diferencias durante la expresión genética se promueve la estabilidad de ambos estados.

Pese a que se han realizado diversos estudios sobre la fuente de la estocasticidad durante el inicio de la esporulación, esta aún no se conoce. Incluso, existen opiniones controversiales. Veening *et al.* señalan que la distribución de Spo0A es bimodal per se, lo que permitiría explicar la bimodalidad de la esporulación (Veening *et al.*, 2005), mientras que Chastanet *et al.* señalan que la distribución de Spo0A es completamente heterogénea dentro de la población (Chastanet *et al.*, 2010; De Jong *et al.*, 2010).

Spo0B como paso limitante en el flujo de fosfato dentro del fosforrelevo

A pesar de que los sistemas biológicos funcionan como un todo, la división de labores es una propiedad clave del procesamiento de información en la célula. Por lo anterior, es posible identificar dentro de las redes módulos estructurales, dinámicos y funcionales. Estos módulos, pueden ser estudiados computacional y/o experimentalmente. El sistema del fosforrelevo es un módulo estructural ya que tiene todos los elementos para definir varios destinos celulares; funcional ya que gracias a la transmisión y la detección de señales es capaz de dar una respuesta a estímulos; y dinámico ya que tiene circuitos de regulación en más de un nivel que le ayudan a dar respuestas múltiples pero específicas.

En este sentido, nuestro grupo de investigación realizó simulaciones estocásticas respecto al sistema de fosforrelevo de esporulación de *B. subtilis* y generó un modelo probabilístico de toma de decisiones controlado a nivel de red de señalización (Granados-Castro and Gutiérrez-Ríos, 2013). El modelo se basa principalmente en datos experimentales

reportados en la literatura (Grimshaw *et al.*, 1998 a; Chastanet *et al.*, 2010; Eswaramoorthy *et al.*, 2010 a; Igoshin *et al.*, 2016) donde se identificaron módulos estructurales, dinámicos y funcionales en el sistema del fosforrelevo. Este modelo se creó con el objetivo de integrar la señalización a nivel de flujo de fosfato y a nivel de regulación genética que actúa sobre el fosforrelevo, como se muestra en la **figura 5**, y entender la probabilidad de esporulación como un proceso de toma de decisión.

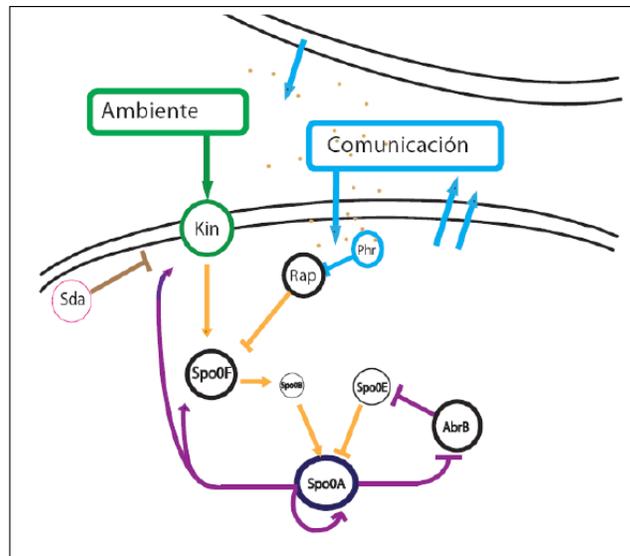


Figura 5. Modelo del módulo de señalización de esporulación. El flujo de fosfato se muestra en color amarillo y retroalimentación transcripcional en color morado. El tamaño del círculo para Spo0B remarca el número inusualmente bajo de moléculas en el citoplasma. Sda es una proteína relacionada con ciclo celular, que regula la actividad de KinA. Tomado de Granados-Castro and Gutiérrez-Ríos, 2013.

En el módulo de señalización, se tomaron en cuenta los siguientes eventos: el ingreso de señales a través de las cinasas de histidina, la autofosforilación de las cinasas, el flujo reversible de fosfato a través del fosforrelevo, el control negativo en Spo0F mediado por fosfatasas Rap, la activación de Spo0A, el control negativo en Spo0A ejercido por Spo0E y el efecto transcripcional conocido hasta ese momento de los reguladores Spo0A, SigH, AbrB y SigA entre ellos mismos y sobre los componentes del fosforrelevo. Algunos de los parámetros numéricos tomados en cuenta para el desarrollo de este trabajo se muestran en la **tabla 1**. Considerando los diferentes parámetros y elementos del fosforrelevo en la dinámica poblacional, el modelo predice la probabilidad de que una célula individual inicie la formación de la endospora, es decir, la probabilidad de que Spo0A presente los niveles de activación adecuada.

Asimismo, se muestra que la fosfotransferasa Spo0B actúa como la interfaz de comunicación entre la integración de señales (en Spo0F) y la activación de Spo0A, es decir,

funciona como plataforma de comunicación entre ambos módulos. La determinación de los parámetros cinéticos *in vitro* para las reacciones mediadas por Spo0B demostró que la transferencia de fosfato de Spo0B-P a Spo0A es un millón de veces mayor que una fosfotransferencia mediada por la cinasa KinA-P directamente sobre Spo0A (Grimshaw *et al.*, 1998 a). De esta manera, Spo0B no solo actuaría como un puente molecular entre la red de señalización y la red de regulación genética, sino también como un paso limitante en el flujo de fosfatos.

Además, el conjunto de mecanismos de regulación mencionados previamente genera una separación a escala temporal que tiene amplia influencia sobre la dinámica poblacional. Como se mencionó anteriormente, en el modelo construido se estudió el efecto en la dinámica de Spo0A, y por consiguiente en la esporulación, al variar diferentes parámetros cinéticos en el sistema. Para KinA, Spo0F y Spo0A se encontraron resultados que ya han sido observados tanto experimentalmente como en modelos teóricos, mientras que al modificarse la concentración de Spo0B en la simulación, se puede observar un efecto significativo en el tiempo de respuesta del sistema (**Figura 6**). Este tipo de efecto se ha observado previamente, en el que al encontrarse una pequeña cantidad de una determinada molécula dentro de una célula, los efectos estocásticos son prominentes, a diferencia de cuando el número de moléculas presente es alto, por los sistemas se comportan de una forma más predecible (Raser and O'Shea., 2010).

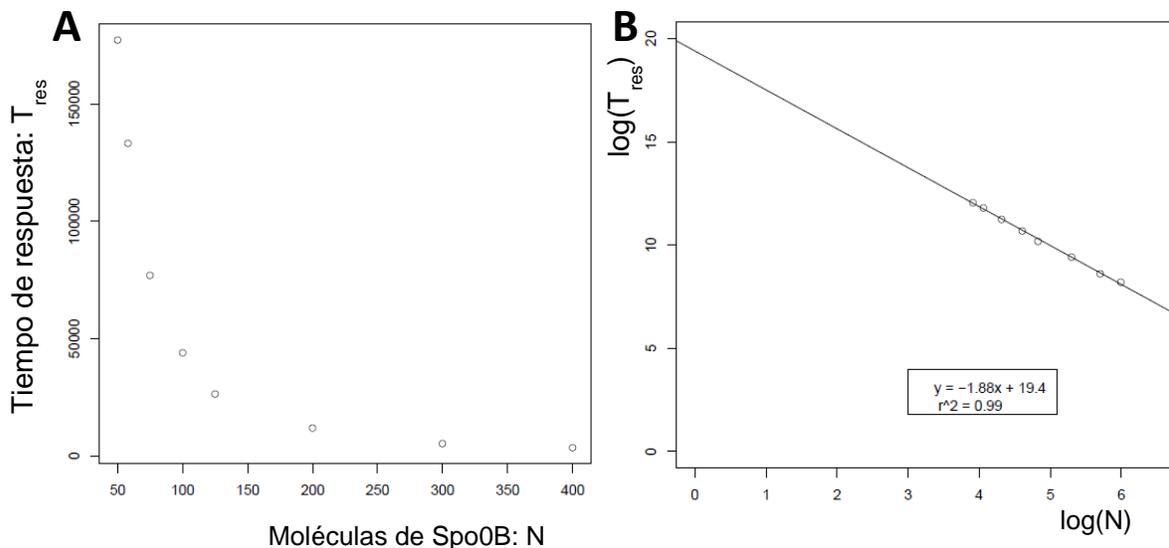


Figura 6. Simulación del tiempo antes de esporular como función de la variación de la concentración de Spo0B. A) Tiempo de respuesta (número de eventos en la simulación) para que la concentración de Spo0A-P alcance 50% de su estado estacionario como función del número de moléculas presentes de Spo0B. Cada punto representa un tiempo promedio obtenido a partir de 100 simulaciones. B) Regresión lineal para ajustar los datos a una ley de potencias (Granados-Castro and Gutiérrez-Ríos, 2013).

Es un hecho que la activación de Spo0A es heterogénea en la población. De forma general, se ha propuesto que este comportamiento presenta tres estados durante el proceso de toma de decisiones; umbral de concentración bajo, un tiempo de espera en el que el nivel de Spo0A no varía y un umbral de concentración alto (Schultz *et al.*, 2009). Como se ha mencionado anteriormente, la concentración de Spo0A~P en la célula está correlacionada con el destino celular a desarrollarse en *B. subtilis*. El lapso de tiempo en el que la actividad de Spo0A~P no cambia, funge como tiempo de espera en caso de que ocurriera una mejoría en las condiciones ambientales. Previamente se ha propuesto que este comportamiento heterogéneo se debe a que el fosforrelevo en conjunto podría estar actuando como un generador de ruido que provoca la heterogeneidad de Spo0A~P (Chastanet *et al.*, 2010). El modelo desarrollado en nuestro grupo de trabajo predice a Spo0B como el componente amplificador de ruido del fosforrelevo dentro del sistema por lo que sugiere la importancia que Spo0B podría tener en la dinámica de esporulación.

Respecto al ámbito experimental, *spo0B* presenta discrepancias en su comportamiento en comparación con otros componentes del fosforrelevo. De los factores que gobiernan la transcripción de los componentes del fosforrelevo se sabe que la expresión del factor sigma H (σ^H) estimula la síntesis de la mayoría de los componentes (KinA, Spo0F y Spo0A) (Predich *et al.*, 1992; Asai *et al.*, 1995). *spo0B* no se encuentra regulado por σ^H , por el contrario, es transcrito preferencialmente bajo el control del factor *house keeping* sigma A (σ^A) (Bouvier *et al.*, 1984). Asimismo, se ha descrito que todos los componentes del fosforrelevo, a excepción de *spo0B*, incrementan su transcripción al entrar en la fase estacionaria de crecimiento (Chibazakura *et al.*, 1991; Strauch *et al.*, 1992). Adicionalmente, se demostró que la regulación de *kinA*, *kinB*, *spo0F*, *spo0A* y *sigH* puede ser afectada por la sobreproducción de KinA, indicando que el flujo de fosfato afecta directamente la transcripción de los componentes del fosforrelevo. De nuevo, *spo0B* es la excepción, ya que su transcripción no se encuentra bajo el control positivo de KinA (De Jong *et al.*, 2010 a). Por otro lado, se ha demostrado que una mutante en el gen *spo0B* es incapaz de esporular (Piggot and Coote, 1976), denotando la importancia de este componente durante el proceso de esporulación. Spo0B presenta propiedades específicas, no compartidas por otros componentes del fosforrelevo; no se conoce ningún circuito de regulación transcripcional dependiente del mismo (Chastanet *et al.*, 2010), sus niveles de expresión son bajos en relación a los demás componentes del fosforrelevo (entre 20 y 50 moléculas por célula) (Eswaramoorthy *et al.*, 2010 b), y su estado de fosforilación no es regulado por fosfatasas (Varughese *et al.*, 2006).

Evento	Parámetro	Referencia
Parámetro general de unión	0,005 1/(m*s)	Igoshin <i>et al.</i> , 2008
Parámetro general de desunión	0,5 1/s	"
Tasa de autofosforilación de HK (general)	0,1 1/s	"
Tasa de autodefesforilación de HK (general)	0,001 1/s	"
Fosforilación HK RR	1,5 1/s	"
Defosforilación del RR por HK	0,05 1/s	"
Fosfotransferencia KinA a Spo0F	0,08 1/s	Grimshaw <i>et al.</i> , 1998
Tasa de autodefesforilación de KinA (general)	0,002 1/s	"
Fosfotransferencia Spo0B a Spo0A	0,2 1/s	"
KinA autofosforilación de KinA (sin Spo0F)	0,0019 1/s	"
KinA autofosforilación de KinA (con Spo0F)	0,01 1/s	"
Dimerización de HK (general)	0,1 1/(m*s)	Bray, 1993
Disociación dímero HK (general)	0,5 1/s	"
Tasa de degradación de proteína (general)	4E-4 1/s	Chastanet <i>et al.</i> , 2010
Tasa de degradación de mRNA (general)	1E-1 1/s	"
Tasa de traducción por molécula de mRNA(general)	4E-2 1/s	"
Tasa de transcripción de OE inactivo	1E-3 m/s	"
Tasa de transcripción de OE activo	3E-3 m/s	"
Kd Spo0A al promotor de <i>skf</i>	26 nM	Fujita, 2005
Kd Spo0A al promotor de <i>spoIIA</i>	140 nM	"
Kd Spo0A al promotor de <i>spoIIE</i>	64 nM	"
Kd Spo0A al promotor de <i>sdp</i>	1300 nM	"
Kd Spo0A al promotor de <i>spoIIG</i>	1700 nM	"
Kd Spo0A al promotor de <i>abrB</i>	64 nM	"

Tabla 1. Ejemplos de parámetros utilizados en el modelo. **M** molar, **m** molécula, **HK** cinasa de histidina, **RR** regulador de la respuesta. Los parámetros generales son de modelos moleculares similares al de *Bacillus subtilis*. Modificado de Granados-Castro and Gutiérrez-Ríos, 2013.

En el caso de *B. subtilis*, se ha demostrado que ninguna de las proteínas del fosforrelevo, distintas a Spo0B, son un paso limitante para la síntesis y fosforilación de Spo0A (Chastanet *et al.*, 2010) y, por lo tanto, para la decisión de la formación de la endospora en *B. subtilis*. Esto aunado, a que no se han encontrado circuitos de regulación a nivel transcripcional para el gen *spo0B*, y que tampoco se conocen fosfatasas que actúen sobre Spo0B, son una causa por la que talvez no se ha estudiado a detalle el papel de Spo0B en este proceso.

Por lo anterior, el proyecto aquí desarrollado contribuye al entendimiento del papel que juega Spo0B en el compromiso celular hacia el fenotipo de esporulación. Además, los resultados a obtener permitirán conocer más a fondo las características estructurales y dinámicas del sistema de esporulación de *B. subtilis*.

III. HIPÓTESIS

La concentración intracelular de Spo0B en las distintas células en cultivos de *Bacillus subtilis*, determinarán cuales de ellas iniciarán el proceso de esporulación.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Construir un sistema que permita la evaluación de la dinámica de esporulación dentro de la población al modular la expresión de *spo0B*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtener una cepa de *B. subtilis* 168 mutante nula en el gen *spo0B* y evaluar su capacidad de esporulación.
2. Construir un sistema que permita la modulación de la expresión de *spo0B* y otros componentes del fosforrelevo.
3. Construir e integrar en el sistema a reporteros que permitan el seguimiento del destino celular de esporulación mediante fluorescencia.
4. Analizar la dinámica de esporulación generada por la inducción transcripcional de *spo0B*.

V. MATERIALES Y METODOLOGÍA

El presente trabajo se realizó con la cepa auxótrofa a triptófano, *Bacillus subtilis* 168 *trpC2*. Todos los procesos de transformación de *B. subtilis* se llevaron a cabo con el protocolo y los medios de cultivo descritos en los Apéndices 10.3.3 y 10.4.1, respectivamente: Protocolo de transformación mediante inducción de competencia natural en *B. subtilis*. Los plásmidos utilizados para el manejo de *B. subtilis* se obtuvieron de Bacillus Genetic Stock Center (BGSC) a menos que se especifique una fuente distinta. Se utilizaron los siguientes antibióticos con su respectiva concentración, eritromicina 2 µg/ml, cloranfenicol 10 µg/ml, fleomicina 10 µg/ml y espectinomicina 50 µg/ml, a menos que se especifique otra concentración.

Como vehículo de mantenimiento de los plásmidos construidos se utilizó a *E. coli* DH5α. La preparación de células competentes y su transformación se llevó a cabo con los protocolos descritos en los Apéndices 10.3.1 y 10.3.2: 10.3.1: Preparación de células competentes de *E. coli* y 10.3.2 Protocolo de transformación de *E. coli*. Las ligaciones de los fragmentos se realizaron con [T4 DNA Ligasa Thermo Fisher Scientific](#), a 4 °C ON. La reacción de ligación se purificó mediante precipitación con butanol (Apéndice 10.1.4) previamente a la transformación.

La amplificación de los fragmentos para las fusiones y construcciones se realizó con [Phusion DNA Polimerasa Thermo Fisher Scientific](#). La verificación de clonas se realizó con [Taq DNA Polimerasa Thermo Fisher Scientific](#) o [Accuprime Pfx DNA Polimerasa Invitrogen](#), dependiendo del tamaño del fragmento amplificado. Todas las construcciones realizadas en este trabajo fueron verificadas mediante secuenciación en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM. Una tabla de los oligonucleótidos y plásmidos utilizados en este trabajo junto con una breve descripción de cada uno, se despliega en los apéndices 10.2.1 y 10.2.2, respectivamente. Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

5.1 Construcción de un sistema que permita la modulación del gen *spo0B*

5.1.1 Construcción de la cepa Δ *spo0B*

Con el objetivo de obtener una cepa de *B. subtilis* 168 mutante nula en el gen *spo0B* (Δ *spo0B*), el gen fue escindido del cromosoma utilizando la técnica de recombinación Cre-Lox.

Se amplificaron las regiones flanqueantes al gen *spo0B*, es decir, tanto río arriba como río abajo, así como un casete de resistencia a espectinomicina (utilizado como sistema de selección). El casete de resistencia a espectinomicina está flanqueado por dos sitios *loxP* orientados en el mismo sentido, posicionado uno en cada extremo del casete. La amplificación del casete de espectinomicina flanqueado por los sitios *lox* se realizó a partir del plásmido pLOXSpec-Walt (Fernando Valle, Genencor). Dicho casete se insertó entre ambas regiones flanqueantes al gen *spo0B* mediante PCR sobrelapado. Esta fusión,

denominada 0BUp_spec_Dw, se clonó en el vector pJET blunt 2.1 en *E. coli* DH5α con CloneJET PCR Cloning Kit Thermo Fisher Scientific. En este caso, se utilizó una concentración de 400 µg/ml de espectinomicina para la selección de clonas positivas.

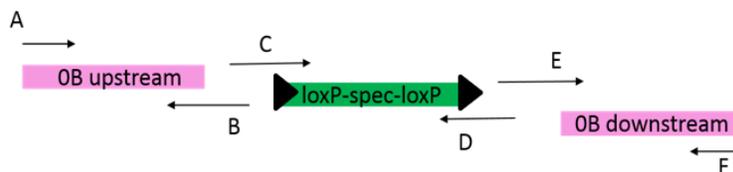


Figura 7. Esquema del empalme de los fragmentos para la construcción de la fusión 0BUp_spec_Dw. Los oligonucleótidos **A** (5208-0BmupA) y **B** (5217-0BmupSpB) se utilizaron para la amplificación del fragmento río arriba de *spo0B* (rosa-izquierda). Los oligonucleótidos **C** (5214-0BmupSpC) y **D** (6310-0BmdownSpD) se utilizaron para amplificar el casete de espectinomicina (verde) flanqueado por dos sitios *loxP* (negro), uno en cada extremo, orientados en el mismo sentido. Los oligonucleótidos **E** (6309-0BmdownSpE-N) y **F** (5213-0BmdownF-N) se utilizaron para la amplificación del fragmento río abajo de *spo0B* (rosa-derecha).

La fusión se nombró 0BUp_spec_Dw. Para la construcción de esta fusión se diseñaron tres pares de oligonucleótidos mencionados a continuación (Castañeda Gómez y Sahonero Canavesi) y en la **figura 7**:

Fragmento	Oligo Fw	Oligo Rv
0B upstream	5208 0BmupA	5217 0BmupSpB
0B downstream	6309 0BmdownSpE-N	5213-0BmdownF
LoxP-spec-loxP	5214 0BmupSpC	6310 0BmdownSpD-N

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de la fusión 0BUp_spec_Dw.

La construcción 0BUp_spec_Dw-pJET se linearizó con la enzima de restricción *Pst*I y se utilizó para transformar a *B. subtilis*. Se seleccionaron clonas positivas en LB espectinomicina 100 µg/ml. A continuación, esta cepa resultante fue transformada con el plásmido termosensible pCRM-Ts-Phleo (Fernando Valle, Genencor), que expresa a la recombinasa Cre constitutivamente. La selección de clonas positivas se realizó a 30 °C y en LB fleomicina 10 µg/ml. Este antibiótico fue donado amablemente por el grupo del Dr. Guillermo Gosset, IBT UNAM.

La escisión del casete de espectinomicina se llevó a cabo de la siguiente manera: Se seleccionaron clonas al azar resistentes a fleomicina y se cultivaron 26 horas a 30 °C y 200 rpm en LB fleomicina 10 µg/ml. Posteriormente, se realizaron diluciones seriales (10^{-5}) de los cultivos en medio LB y se plaquearon en medio LB sin antibiótico. Se seleccionaron múltiples clonas al azar, se estriaron tanto en LB como en LB espectinomicina 100 µg/ml. Colonias que presentaron crecimiento en LB, pero no en LB espectinomicina, se incubaron a 42 °C durante 16 horas (Modificado de Cabrera-Valladares *et al.*, 2012).

5.1.2 Modulación de los niveles de expresión de *spo0B* y de otros componentes del fosforrelevo

Los genes *spo0B*, *spo0F* y *kinA* se clonaron bajo el promotor inducible con IPTG, $P_{\text{Hyperspank}}$ (P_{Hy}), contenido en el plásmido integrativo (locus *amyE*) pDR111_GFP(Sp). pDR111_GFP(Sp) presenta resistencia a ampicilina (*E. coli*) y espectinomomicina. Este plásmido contiene tres terminadores transcripcionales de pMUTIN4 río arriba del $P_{\text{Hyperspank}}$ para evitar la transcripción *read-through* y un segundo sitio del operador lacO insertado río arriba del primero (Bara, 2010).

Inicialmente, se escindió la secuencia nucleotídica que codifica para la proteína GFP del plásmido pDR111_GFP(Sp) utilizando los sitios de restricción para las enzimas *NheI* y *SphI*, mismos que se utilizaron para la clonación del respectivo gen de interés. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de estos genes se enlistan en la siguiente tabla.

Gen	Oligo Fw	Oligo Rv
<i>kinA</i>	2289 KANheIFw	2290 KASphIRv
<i>spo0F</i>	2291 0FNheIFw	2292 0FSphIRv
<i>spo0B</i>	11782 0BNheIFW	11783 0BSphIRV

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para la clonación de los genes del fosforrelevo.

Las construcciones con el plásmido pDR111 se linearizaron con la enzima de restricción *NcoI*. La construcción $P_{\text{Hy}}\text{spo0B}$ -pDR111 se integró en el locus *amyE* del cromosoma de *B. subtilis* 168 Δspo0B , mediante recombinación homóloga. Adicionalmente, las construcciones $P_{\text{Hy}}\text{spo0F}$ -pDR111 y $P_{\text{Hy}}\text{kinA}$ -pDR111 se integraron en cepas distintas en el mismo locus del cromosoma de *B. subtilis* 168.

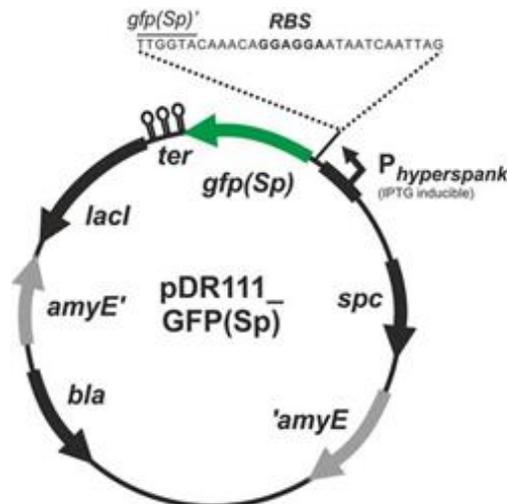


Figura 8. Esquema del vector pDR111_GFP(Sp) utilizado para clonar los genes del fosforrelevo y modular su expresión. Figura tomada de (Overkamp *et al.*, 2013)

5.1.3 Construcción de reporteros fluorescentes para el seguimiento del proceso de esporulación

Las tres cepas mencionadas anteriormente y la cepa WT contienen además a los reporteros $P_{spollQ_GFP}::sacA$ y $P_{spollA_DsRed}::lacA$.

5.1.3.1 Construcción del reportero $P_{spollQ_GFP}::sacA$

La construcción P_{spollQ_GFP} -pSac-Cm consistió en fusionar el promotor del gen *spollQ* a la secuencia correspondiente a la región codificante de la proteína GFP y clonar esta fusión en el plásmido pSac-Cm/ECE174 (Middleton and Hofmeister, 2004) mediante los sitios de restricción *EcoRI* y *BamHI*. pSac-Cm posee regiones homólogas al locus *sacA* de *B. subtilis* 168 lo cual permite su integración en el cromosoma. Además, presenta resistencia a ampicilina (*E. coli*) y cloranfenicol. Las construcciones plasmídicas para este fin, fueron llevadas a cabo por la Dra. Diana Sahonero Canavesi.

Los oligonucleótidos para esta construcción, fueron diseñados por la M. en C. Lizeth Soto y se muestran en la siguiente tabla.

Fragmento	Oligo Fw	Oligo Rv
P_{spollQ}	4821 <i>spollQ</i> _140InF	4822 <i>spollQ</i> _Rv
GFP	4823 Q_GFP_Fw	7533 GFP_R

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de la fusión P_{spollQ} -GFP.

La construcción P_{spollQ_GFP} -pSac-Cm se linearizó con la enzima de restricción *NdeI* previamente a la transformación de *B. subtilis*.

5.1.3.2 Construcción del reportero $P_{spollA_DsRed}::lacA$

La construcción P_{spollA_DsRed} -pBS2E consistió en fusionar el promotor del gen *spollA* a la secuencia correspondiente a la región codificante de la proteína DsRed y clonar esta fusión en el plásmido pBS2E-RFP/ECE258 (Radeck *et al.*, 2013) mediante los sitios de restricción *XbaI* y *NotI*. Este plásmido permite la integración de fragmentos dentro del locus *lacA* del cromosoma de *B. subtilis* 168 y presenta resistencia a ampicilina (*E. coli*) y eritromicina. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de ambos fragmentos que componen la fusión, P_{spollA} y DsRed, se muestran en la siguiente tabla.

Fragmento	Oligo Fw	Oligo Rv
P_{spollA}	5877 pIIAXbaI_FwA	58778 pIIADsRed_RvB
DsRed	5879 pIIADsRed_FwC	5880 pIIANotI_RvD

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para la construcción de la fusión P_{spollA_DsRed} .

Para la digestión del vector pBS2E-RFP, inicialmente se linearizó con la enzima *Xba*I (Roche) en *Buffer* M (Roche). Posteriormente, se realizó una digestión parcial al agregar 0.3 unidades de enzima *Not*I (Thermo Scientific) a 1 µg de DNA linearizado en el mismo *Buffer* M. Esta reacción se llevó a cabo durante 17 horas a 37 °C. La combinación de fragmentos de restricción se utilizó para la ligación con la fusión P_{spol}IIA_DsRed.

La construcción P_{spol}IIA_DsRed-pBS2E se linearizó con la enzima de restricción *Nde*I previamente a la transformación de *B. subtilis*.

5.2 Evaluación de la dinámica de esporulación

5.2.1 Protocolo de esporulación en cultivo líquido

La inducción del proceso de esporulación se realizó utilizando los medios CH y SM (Sterlini and Mandelstam, 1969) sin el uso de antibióticos. Inicialmente, se plaquea a *B. subtilis* a partir de glicerol en una caja con medio LB. Al siguiente día, se realiza el preinóculo en medio fresco CH (medio rico) y se mantiene en agitación a 200 rpm y 37 °C por 12 horas. Al tercer día, las células se cultivan en medio fresco CH y posteriormente, al alcanzar la fase media exponencial, son transferidos al medio de resuspensión (SM), que induce el proceso de esporulación. Este protocolo se esquematiza en la **figura 9** y se describe a detalle en los apéndices 10.3.4 (protocolo) y 10.4.2 (medios): Inducción de la esporulación en *B. subtilis*. En caso de requerirse, se agregó IPTG (10 µM y 100 µM) como inductor al momento de la resuspensión en medio SM, posteriormente a los lavados. A continuación, durante un periodo de 8-10 horas se monitorea la densidad óptica y se toman muestras para analizarse con alguno de los métodos que se describe a continuación.

5.2.2 Análisis de las muestras

5.2.2.1 Conteo en placa de unidades formadoras de colonia (UFC)

De cada tiempo se toman tres muestras: para medición de densidad óptica y para plaqueo de muestras con y sin tratamiento. El tratamiento consiste realizar diluciones seriales hasta obtener una dilución que permita el conteo de colonias en placa (alrededor de -5), y calentar una de las muestras durante 20 minutos a 80 °C. De esta manera, solo las esporas sobrevivirán y esto permite comparar UFC totales contra UFC postratamiento para determinar el porcentaje de esporas obtenido. Las diluciones seriales de las muestras se realizan con medio SM y se plaquean a la brevedad.

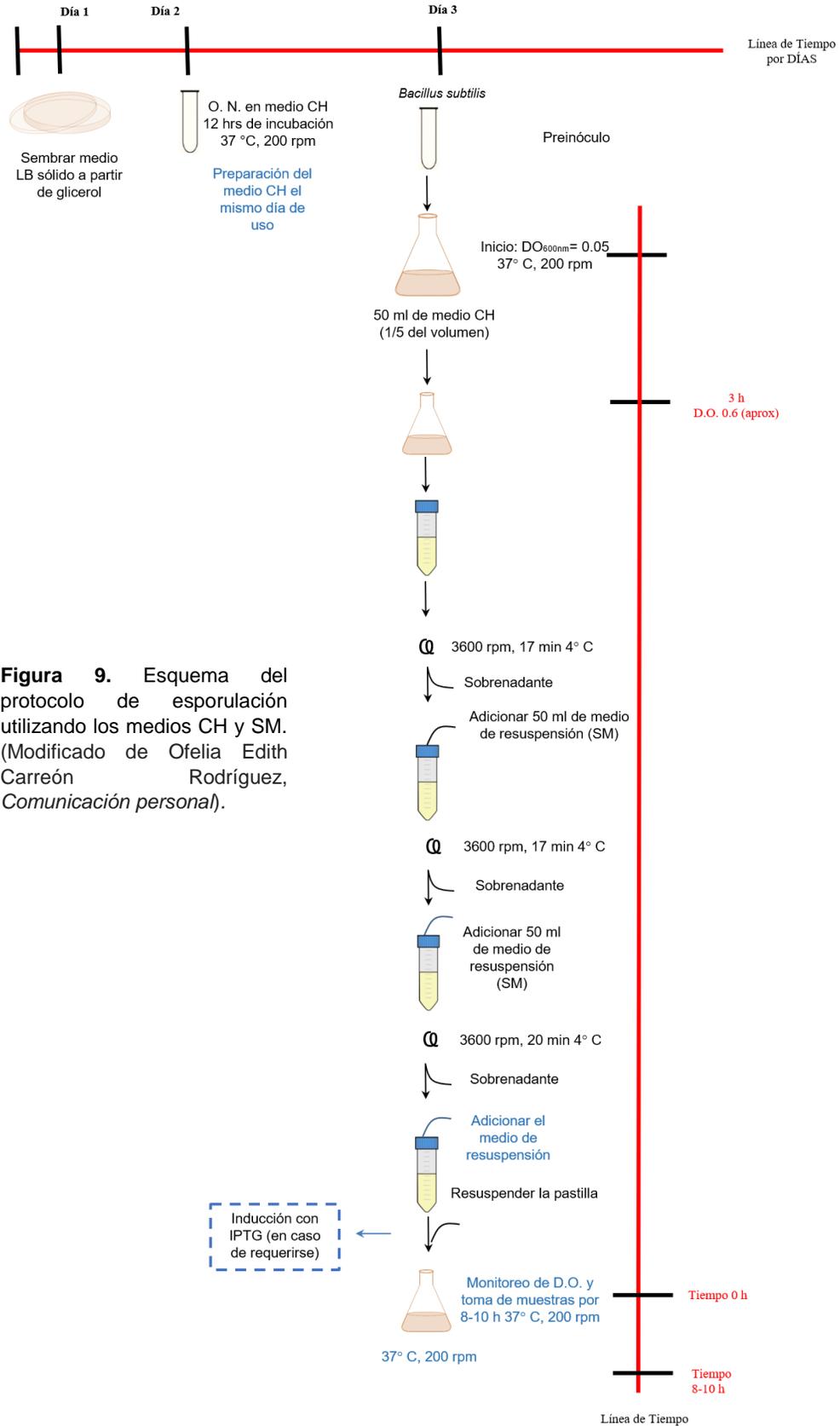


Figura 9. Esquema del protocolo de esporulación utilizando los medios CH y SM. (Modificado de Ofelia Edith Carreón Rodríguez, Comunicación personal).

5.2.2.2 Conteo celular en cámara de Neubauer y determinación de % de esporas

Para el conteo de células totales, se utilizó una cámara de Neubauer que se representa a continuación.

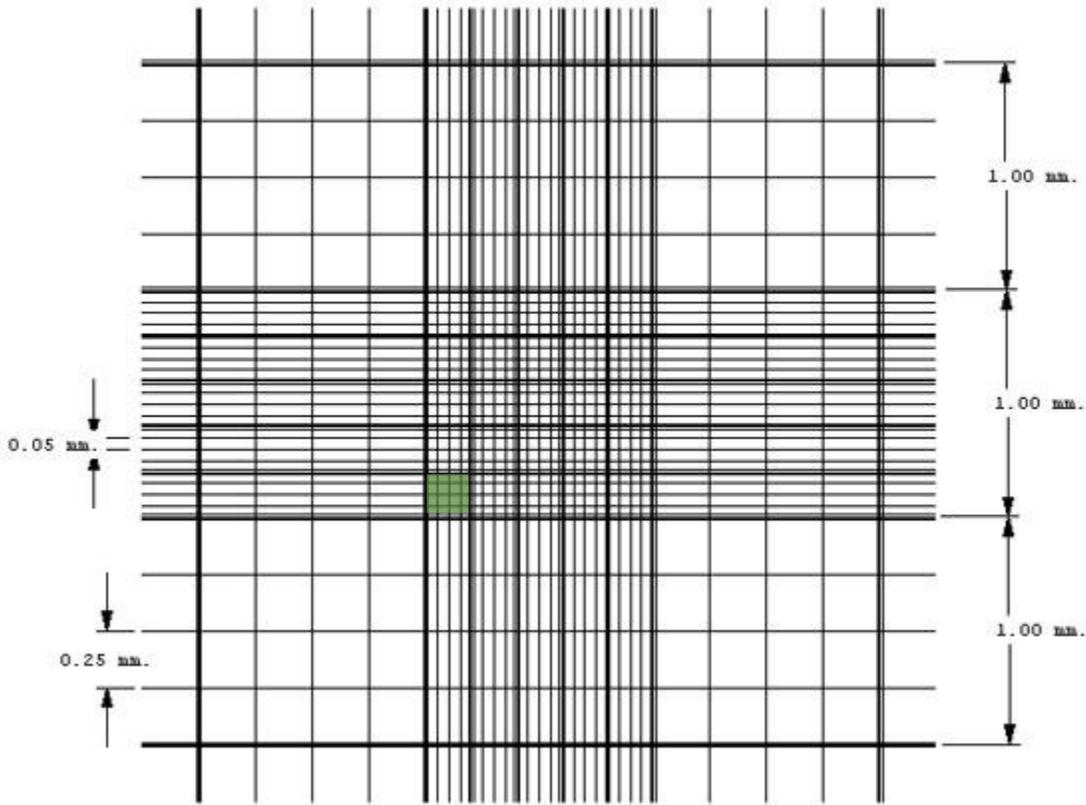


Figura 10. Diagrama de una cámara de Neubauer. Se realizó el conteo de cuatro cuadrantes como el que se representa con un área verde, cuyo volumen corresponde a 0.004 mm^3 .

Para la preparación de las muestras, se toma 1 ml de muestra y se centrifuga a 13000 rpm por 10 min. Las células son lavadas con solución salina (0.9% NaCl, 0.05% Tween 80) y se centrifuga a 13000 rpm por 10 min. Se retira el sobrenadante y el *pellet* se resuspende en agua destilada, ajustando a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0.1.

20 μl de esta preparación se agregan a la cámara de Neubauer, para proceder con el conteo, mientras que 40 μl de esta misma preparación se tiñen para el conteo de esporas, como se describe en el apéndice 10.3.5: Tinción de esporas con verde de malaquita.

La visualización de las células para el conteo en cámara de Neubauer se realizó con un microscopio OPTIPHOT-2, acoplado a una cámara Hitachi KP-D50 Color Digital y un aumento de 40X. La amplificación de la imagen se realizó mediante el programa Image Pro Plus 4.1 Media Cybernetics, MS, U. S. La visualización de las muestras posterior a la tinción con verde de malaquita, así como la toma de fotografías para el conteo de la proporción de esporas, se realizó con este mismo microscopio, utilizando un aumento de 100X.

En la cámara de Neubauer se cuentan 4 cuadrantes (**Figura 10**), y el promedio se utiliza para calcular la concentración de células en la muestra:

$$\frac{cel}{ml} = \frac{\text{Promedio de células por cuadrante}}{0.004 \text{ mm}^3/1000} \times \text{factor de dilución}$$

5.2.2.2 Microscopía de fluorescencia

Se utilizó un microscopio Olympus IX81 invertido, aumento 60 X inmersión en agua. Se toma 1 ml de muestra a analizar y se tiñen con 0.5 μl de DAPI 14.3 mM ([Thermo Fisher Scientific](#)) y 4 μl FMTM 4-64 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ([Thermo Fisher Scientific](#)). La amplificación de la imagen se realiza con el programa $\mu\text{Manager}$ (Micromanager). Las imágenes capturadas se analizan con el programa ImageJ.

5.2.3 Protocolo de esporulación acoplado a microfluídica

El protocolo de esporulación utilizando los medios CH y SM se acopló en este sistema. La toma de muestras continua se reemplazó por un monitoreo a lo largo del tiempo del comportamiento celular mediante microscopía.

En la **figura 11** se muestra el diseño de un microchip tipo quimiostato utilizado en este trabajo.

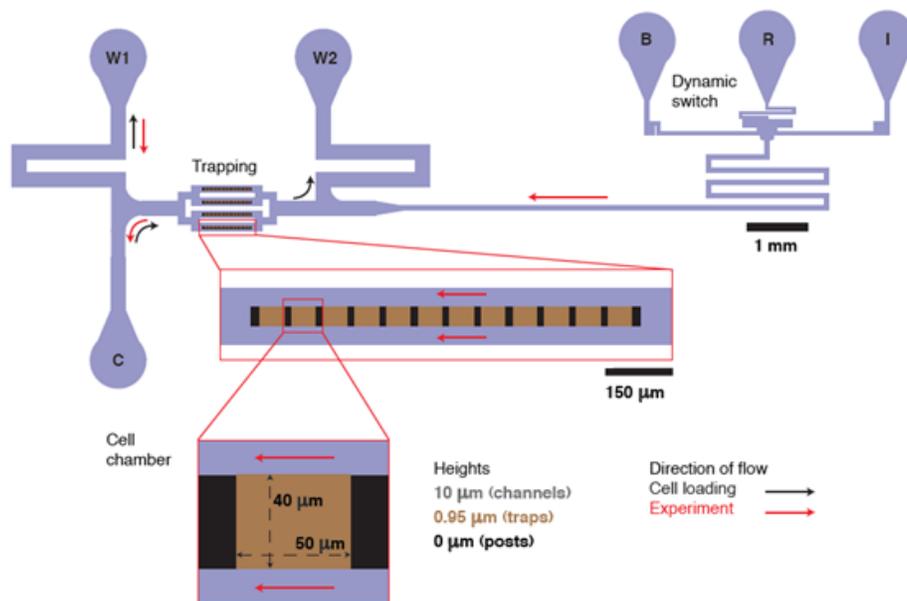


Figura 11. Diagrama de un chip tipo quimiostato. El chip consiste de dos partes: el generador de señal (*switch* dinámico) y la región de trampas, donde 48 cámaras albergan una monocapa con el mismo número de colonias bacterianas. Tomado de Mondragón-Palomino *et al.*, 2011.

El dispositivo consiste de dos partes: una región de trampas y un *switch* dinámico. En la región de trampas se encuentran 48 cámaras rectangulares distribuidas en cuatro columnas. Una cámara celular es una cavidad rectangular con dimensiones 40x50x0.95 μm^3 , con los lados largos abiertos al flujo del medio. En el *switch* dinámico, los medios que ingresan al sistema desde los puertos I y B (*Inducer* y *Background*) se mezclan para generar la señal modulada de inductor. Las soluciones con las que se suministra al sistema están suplementadas con Tween 20 al 0.075 %, y el medio SM con IPTG contiene rodamina.

A partir de un preinóculo ON, se crecen 200 ml de cultivo hasta alcanzar una D. O. $_{600\text{ nm}}$ de 0.25. Este cultivo se centrifugó y las células se resuspendieron en 5 ml de medio fresco suplementado con 0.075% de Tween 20. Las células se introdujeron en el dispositivo a través del puerto C. Para suministrar a las células con medio fresco, la presión hidrostática en los puertos C, W1 y W2 se ajustó para que el puerto C se convirtiera en el receptor del flujo de las trampas y del agua que fluye a partir del puerto W1. (Mondragón-Palomino *et al.*, 2011).

VI. DISCUSIÓN Y RESULTADOS

6.1 Construcción de un sistema que permita la modulación del gen *spo0B*

Para la selección de vectores utilizados durante este trabajo se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

a) Adecuación al sistema

Se sabe que el número de copias de un plásmido entre célula y célula de una población puede variar, lo que influye en la estocasticidad de la expresión de los genes dentro de estos plásmidos. Para evitar esto, todas las construcciones se realizaron en vectores que permiten su inserción en el cromosoma de *B. subtilis*. Por otro lado, esta estrategia permite no utilizar antibióticos para el mantenimiento de los plásmidos dentro de las cepas para evitar añadir más estímulos de estrés a las células durante la inducción de la esporulación. Aunado a esto, los casetes de resistencia disponibles asociados a determinados vectores integrativos, disminuyó ampliamente las posibilidades para la inserción de construcciones de interés.

b) Efecto de la integración de secuencias en determinados loci en *B. subtilis*

Durante este trabajo, se realizó la inserción de construcciones a través de la interrupción de los loci *amyE*, *sacA* y *lacA*. Las proteínas codificadas por estos genes no forman parte del metabolismo central de las bacterias y durante la manipulación de las cepas construidas no se utilizan los azúcares a las que se encuentran relacionados estos loci (i. e. almidón, sacarosa y lactosa, respectivamente). Al realizar la interrupción del locus *thrC*, se ha observado un crecimiento más lento respecto a la cepa WT (Morales-Galeana Natali, comunicación personal). Adicionalmente, existen estudios en los que se evalúa el efecto en el crecimiento y la esporulación en cepas en las que se insertan los vectores vacíos mediante recombinación homóloga e interrupción de determinados loci (Middleton and Hofmeister, 2004). A pesar de que no se detectaron cambios drásticos en la eficiencia de esporulación respecto a la cepa WT, inserciones en los loci *pyrD* y *gltA*, provocan un aumento o disminución de alrededor del 15 % de esporas. Además, requieren la suplementación con uracilo o glutamato, respectivamente. Finalmente, se observó que la concentración de glutamato en el medio influye en la DO a la que los cultivos alcanzan la fase estacionaria. Este conjunto de modificaciones, podría influir en el estado de estrés de la célula durante la inducción de la esporulación y en los resultados obtenidos.

6.1.1 Construcción y evaluación de la capacidad de esporulación de la cepa $\Delta spo0B$

6.1.1.1 Construcción de la cepa $\Delta spo0B$

La expresión de *spo0B* es muy baja dentro de la célula en la cepa WT (De Jong *et al.*, 2010 a; Eswaramoorthy *et al.*, 2010 b), por lo que se requiere la eliminación de la expresión de fondo de *spo0B* bajo su promotor nativo. La construcción de la cepa nula en *spo0B* permite inducir la expresión de este gen en tiempos y concentraciones específicas al transformar esta cepa con una versión inducible del gen *spo0B* (descrito en secciones posteriores).

El sistema Cre-Lox es una herramienta que permite realizar determinadas modificaciones en el genoma de diversos organismos, al reconocer sitios *loxP* en su DNA blanco. Esta proteína puede llevar a cabo inversión, deleción o translocación de secuencias, dependiendo del sentido en el que se encuentren orientados los sitios *loxP*. Se colocaron dos sitios *loxP*, uno en cada extremo del casete de resistencia a espectinomicina, direccionados en el mismo sentido (**Fig. 12**), lo cual permite la remoción del casete en pasos posteriores. El vector termosensible pCRM-Ts-Phleo permite la expresión constitutiva de la recombinasa Cre y la funcionalidad de este sistema fue previamente evaluada en *B. subtilis* (Cabrera-Valladares *et al.*, 2012). Este plásmido solo es capaz de replicarse a 30 °C, por lo que el cultivo de la cepa a 42 °C posteriormente a la remoción del casete de espectinomicina, promueve la pérdida del plásmido.

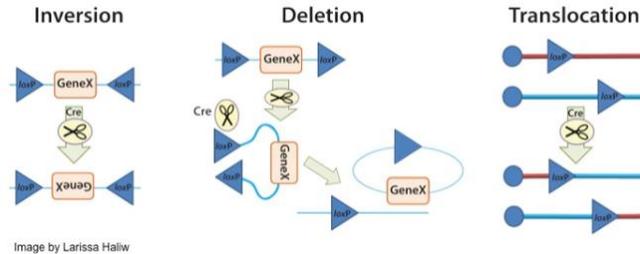


Figura 12. Esquema del efecto de la direccionalidad de los sitios *loxP* en el sistema de recombinación Cre-Lox.

En la **figura 13** se representa el flujo de las modificaciones del locus del operón *spo0B-obgE* que se realizaron en *B. subtilis*.

El reemplazo del gen *spo0B* por el gen de resistencia a espectinomicina sobre la cepa *B. subtilis* 168 WT se evaluó mediante PCR a partir de DNA cromosomal utilizando los oligonucleótidos 5208 y 5213 los cuáles se aparean con regiones río arriba y río abajo de *spo0B* respectivamente.

El peso esperado del fragmento amplificado en *B. subtilis* 168 WT es de 2121 pb, mientras que, si la inserción del casete de espectinomicina se llevó a cabo adecuadamente, el fragmento esperado es de 2678 pares de bases como se puede observar en la **figura 14**.

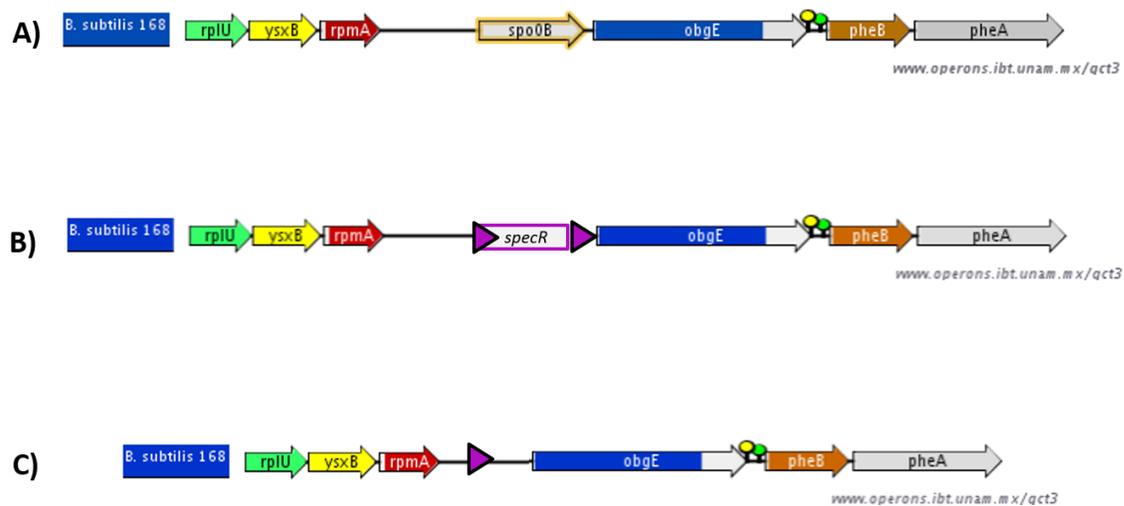


Figura 13. Esquema del flujo de las modificaciones genéticas realizadas en el locus del operón *spo0B-obgE*. En la figura se muestra el contexto genómico del operón *spo0B-obgE*. A) Contexto nativo del operón *spo0B-obgE*. B) Reemplazo del gen *spo0B* por casete de espectinomicina flanqueado por sitios *loxP* (triángulos morados). C) Representación final del locus posteriormente a la delección del gen *spo0B*.

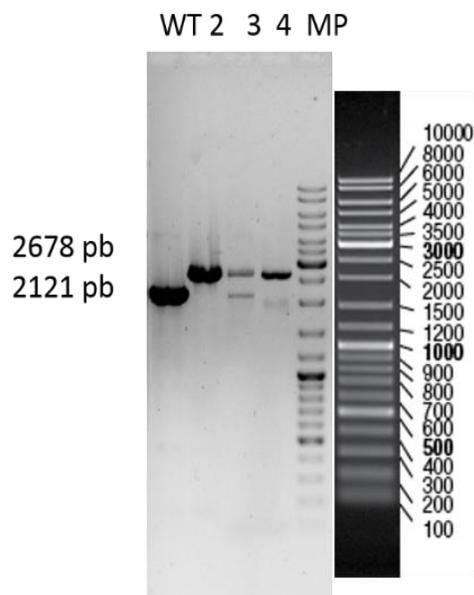


Figura 14. PCR de comprobación del reemplazo de *spo0B* por casete de resistencia a espectinomicina. WT: Control WT (2121 pb); Clonas evaluadas 2, 3 y 4, peso esperado de 2678 pb; MP: Marcador de peso molecular.

Posteriormente, la escisión del casete de espectinomicina se comprobó mediante PCR, como se muestra en la **figura 15**. Se utilizaron nuevamente los oligonucleótidos 5208 y 5213 y en el caso de ser clonas positivas, el peso esperado es de 1600 pb. La escisión del casete de espectinomicina del genoma permite la posibilidad del uso del casete de

resistencia a espectinomicina para la subsecuente transformación de esta cepa con plásmidos que brinden esta resistencia.

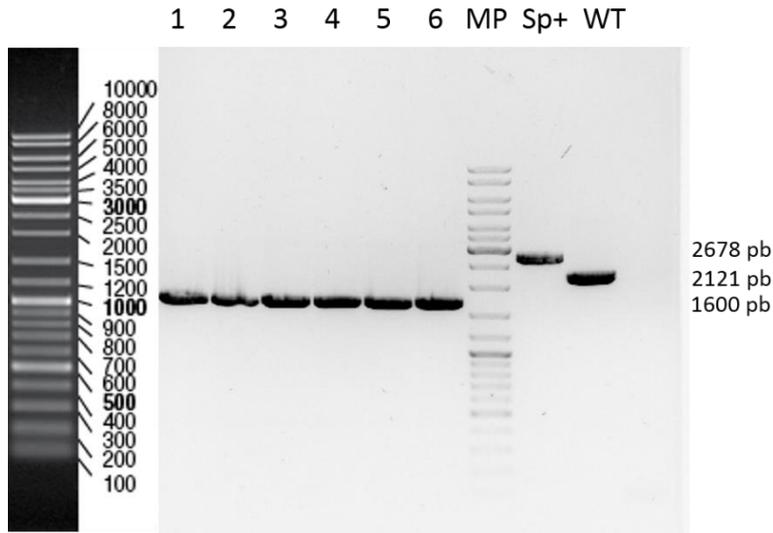


Figura 15. PCR de comprobación de la escisión del casete de espectinomicina utilizando la técnica de recombinación Cre-lox. 1-6, clonas evaluadas donde todas se observan positivas (1600 pb); MP: Marcador de peso molecular; Sp+, Control con la fusión 0BU_{Up}_spec_Dw insertada en el cromosoma (2678 pb). WT: Control WT (2121 pb).

El uso de esta metodología resulta en la delección de la región codificante de *spo0B*, sin modificar la secuencia original, exceptuando por un sitio *loxP* que se mantiene dentro del cromosoma posteriormente a la remoción. De esta forma, las regiones río arriba (320 pb) y río abajo (33 pb) de *spo0B*, no se modifican. Esta estrategia fue elegida debido a que *spo0B* forma un operón con el gen *obgE*, siendo cabeza del mismo. A pesar de que aún no se conoce su función con certeza, se sabe que la proteína Obg es una proteína asociada a ribosoma de unión a GTP que es necesaria para el crecimiento, esporulación e inducción del regulón general de estrés de la bacteria o GSR por sus siglas en inglés (Kuo *et al.*, 2008). Por ello, se decidió no utilizar una estrategia de delección que produjera efectos drásticos en el nivel de expresión de *obg*.

Aunque en BGSC se encuentran depositadas mutantes del gen *spo0B*, ninguna de ellas se adecua a nuestros estudios. En primer lugar, en algunas de estas mutantes el gen de interés no se encuentra deletado (Hoch and Mathews, 1973; Lamont and Mandelstam, 2009), si no que presenta mutaciones puntuales o sin sentido, lo que produce versiones no funcionales y/o trunca de la proteína Spo0B que podrían interactuar con Spo0B producida bajo el promotor IPTG inducible (construcción descrita en secciones posteriores) e interferir con la función de la fosfotransferasa. Spo0B actúa en dímeros que interactúan mediante la formación de un *bundle* de cuatro hélices, donde cada par de hélices es proporcionado por un monómero de Spo0B (Hoch *et al.*, 2004). Incluso la mutante con la versión truncada de Spo0B contiene esta región de interacción, lo que podría generar una combinación de interacciones entre monómeros funcionales y no funcionales, o formar interacciones no funcionales completamente. En segundo lugar, otras estrategias en las que el gen *spo0B* sea reemplazado por un determinado casete de resistencia, inhabilita el uso de este casete de resistencia para futuras transformaciones de la cepa construida.

6.1.1.2 Evaluación de la cepa $\Delta spo0B$

6.1.1.2.1 Morfología de colonias

La morfología de las colonias de *B. subtilis* 168 $\Delta spo0B$ cambia de manera notoria respecto a la cepa WT, como se compara en la siguiente tabla.

Morfología de colonias	
WT	$\Delta spo0B$
Rugosas	Lisas
Pequeñas	Alargadas
Opacas	Translúcidas
Ligeramente amarillas	Blancas
Bordes irregulares y dentados	Bordes redondeados

Tabla 6. Características morfológicas diferenciales entre la cepa $\Delta spo0B$ y la cepa WT.

El gen *spo0B*, acuña su nombre a que forma parte de un grupo de genes que provocan que las células de *B. subtilis* no puedan formar esporas, y por el contrario, se detengan en la etapa 0 de esporulación (Hoch, 1976), en la que aún no hay cambios morfológicos evidentes y prácticamente la célula presenta un fenotipo de célula vegetativa.

El efecto de una mutante nula de *spo0B*, se ha descrito previamente como pleiotrópico, donde no todos los rasgos que se modifican se encuentran equitativamente relacionados a esporulación. (Guespin-Michel, 1971). La morfología de colonias se puede explicar con a) la ausencia de esporas en las colonias provoca parte de la pérdida del fenotipo WT (Wang *et al.*, 2017) y b) aunque no se han evaluado a fondo los efectos pleiotrópicos de esta mutante, se han observado fenotipos similares en mutantes de matriz extracelular previamente (Carpentier, 2014). Esto podría explicarse debido a que las cascadas de señalización de producción de matriz extracelular y esporulación se interconectan principalmente por el regulador maestro Spo0A.

6.1.1.2.2 Evaluación de la capacidad de esporulación de la cepa $\Delta spo0B$

Como comprobación de la ausencia de capacidad de esporulación de nuestra cepa se realizaron protocolos de inducción de la esporulación como se describe en la metodología

en la sección 5.2.1. Los análisis de las muestras se realizaron de la siguiente manera (sección 5.2.2):

A) Conteo en placa de unidades formadoras de colonia (UFC)

Este experimento se realizó por triplicado. Posteriormente a la resuspensión en el medio SM, se tomó muestra del tiempo 0 y del tiempo 10. En las muestras que se sometieron a tratamiento (20 minutos a 80 °C), el conteo de UFC fue cero en todos los casos.

B) Microscopía de fluorescencia

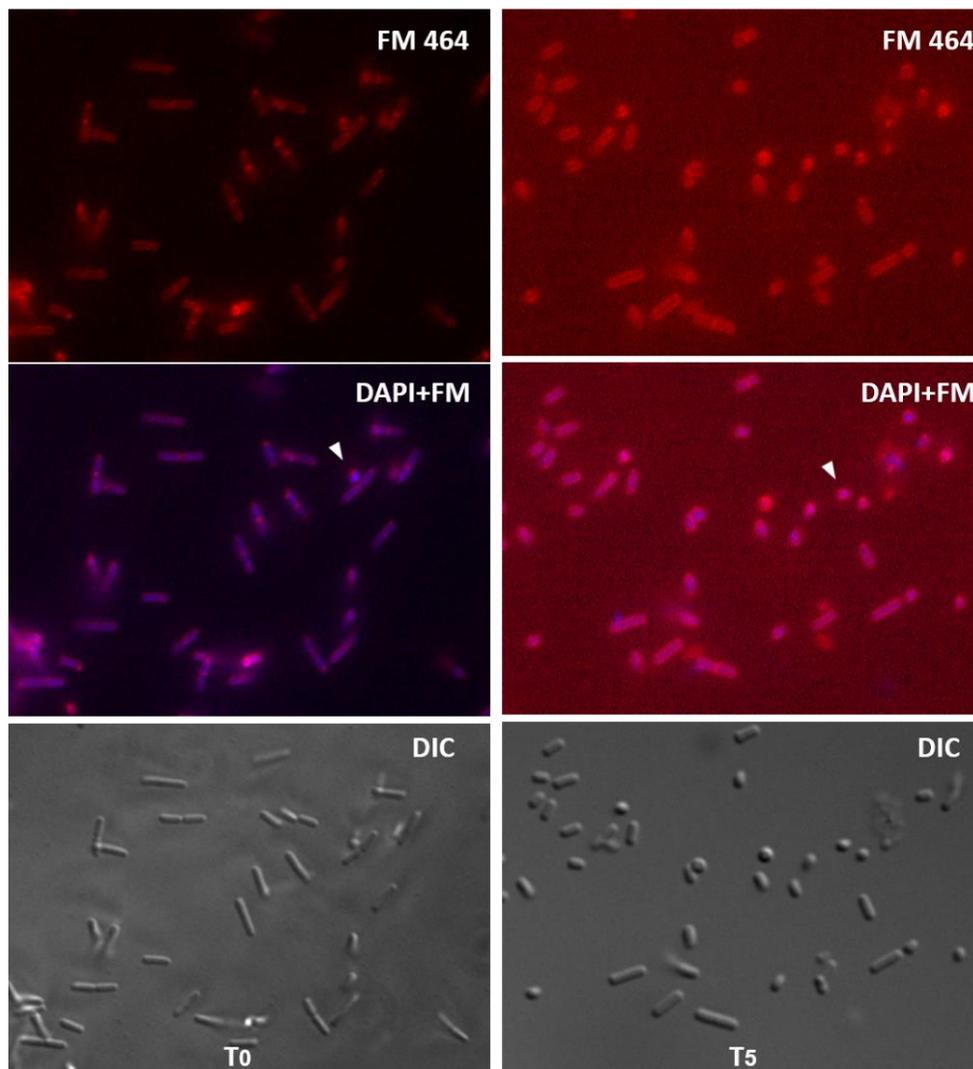


Figura 16a. Tinción de células $\Delta spo0B$ durante inducción de la esporulación en tiempo 0 y 5 posteriormente a la resuspensión en medio SM. Triángulos blancos: Posible aborto de la esporulación.

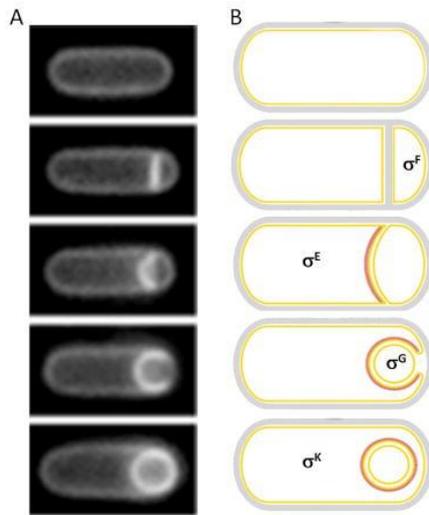


Figura 16b. Morfología de una célula que esporula. A) Durante el inicio de la esporulación, las células presentan una morfología como la de una célula vegetativa. Posterior a ello, las células forman un septo asimétrico, que luego procede a curvarse para llevar a cabo el engullimiento que se completa con la pérdida de unión entre la prespora y la célula madre. B) Asimetría genética. Estos cambios morfológicos están acompañados por la activación de factores de transcripción específicos en cada compartimento. Inicialmente, σ^F se activa solo en la prespora, seguido de σ^E en la célula madre, σ^G en la prespora y finalmente σ^K en la célula madre. Modificada de Higgins and Dworkin, 2012.

En la **figura 16a** se puede observar el comportamiento de la cepa nula en *spo0B* durante la inducción de la esporulación. Tanto en el tiempo 0 como en el tiempo 5, no se observaron esporas, si no células vegetativas que presentaban septo simétrico característico de la división celular, pero no formación de septo asimétrico característico de la esporulación (**figura 16b** como referencia de morfología). Se lograron observar células circulares pequeñas, cuya frecuencia aumentó conforme avanzaba el tiempo de resuspensión en medio SM. Recientemente se ha reportado un fenotipo muy similar como abortos de la esporulación en células WT (Soufo, 2016). Con los resultados de inducción de la esporulación en cultivo líquido y su evaluación mediante calentamiento y microscopía de fluorescencia, se concluye que nuestra cepa nula no puede esporular, como se había reportado anteriormente.

6.1.2 Modulación de los niveles de expresión de *spo0B* y de otros componentes del fosforrelevo

De acuerdo al modelo descrito previamente en el laboratorio, se diseñó un sistema para modular la expresión de *spo0B* y producir altos niveles de la proteína Spo0B, con el objetivo de generar un patrón similar al de la **figura 6**, descrita en antecedentes.

El plásmido pDR111 se eligió para la clonación de los genes del fosforrelevo bajo un promotor inducible. Dentro de otras posibilidades de promotores inducibles que se han implementado en *B. subtilis*, tales como inducción por azúcares como xilosa, se eligió un promotor inducible por IPTG debido a que, a diferencia de otros inductores, este no es metabolizable por las células, por lo que no fungiría como una señal de nutrientes en el medio durante nuestros protocolos de esporulación. pDR111 posee una forma modificada del promotor P_{spac} , $P_{\text{hyper-spac}}$, con una única mutación de transversión G a T en la posición -1, que permite una mayor sensibilidad del promotor respecto a la inducción con IPTG. pDR111 contiene tres terminadores transcripcionales de pMUTIN4 río arriba del $P_{\text{hyper-spac}}$

para evitar la transcripción *read-through* y un segundo operador lacO insertado río arriba del primero (Bara, 2010). Por lo tanto, teóricamente, esta versión mejorada del promotor P_{spac} , permite una regulación más fina de la expresión génica y una sobreproducción más eficiente de la proteína de interés. Más aún, diversos estudios en los que se analiza la sobreexpresión de otros genes del fosforrelevo distintos a *spo0B* hacen uso de este vector específico, lo cual permite comparar los resultados obtenidos y a obtener en un futuro. Además, nos permitió tener referencias de parámetros de inducción a utilizar, como por ejemplo, concentraciones de IPTG durante la inducción.

6.1.2.1 Clonación de genes del fosforrelevo bajo el promotor $P_{\text{Hyperspank}}$

En la literatura (Fujita and Losick, 2005 a), previamente se han descrito oligonucleótidos para hacer más eficiente la traducción de genes del fosforrelevo. Basándonos en estos resultados, para el diseño de los oligonucleótidos para la expresión de *spo0B*, *kinA* y *spo0F*, se utilizó un espaciador y un Shine-Delgarno que han permitido la expresión eficiente de las cinasas KinA-E. Una breve descripción de los oligonucleótidos utilizados se presenta en el recuadro de características a continuación.

a) Código de colores:			
NUCLEÓTIDOS EXTRA REGIÓN CODIFICANTE	SITIO DE RESTRICCIÓN FIN DE REGIÓN CODIFICANTE.	ESPACIADOR Y SD	INICIO DE
b) Representación general de los oligonucleótidos			
NheIFw			
GGA CAT GCT AGC	ACA TAA GGA GGA ACT ACT	<u>NNN NNN NNN NNN NNN</u>	
SphIRv			
AGG AAT AGC ATG CNN	NNN NNN NNN NNN		

En la **figura 17** se muestran las construcciones utilizadas para la inserción de las versiones inducibles por IPTG de los genes del fosforrelevo en cepas separadas. En los esquemas se denota que el plásmido pDR111 permite la integración del plásmido dentro del locus *amyE* de *B. subtilis*.

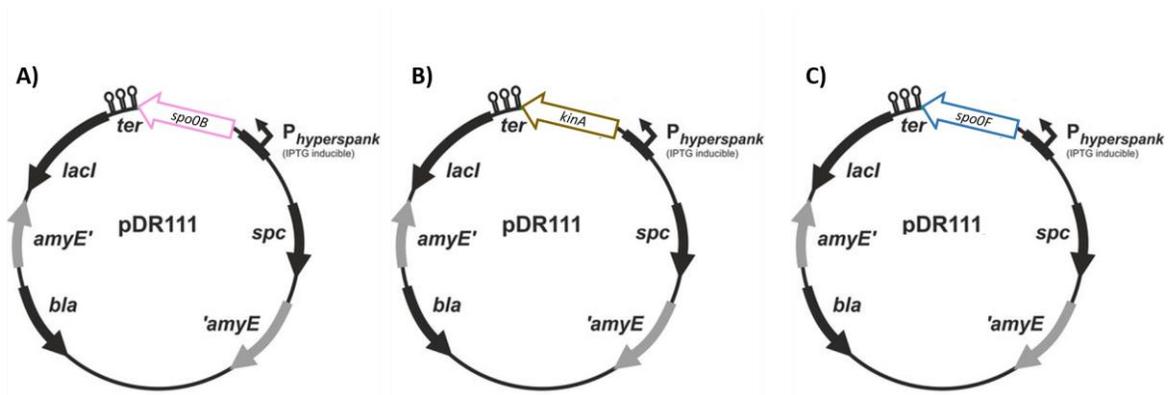


Figura 17. Plásmidos construidos para la inducción de la expresión de genes del fosforrelevo. A) P_{Hy}-*spo0B*-pDR111, B) P_{Hy}-*kinA*-pDR111 y C) P_{Hy}-*spo0F*-pDR111.

6.1.2.2 Construcción de las cepas inducibles por IPTG

Cronológicamente, *B. subtilis* 168 WT se transformó con la construcción P_{spoIIQ}-GFP-pSacCm que genera la cepa P_{spoIIQ}-GFP::*sacA* (construcción descrita en la sección 6.1.3.1). Todas las modificaciones genéticas (excepto la construcción de la cepa Δ *spo0B*) se realizaron sobre esta cepa.

a) Integración de P_{Hy}-*spo0B*-pDR111 en el cromosoma de *B. subtilis*

La cepa mutante nula en *spo0B* (Δ *spo0B*) se transformó con el plásmido P_{Hy}-*spo0B*-pDR111. Para la verificación de clonas se utilizaron los oligonucleótidos que aparean dentro del locus *amyE* (oamyE_450FW (#5220) y oamyE_750RV (#5221)) y amplifican un fragmento de 800 pares de bases en la cepa *B. subtilis* 168 WT y un fragmento de 4200 pb en clonas positivas (**figura 18**).

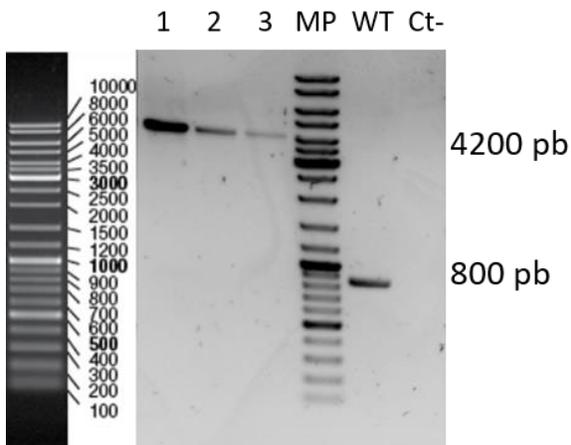


Figura 18. Comprobación de las clonas Δ *spo0B*/P_{Hy}-*spo0B*::*amyE*, numeradas del 1 al 3 MP: Marcador de peso molecular. Ct-: Control negativo

En la **figura 19**, como control se observa un fragmento de 800 pb que corresponde a parte del locus *amyE* WT. En el caso de la inserción de *spo0F*-pDR111 en el locus *amyE* se espera un tamaño de 4000 pb y en el caso de la inserción de *kinA*-pDR111 en el locus *amyE*, el peso esperado es de 5500 pb.

Es importante destacar que al realizar la complementación de la cepa nula $\Delta spo0B$ con la versión inducible de *spo0B*, el fenotipo WT se recupera en cultivo sólido previamente a la inducción con IPTG (las características diferenciales de la cepa WT y la cepa $\Delta spo0B$ se presentan en la **tabla 5**). Este fue el primer indicio de que el promotor $P_{Hyperspank}$ presenta escape de la expresión, como se corrobora en secciones posteriores.

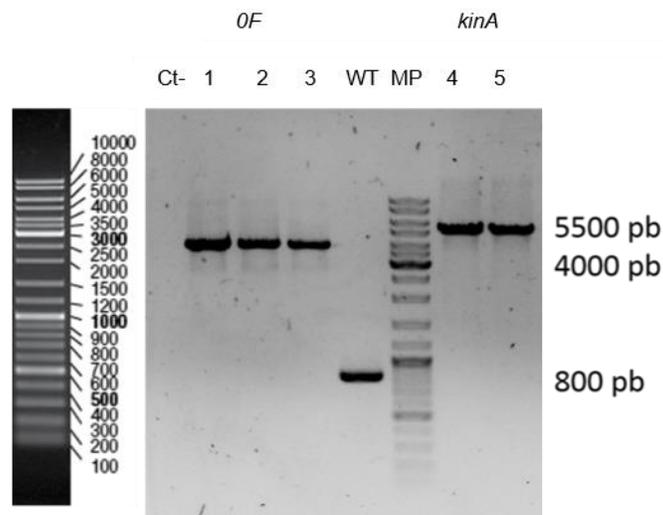


Figura 19. Comprobación de clonas $P_{Hy-spo0F}::amyE$ (Carriles 1, 2 y 3) y $P_{Hy-kinA}::amyE$ (Carriles 4 y 5). WT, control de amplificación del locus *amyE* WT; MP, marcador de peso molecular. Ct-: Control negativo

6.1.3 Integración de reporteros fluorescentes en *B. subtilis*

Para construir a los reporteros de la esporulación se realizaron fusiones traduccionales que generaron a P_{spoIIA} -DsRed y P_{spoIIQ} -GFP, como se muestran en la **figura 20**. La combinación de estos reporteros permite un análisis completo de la dinámica de esporulación. Los reporteros fluorescentes construidos permitirán el análisis del comportamiento de nuestras cepas mediante análisis con técnicas como microscopía de fluorescencia, citometría de flujo y microfluídica. Por un lado, P_{spoIIQ} -GFP se activa en células que terminarán la formación de la spora. Nuestro proyecto plantea que la concentración de Spo0B afecta directamente la proporción de células que deciden iniciar el proceso de esporulación, sin embargo, la esporulación podría no completarse. Para detectar las células en las que ocurre este comportamiento, se construyó al reportero P_{spoIIA} -DsRed, el cual se activa en tiempos muy cercanos a la toma de decisión de iniciar la esporulación.

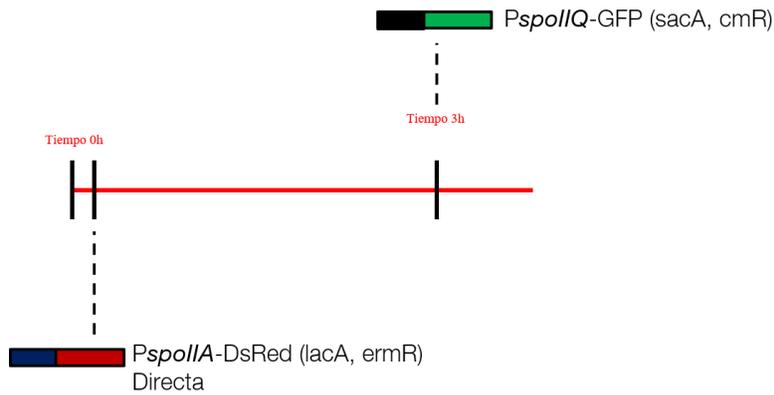


Figura 20. Representación de los reporteros P_{spollA} -DsRed y P_{spollQ} -GFP. El promotor P_{spollA} se activa en tiempos iniciales de la esporulación y está directamente regulado por Spo0A-P. P_{spollQ} se activa alrededor de las 3 horas (compromiso a esporulación), durante el engullimiento de la prespora.

6.1.3.1 Construcción de las cepas P_{spollQ} -GFP::*sacA*

El gen reportero P_{spollQ} -GFP corresponde a una fusión de la región codificante de la proteína GFP y el promotor del gen *spollQ*. Esta construcción permite el seguimiento del compromiso a esporular de una célula de *B. subtilis*. El compromiso es el punto en el que la formación de la espora se vuelve irreversible. SpoIIQ es una enzima hidrolítica, presente en membrana, que facilita el engullimiento, por lo que se activa alrededor de tres horas posteriormente al inicio de la esporulación (Errington, 2003).

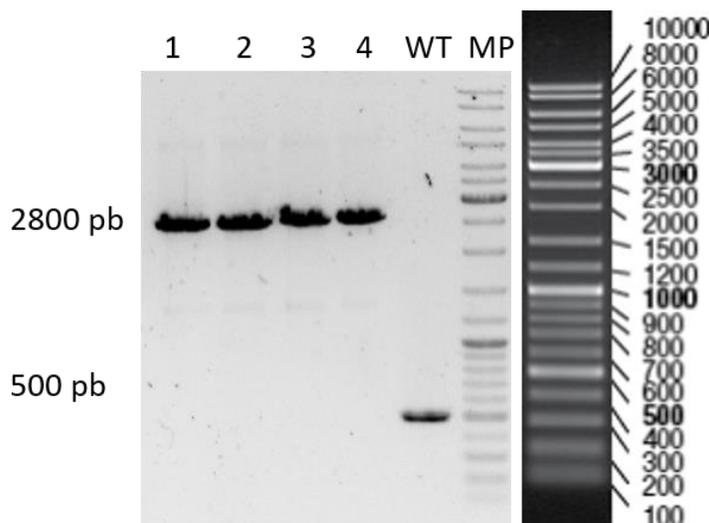


Figura 21. Comprobación de la integración del vector P_{spollQ} -GFP_pSac-Cm de carril 1) WT, carril 2) $\Delta spo0B/P_{Hy} spo0B::amyE$, carril 3) $P_{Hy} spo0F::amyE$ y carril 4) $P_{Hy} kinA::amyE$. WT: Amplificación del locus *sacA* WT. MP: Marcador de peso molecular.

Posterior a la transformación de *B. subtilis* 168 WT con la construcción P_{spollQ} -GFP_pSac-Cm, fueron evaluadas clonas al azar utilizando oligonucleótidos que aparean dentro del locus *sacA* y que amplifican un fragmento de 500 pares de bases en la cepa *B. subtilis* 168 WT y un fragmento de 2800 pb en clonas positivas (**figura 21**).

6.1.3.2 Construcción de las cepas P_{spollA} -DsRed::*lacA*

El promotor del gen reportero P_{spollA} -DsRed se ha utilizado con anterioridad (Veening *et al.*, 2009). *spollA* está conformado por tres cistrones: *spollAA*, *spollAB* y *spollAC*. Este operón constituye un sistema de regulación en el que SpollAA actúa como antagonista de SpollAB. A su vez, SpollAB es el antagonista del producto de *spollAC*, el factor sigma F (σ^F) (Schmidt *et al.*, 1990). De esta manera, SpollAA es un factor anti antisigma de σ^F . El factor σ^F de *Bacillus subtilis* es un factor sigma de la RNA polimerasa que gobierna la transcripción de genes específicos durante el proceso de esporulación. El factor σ^F dirige la expresión génica en el compartimiento de las presporas del esporangio en la fase del desarrollo en la que se forma el septo asimétrico (Decatur and Losick, 1996).

La posibilidad de seguir el comportamiento de un gen regulado directamente por Spo0A-P (*spollA*) en tiempos iniciales de la esporulación permite correlacionar su activación con el alcance de la concentración de Spo0A-P suficiente para iniciar la esporulación. Se ha reportado que la expresión de *spollA* se activa entre las 0 y 1 hrs posteriormente a la resuspensión en medio de esporulación SM (Veening *et al.*, 2005).

En la **figura 22**, se observa un diagrama del plásmido pBS2E-RFP que permite la inserción de fragmentos de DNA en el locus *lacA*. También se observan los posibles sitios de restricción a utilizar para clonación. Los sitios de restricción *Pst*I, *Eco*RI y *Spe*I no pueden ser utilizados para la construcción de la fusión del promotor de *spollA* con la proteína fluorescente DsRed porque estos sitios se encuentran dentro de la secuencia de la propia fusión. Por tal motivo se decidió utilizar los sitios de restricción *Xba*I y *Not*I. Debido a que el plásmido pBS2E-RFP posee 4 sitios de corte de *Not*I se diseñó una estrategia para digerir de forma parcial al plásmido.

La digestión del vector pBS2E sin purificar, se utilizó para la ligación con el fragmento P_{spollA} . La combinación de posibles ligaciones P_{spollA} -DsRed-pBS2E es diversa. Algunas de ellas es posible descartarlas visualmente. En primera instancia, el color presente en la colonia nos permite discernir si es positiva o no. El plásmido pBS2E está diseñado de manera que al insertar un fragmento dentro del sitio múltiple de clonación utilizando dos enzimas de restricción, este reemplaza la región que contiene a la secuencia de la proteína RFP debido a que se escinde del vector. Este procedimiento permite una selección de colonias rosa intenso (clonación no exitosa) o blanco (reemplazo de RFP). En nuestro caso, el inserto para esta construcción contiene a la región codificante de la proteína DsRed. A pesar de ello, la selección de clonas visualmente es posible, debido a que DsRed se encuentra bajo un promotor específico de diferenciación de *B. subtilis*, por lo que, tal como se observó, no se expresó de forma eficiente en *E. coli*.

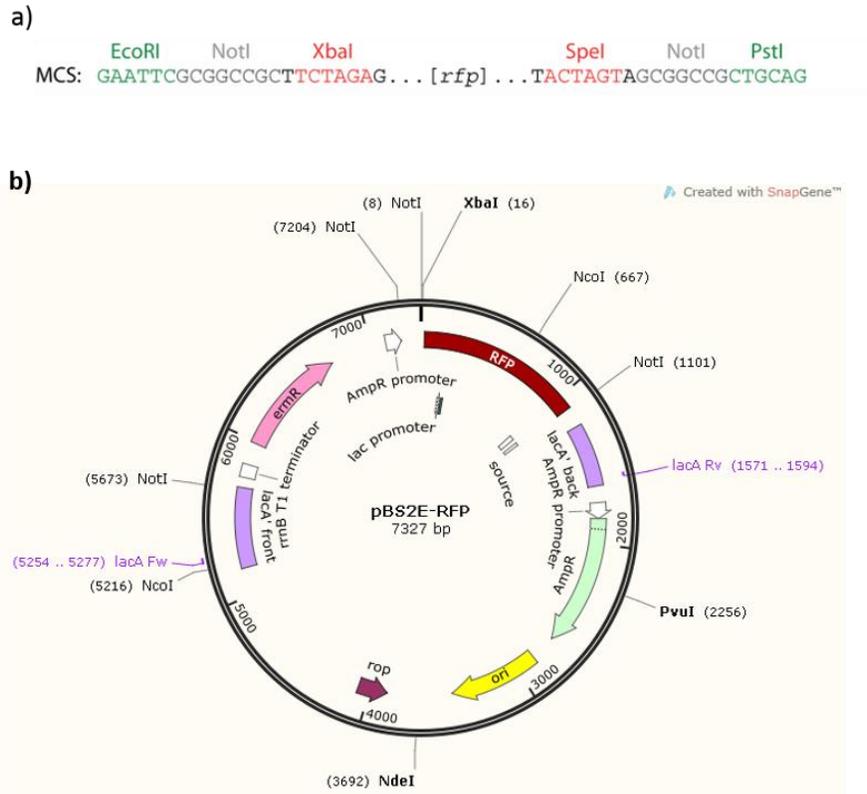


Figura 22. Características del vector pBS2E-RFP a) Esquema de sitio múltiple de clonación del vector pBS2E-RFP y b) Diagrama del vector pBS2E-RFP mostrando los 4 sitios de restricción de la enzima *NotI*.

Las cepas transformadas con el plásmido P_{spollA} -DsRed-pBS2E son las siguientes:

- P_{spollQ} -GFP::*sacA*
- P_{spollQ} -GFP::*sacA* + $P_{Hy}spo0B$::*amyE* + $\Delta spo0B$
- P_{spollQ} -GFP::*sacA* + $P_{Hy}spo0F$::*amyE*
- P_{spollQ} -GFP::*sacA* + $P_{Hy}kinA$::*amyE*

Las colonias candidatas de *B. subtilis* se evaluaron mediante los oligonucleótidos *lacA* (3544 o Fw y 3545 o Rv).

En la **figura 23 y 24**, se muestran los resultados de la verificación de las clonas. El control WT muestra un amplicón de 1900 pb, mientras que las clonas en las que se logró la adecuada integración del reportero P_{spollA} -DsRed, presentan un amplicón de 3834 pb.

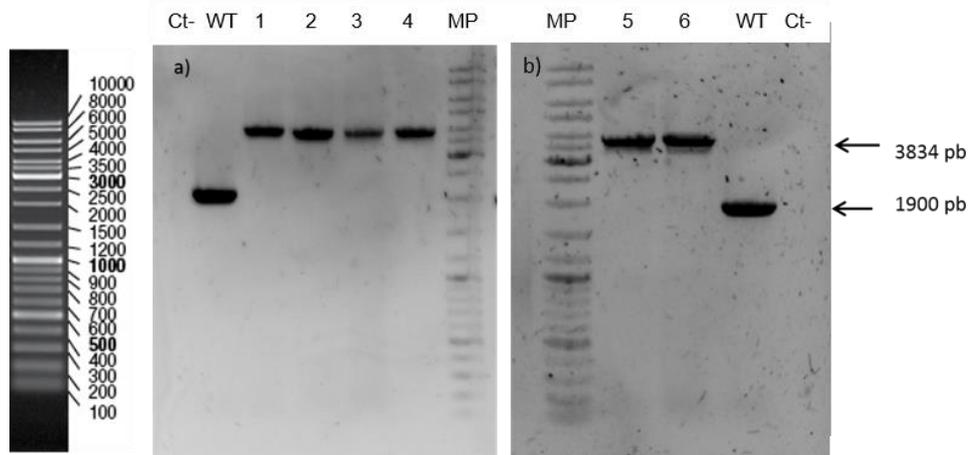


Figura 23. Comprobación de la integración de P_{spoIIA} -DsRed-pBS2E en el locus *lacA* de a) Carriles 1 y 2: P_{spoIIQ} -GFP::*sacA*, carriles 3 y 4 P_{spoIIQ} -GFP::*sacA*/ $P_{Hy spo0F}$::*amyE*. b) P_{spoIIQ} -GFP::*sacA*/ $P_{Hy kinA}$::*amyE*. WT: Amplificación del locus *lacA* WT. MP: Marcador de peso molecular.

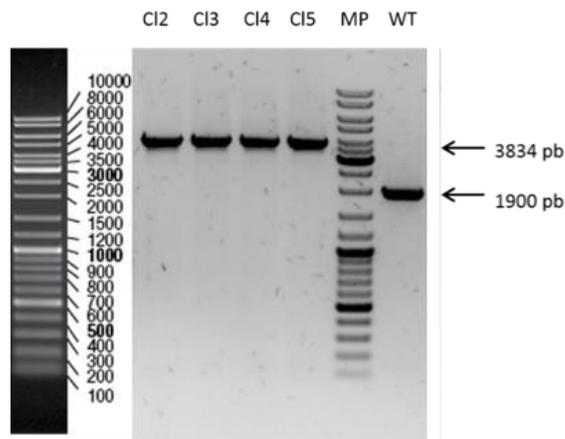


Figura 24. Comprobación de la integración de P_{spoIIA} -DsRed-pBS2E en el locus *lacA* de P_{spoIIQ} -GFP::*sacA* + $\Delta spo0B$ + $P_{Hy spo0B}$::*amyE* y b) P_{spoIIQ} -GFP::*sacA* + $P_{Hy kinA}$::*amyE*. El número de la clona está escrito sobre cada uno de los carriles. MP: Marcador de peso molecular.

6.2 Evaluación de la capacidad de esporulación en *B. subtilis*

El protocolo de esporulación utilizando los medios CH y SM montado en el laboratorio ha sido ampliamente aplicado previamente en el estudio de la formación de esporas de *B. subtilis* desde un punto de vista de toma de decisiones (Fujita and Losick, 2005 b; Chastanet *et al.*, 2010; Eswaramoorthy *et al.*, 2010 a; b; Russell *et al.*, 2017).

6.2.1 Inducción de la esporulación en *B. subtilis* WT

Se realizaron ensayos de inducción de la esporulación por triplicado, como se describe en la metodología, sin IPTG y con IPTG 100 μ M. Los promedios de los porcentajes de esporulación de presentan en la **tabla 7**.

La cosecha de las células a partir del medio CH se realizó a una DO_{600nm} de 0.55. Durante la resuspensión de las células en el medio mínimo, es decir SM, se observó que las células no crecían significativamente, lo que ocurrió fue un aumento de la densidad óptica de alrededor de 0.07-0.1 cada hora, mientras que la concentración de células se mantuvo en 10^8 cel/ml hasta las 10 horas.

La técnica de análisis utilizada para la determinación del porcentaje de esporas en la población, fue mediante conteo de UFC, como se describe en la metodología (apartado 5.2.2.1). Esta técnica permite el análisis del número de endoesporas o esporas maduras, mas no considera esporas en formación. Las esporas maduras en porcentajes detectables empezaron a aparecer en el tiempo 4 y al tiempo 10 se alcanzó un porcentaje de alrededor del 80% (como se muestra en la **tabla 7**) en la cepa WT sin IPTG y con IPTG, lo que indica que no hay cambios significativos provocados por la concentración de IPTG utilizada sobre las células durante la esporulación. El porcentaje de esporas obtenido concuerda con literatura previa, en la que alrededor de 8-10 horas se obtiene el 80 % de esporas (Sterlini and Mandelstam, 1969), por lo que este protocolo permitió inducir la esporulación en *B. subtilis* de forma exitosa en periodos cortos de tiempo.

Porcentaje de esporas obtenido en la cepa WT		
Tiempo	% s/IPTG	%c/IPTG 100 μ M
To	0 %	0 %
T2	0 %	0 %
T4	0.02 %	0.009 %
T6	1.4 %	1.37%
T8	41 %	37%
T10	82 %	81%

Tabla 7. Promedio de porcentajes de esporulación en la cepa WT en medio SM. Se tomaron muestras cada dos horas a partir del tiempo 0 y hasta el tiempo 10.

Sin embargo, la activación de las vías que permiten el desarrollo de la endoespora se inicia desde tiempos tempranos en la resuspensión en SM. Como se muestra en la **figura 25**, el septo polar comenzó a aparecer aproximadamente a la hora 1, alcanzando un pico de acumulación máxima en la hora 2. Mientras que en los tiempos 3, 4 y 5 alcanza un máximo umbral de ocurrencia que no aumenta al transcurrir el tiempo y que correlaciona con alrededor de un 70% de la población. Aunque se ha descrito a la esporulación como una serie de etapas que en conjunto se completan alrededor de 7 horas, es importante tener en cuenta, que conforme las técnicas de análisis avanzan, ha quedado claro que la esporulación no está compuesta por distintas etapas que se producen secuencialmente. En cambio, estas etapas en realidad ocurren continuamente e incluso puede haber una

superposición significativa en términos de cuando un "etapa" comienza y termina (Tan and Ramamurthi, 2014).

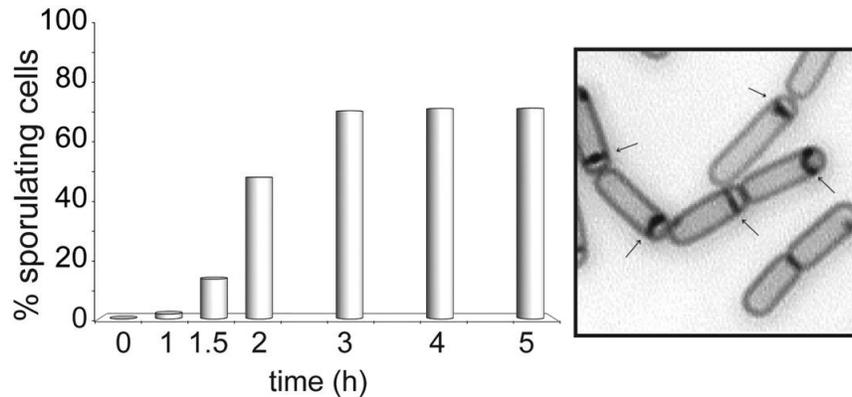


Figura 25. La esporulación se monitoreó midiendo el porcentaje de células que alcanzaron la etapa de división asimétrica o posteriores (recuadro: las flechas denotan los septos asimétricos). Muestras de células WT resuspendidas en medio mínimo sintético (SM) se colectaron, se tiñeron con Mito Tracker Green y se cuantificaron al microscopio (500 células por cada tiempo). Figura tomada de Chastanet *et al.*, 2010.

Los reporteros integrados en las cepas construidas en este trabajo serán herramientas útiles para cuantificar de forma masiva la proporción de células en la población que hayan alcanzado los niveles de Spo0A-P adecuados, activando a *spolIA*, mediante citometría de flujo en experimentos futuros.

6.2.2 Inducción de la esporulación en *B. subtilis* de la cepa $\Delta spo0B/P_{Hy}spo0B::amyE/P_{spolIQ}-GFP::sacA/P_{spolIA}-DsRed::lacA$

La heterogeneidad del inicio de la esporulación en *B. subtilis* ha sido modelo de estudio de la toma de decisiones en sistemas biológicos por años. Ciertos grupos de investigación han realizado trabajos extensivos con el fin de determinar la fuente de esta heterogeneidad característica.

Una de las primeras hipótesis que surgió fue que la expresión de al menos uno de los genes del fosforrelevo se expresaba de manera bimodal. De Jong *et al.*, encontraron que la expresión de los genes del fosforrelevo es altamente dinámica entre célula y célula, pero con una tendencia unimodal (heterogénea) durante la esporulación y que la estocasticidad de la transcripción del fosforrelevo podría ser un mecanismo importante de regulación de la heterogeneidad de la esporulación en el que para que se inicie la esporulación se requiere que todos los componentes del fosforrelevo alcancen cierto umbral de concentración al mismo tiempo (De Jong *et al.*, 2010 b). Respecto a Spo0B se concluyó que, a pesar de su expresión heterogénea, esta no aumenta en células que esporulan. En la trayectoria de una célula que esporula (línea roja), podría decirse que se observa un aumento sutil en los niveles de expresión de *spo0B*, pero en este trabajo se considera que no es significativo.

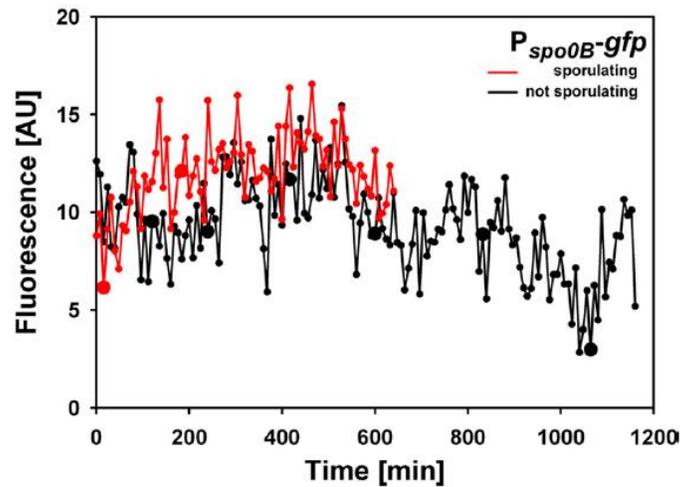


Figura 26. Expresión dinámica de *spo0B*. Se siguió la expresión de GFP clonada bajo la región reguladora de *spo0B* de células seleccionadas al azar mediante microscopía time-lapse, lo que resulta en trayectorias de célula única de linajes separados. Una conduce a una célula que esporula (líneas rojas) y otra a una célula no esporulante (líneas negras). Después de la división celular (indicada por un aumento en el tamaño del símbolo en el rastreo), una de las dos células hijas se seleccionó arbitrariamente para su posterior análisis. La representación de trayectorias se detuvo cuando la espora se hizo visible en el caso correspondiente. Tomada de De Jong *et al.*, 2010.

A pesar de ello, este hallazgo se refutó al utilizar técnicas distintas en las que se abordan enfoques de cuantificación en célula única a nivel poblacional (Eswaramoorthy *et al.*, 2010 b). Posteriormente a la resuspensión en medio SM la concentración tanto del transcrito como de la proteína Spo0B aumenta sutilmente con tendencia creciente a lo largo del tiempo (**tabla 8**), pero posiblemente debido a las bajas concentraciones de *spo0B*/Spo0B no se habían detectado diferencias evidentes de concentración, solo fluctuaciones significativas en la misma a lo largo del tiempo. Respecto al aumento de concentración que presentan el resto de los genes del fosforrelevo durante la esporulación, al comparar los cambios de concentración a lo largo del tiempo el cambio de Spo0B podría parecer no significativo, pero respecto a sí mismo hay un aumento en la concentración de 6.3 veces al comparar el tiempo 0 hr. y el tiempo 2.5 hrs. posteriormente a la resuspensión en SM. Por otro lado, este trabajo, además, corroboró la ausencia de una distribución bimodal de alguno de los componentes del fosforrelevo.

Time after sporulation (min)	Cell number $\times 10^8$ (ml $^{-1}$)	Cell volume (fl)	Concentration (μ M)*			
			KinA	Spo0F	Spo0B \dagger	Spo0A
0	2.8	2.6	0.2	0.5	0.03	4.4
15	3.1	2.2	0.2	0.7	0.03	4.7
30	3.5	1.9	0.2	1.0	0.06	4.8
45	3.8	1.8	0.6	1.0	0.06	12.0
60	4.1	1.8	0.6	1.3	0.10	11.5
75	4.3	1.8	0.9	1.3	0.14	17.5
90	4.5	1.8	0.9	1.4	0.18	18.2
105	4.7	1.8	1.2	1.6	0.21	24.6
120	4.8	1.8	1.2	2.2	0.20	26.4
135	4.7	1.8	1.5	2.4	0.19	30.0
150	4.5	1.8	1.8	2.3	0.19	37.4

Tabla 8. Aumentos en la concentración de los componentes del fosforrelevo durante la inducción de la esporulación en medio SM. Números de células, volumen y concentración de proteína de cada uno de los componentes del fosforrelevo durante 150 minutos. Tomada de Eswaramoorthy *et al.*, 2010 b.

Chastanet *et al.* en 2010, plantearon la hipótesis de que alguno de los *loops* de retroalimentación que regulan la síntesis y activación de Spo0A-P podrían limitar su tasa de fosforilación. En la **figura 27 panel a**, se muestra la red de *loops* de retroalimentación que controlan a Spo0A-P. Las líneas moradas denotan la regulación de la transcripción de los genes *kinA*, *spo0F* y *spo0A* mediante AbrB/ σ^H . Las líneas naranjas denotan la fosfatasa de Spo0A-P a través de AbrB/OE. Las líneas azules y verdes representan los *loops* de retroalimentación positiva que estimulan la transcripción de los genes *spo0A* y *spo0F*, respectivamente, mediante la acumulación de Spo0A-P.

Sin embargo, como se observa en la **figura 27 panel b**, concluyen con un modelo en el que posiblemente los *loops* que promueven la síntesis de 0A y 0F durante la esporulación funcionan como mecanismos “*just in time*” que proveen a la cascada con estos componentes, ya que observaron que sus niveles dentro de la célula no son limitantes para la esporulación. En ciertas concentraciones, observaron que Spo0F promovió la esporulación, pero en ningún momento se observó en niveles más altos que en la cepa WT, lo cual es el comportamiento que se espera observar al disminuir la heterogeneidad de la respuesta en la población. Por último, proponen al fosforrelevo en conjunto como un generador de ruido del flujo de fosfato que produce la distribución heterogénea de Spo0A-P, donde principalmente KinA, KinC (entrada de fosfato al sistema) y la fosfatasa Spo0E (mecanismo de retraso de la respuesta) controlan activamente la dinámica en la población.

Recientemente, mediante la técnica de microfluídica se reafirmó la idea de que el conjunto de componentes KinA-Spo0F-Spo0B-Spo0A generan heterogeneidad en el flujo de fosfato a través de la cascada por lo que actúan en conjunto como un generador de ruido (Russell *et al.*, 2017).

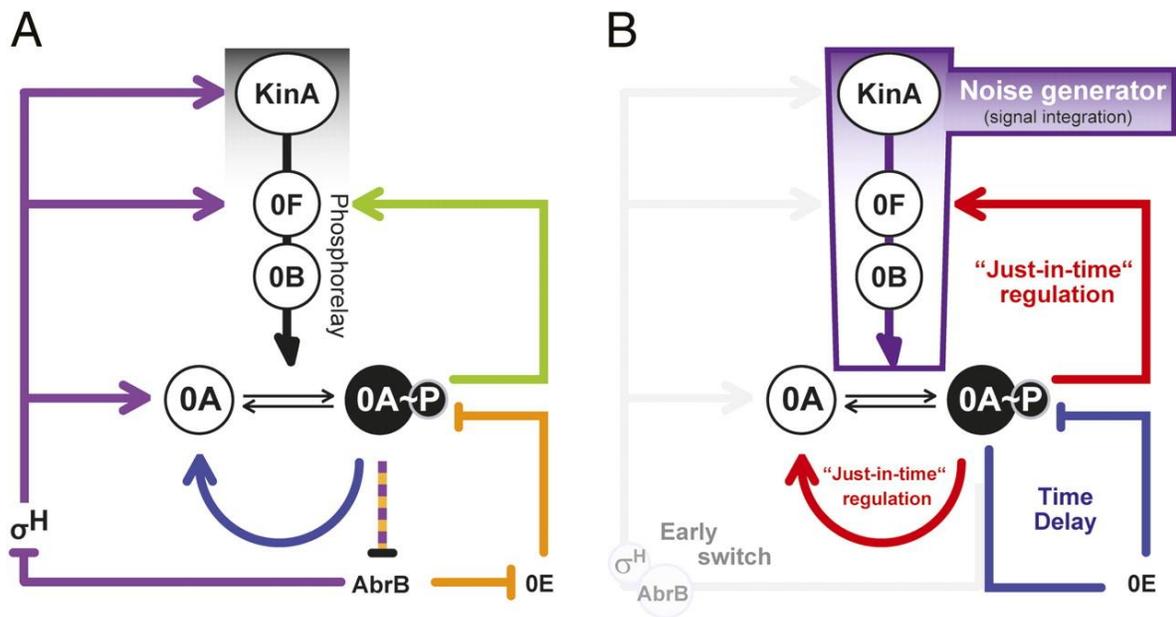


Figura 27. Circuitos de regulación que controlan la producción y activación de Spo0A. A) Red de *loops* de retroalimentación que controlan a Spo0A-P a distintos niveles. B) Modelo de ruido propuesto para la generación de la heterogeneidad de los niveles de OA-P durante la esporulación. Figura tomada de Chastanet *et al.* en 2010.

6.2.2.1 Estudio de programas autónomos en célula única

Gran parte de la comprensión de cómo las células inician la diferenciación hacia la esporulación se ha descubierto mediante análisis poblacionales, lo que resulta en promedios poblacionales del comportamiento. Ciertos estudios se han centrado en estudiar el comportamiento de las células individuales a través del uso de *pads* de agarosa en los cuales se estudian pequeñas colonias de células (Veening *et al.*, 2009; De Jong *et al.*, 2010 b; Eswaramoorthy *et al.*, 2010 b). Sin embargo, en estos ambientes las células pueden experimentar heterogeneidad en sus entornos locales a medida que se agotan los nutrientes, las células crecen y secretan varios factores. Por lo tanto, es complicado correlacionar directamente con el comportamiento de las células individuales (Russell *et al.*, 2017).

En la actualidad existen sofisticadas técnicas de análisis de célula única tales como la microfluídica, que permiten el estudio de la determinación de destinos celulares que ocurren por estocasticidad celular (Norman *et al.*, 2015). La técnica de microfluídica es una poderosa herramienta para el análisis del comportamiento heterogéneo en las poblaciones bacterianas. En general, consiste en la construcción de arreglos con micropatrones de ambientes (chips) que son monitoreados mediante microscopía. Cada microambiente es del tamaño adecuado para un pequeño número de células solamente (como se muestra en la metodología en el apartado 5.2.3). Este dispositivo permite el crecimiento de las células por largos periodos de tiempo en un ambiente controlado. El arreglo de células dentro de

pequeñas trampas facilita el intercambio de nutrientes, inductores y desechos entre las células y el flujo circundante. El diseño también permite la descarga continua de células en el flujo, lo que las lleva fuera del dispositivo. Debido a que la difusión es rápida a esta escala de tamaño, los microambientes funcionan como diminutos quimiostatos (Norman *et al.*, 2015). Una gran ventaja es que las condiciones dentro de los aparatos de microfluídica son constantes a lo largo del tiempo y el espacio, por lo que el comportamiento celular puede ser analizado en la ausencia de cambios ambientales que normalmente podrían ocurrir tales como depleción del medio, *quorum sensing*, anoxia, etc (Norman *et al.*, 2015). Por lo anterior, esta técnica es adecuada para el estudio de programas autónomos celulares.

Cabe mencionar, que esta técnica ya se ha utilizado previamente en *B. subtilis* para el análisis de otros destinos celulares como formación de biopelículas (Norman *et al.*, 2013) y recientemente, se ha aplicado también para el estudio de la esporulación (Russell *et al.*, 2017). Recientemente se han diseñado dispositivos en los que las trampas permiten el seguimiento del comportamiento de una sola célula madre a lo largo del tiempo, por lo que se denominan chips tipo *mother machine*. Una célula "madre" se establece en el extremo cubierto del canal, y genera células hijas. Las células hijas en el extremo no cubierto del canal de crecimiento son arrastradas por la el flujo del medio, como se muestra en la **figura 28**. Como exploración de la técnica se utilizó un chip tipo quimiostato como se describe en la metodología (apartado 5.2.3), pero dentro de las perspectivas se encuentra montar el seguimiento del comportamiento de las células en este tipo de chip.

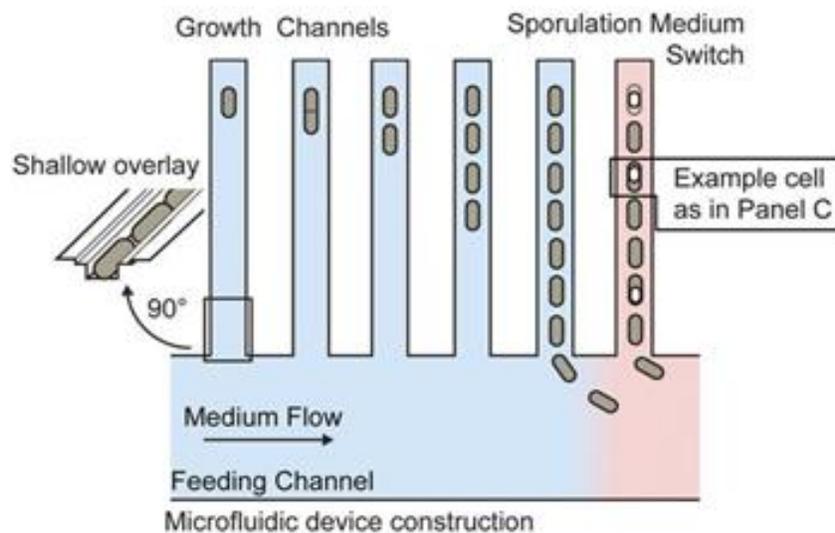


Figura 28. Chip tipo *mother machine*. En la figura se representan canales de crecimiento de 1 μm de ancho organizados a partir de un canal principal de alimentación. Los canales son inoculados con células isogénicas, que crecen y se dividen, empujando las células hijas hacia el flujo de residuos. Tomada de Russell *et al.*, 2017.

6.2.2.1.1 Inducción de la esporulación acoplada a microfluídica

Se realizó un experimento piloto utilizando el microchip tipo quimiostato descrito en la metodología, con la cepa que contiene la versión inducible de *spo0B* ($\Delta spo0B/P_{Hy}spo0B::amyE/P_{spoIIQ}\text{-GFP}::sacA/P_{spoIIA}\text{-DsRed}::lacA$).

Cronológicamente el experimento en microfluídica se realizó previamente a la evaluación del comportamiento de la cepa en cultivo líquido (descrito la sección 6.2.2.2). Se realizaron ensayos de esporulación preliminares en los que se siguió el comportamiento de las células por largos periodos de tiempo (**figura 29**) para obtener un panorama general del comportamiento esperado de *B. subtilis* en el sistema de microfluídica y de los posibles aspectos a modificar y/o mejorar al realizar los ensayos, así como del efecto durante la inducción de la expresión de *spo0B*.

La señal de inducción se aplicó de manera pulsátil, como se muestra en la **figura 30** por lo que la señal IPTG no se mantuvo continua, a diferencia de los experimentos en cultivo líquido. Esto es importante de destacar ya que a pesar de haber evaluado concentraciones similares en ambos experimentos (10-100 μM), el número de células en las que se divide el mismo número de moléculas de inductor es completamente distinto, por lo que la dinámica observada podría ser totalmente diferente a escalas de tamaño tan pequeñas.

A partir de un preinóculo en medio CH, la DO se ajusta a 0.05 aproximadamente en medio fresco CH. La cosecha de las células a una DO de 0.3, disminuye la formación de cadenas y aglomerados característicos del crecimiento. Previamente a la inoculación del sistema de microfluídica, las células se concentran para promover que las trampas del chip se llenen con células más eficientemente. El uso de Tween 20 promueve el adecuado flujo de los medios utilizados dentro del sistema, mientras que el uso de rodamina B en el medio que contiene la señal (IPTG) permite la verificación visual de la entrada de la señal al chip.

Este experimento permitió determinar tres aspectos:

- a) El promotor $P_{Hyperspank}$ presenta escape

Posteriormente a la concentración de las células para su inoculación en el sistema, estas ingresan al microfluido en altas concentraciones en medio rico CH. Previamente a la inducción por IPTG, es decir, entre los T_0 y $T_{6.5}$, se lograron observar esporas maduras y en formación en grandes cantidades, posiblemente debido al estrés implementado sobre las células durante su manipulación para introducción al sistema, así como la alta concentración de células alcanzada. Este hallazgo permitió concluir que el escape del promotor $P_{Hyperspank}$ es suficiente para la recuperación del fenotipo de esporulación.



Figura 29. Línea del tiempo del experimento de microfluídica. Del T_0 al $T_{4.5}$ posteriormente a la inoculación del sistema, las células se mantuvieron en medio rico CH para el acoplamiento de las células posteriormente al estrés de la manipulación para la inoculación. Del $T_{4.5}$ al $T_{6.5}$ las células se mantuvieron en medio de resuspensión SM y del $T_{6.5}$ al $T_{27.8}$ (1400 minutos) se alimentó al sistema con IPTG en concentraciones pulsátiles y crecientes como se observa en la figura 30.

b) Las células no esporulan al inducirse la sobreexpresión de *spo0B*

Al modular la expresión de *spo0B* en cultivo líquido con distintas concentraciones de IPTG (intervalo de 10 a 100 μM) como se representa en la figura a continuación, la cepa no esporuló en ninguno de los tiempos monitoreados. Estos datos se corroboraron mediante ensayos de esporulación en medio líquido y los resultados se discuten en secciones posteriores.

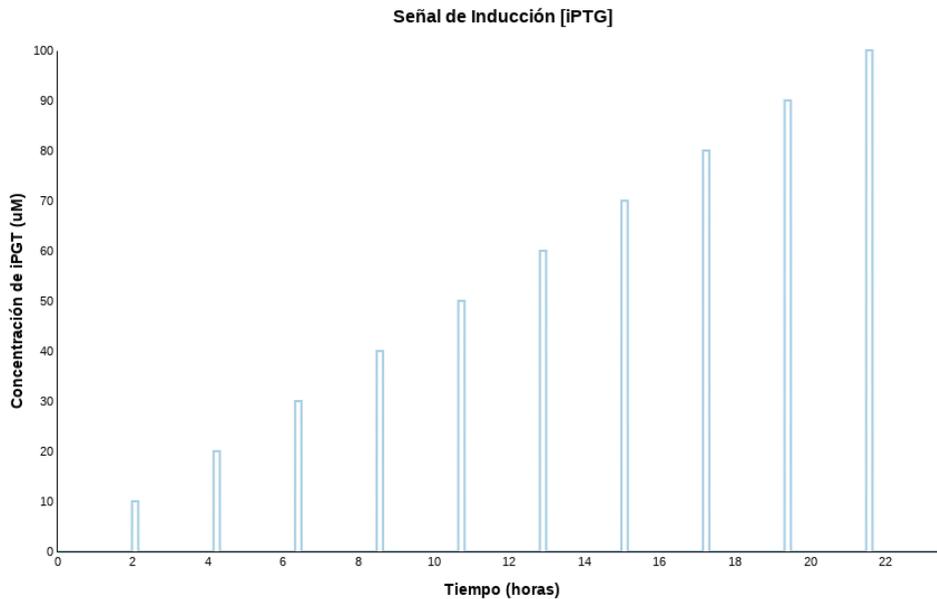


Figura 30. Representación de pulsos de inducción con distintas concentraciones de IPTG (10 μM a 100 μM) durante 1400 minutos (23.3 hrs.)

c) Funcionalidad de los reporteros de la esporulación

En las células que esporularon previamente a la inducción con IPTG (tiempos T_0 y $T_{6.5}$) se logró verificar la funcionalidad de los reporteros dentro de la cepa, donde las esporas al iniciar el proceso de esporulación expresaban al reportero $P_{spollA_DsRed}::lacA$ y las esporas en etapas más avanzadas expresaron al reportero $P_{spollQ_GFP}::sacA$. La técnica de microfluídica permitirá analizar de manera cuantitativa el comportamiento de las células a futuro mediante los reporteros fluorescentes construidos en el presente trabajo, pero debido a la ausencia de respuesta en las células durante la inducción, no se procedió al análisis cuantitativo del experimento.

6.2.2.2 Inducción de la esporulación en cultivo líquido

Debido a la dificultad para procesar múltiples muestras a la vez del protocolo por conteo de UFC, para el análisis de la cepa $P_{Hy}spo0B::amyE$ se procedió a utilizar la técnica de conteo mediante tinción de esporas descrita en la metodología en el apartado 5.2.2.2. Además, en trabajos realizados en otro grupo de trabajo del Instituto de Biotecnología, UNAM (Cristiano-Fajardo, Soriano-Peña and Serrano-Carreón, comunicación personal) se evaluaron distintas técnicas manuales de conteo de proporción de endoesporas y esporas libres en una población. La técnica de tinción de esporas con verde de malaquita presentó la obtención de datos más reproducibles. Mientras tanto, la técnica de UFC (utilizada para el análisis de la cepa WT en el presente trabajo) no permite identificar aglomerados de células como células individuales, por el contrario, los aglomerados de células crecen como una sola UFC, lo que produce pérdida de información. Finalmente, se ha observado en el laboratorio que se genera un *bias* en el que, en diluciones menores de las muestras, las células no presentan una relación estricta con su factor de dilución.

Las concentraciones del inductor IPTG utilizadas fueron 0, 10 μ M y/o 100 μ M y se eligió la fase exponencial ($D.O_{600nm}=0.55$) para la cosecha de las células a partir del medio CH y para la inducción con IPTG, basándonos en trabajos previamente realizados (Eswaramoorthy *et al.*, 2010 a).

Porcentaje de esporas obtenido					
Tiempo	WT		$P_{Hy}spo0B$		
	% s/IPTG	% c/IPTG 100 μ M	% s/IPTG	% c/IPTG 10 μ M	% c/IPTG 100 μ M
T_0	0	0	0	0	0
T4	0	0	0	0	0
T6	0.04 %	0.04%	0.04%	0	0
T8	22%	18%	30%	0	0
T10	40 %	30%	42.6 %	0	0

Tabla 9. Promedio de porcentajes de esporulación en las cepas WT y $P_{Hy}spo0B$ en medio SM.

Como control de la adecuada implementación de la técnica de tinción de esporas en el laboratorio, se repitió el ensayo de esporulación en la cepa WT (con y sin IPTG). Cada condición se evaluó por triplicado y se cuantificaron manualmente mínimo 500 objetos por muestra.

La diferencia principal al momento del tratamiento de las muestras entre el método de conteo de UFC y la tinción de esporas con verde de malaquita es que durante la segunda se realizan diversos lavados de las muestras, con el objetivo de disminuir la cantidad de aglomerados y cuantificar de manera más sencilla las esporas al visualizarlas al microscopio. Como se observa en la tabla, el porcentaje obtenido del 80 % que se reportó previamente en este trabajo no pudo replicarse, por lo que concluimos que se requiere evaluar la posibilidad de haber perdido esporas durante los lavados, debido a que, el ensayo mediante conteo de CFU en la cepa WT se repitió múltiples veces (no se muestran los datos) y en todos los casos, el porcentaje de esporas a las 10 horas fue de alrededor del 80%.

Cabe mencionar que en el experimento de microfluídica se indujo la expresión de *spo0B* a las 2 horas posteriores a la suspensión de las células en SM, por lo que no se evaluó el comportamiento de la cepa sin inductor. La cepa $P_{Hy}spo0B$ en el experimento control sin IPTG se comportó similar a la cepa WT, mientras que, al realizar la inducción, los resultados permitieron corroborar que a) el escape del promotor $P_{Hyperspank}$ es suficiente para recuperar la esporulación en la cepa complementada y b) la inducción con IPTG en concentraciones de 10 y 100 μ M inhiben la esporulación. Estos resultados se discuten a continuación.

6.2.3 Ausencia de esporulación en la cepa $\Delta spo0B/P_{Hy}spo0B::amyE/P_{spoIIQ}GFP::sacA/P_{spoIIA}DsRed::lacA$ durante la inducción con IPTG

De acuerdo a los resultados descritos en previas secciones, se concluye que la cepa no esporula en las concentraciones de IPTG utilizadas. Sin embargo, el intervalo entre 0 y 10 μ M representa un posible intervalo de inducción a evaluar.

La falta de literatura acerca de la función más allá de la transferencia de fosfato de Spo0B, no permite explicar con certeza los resultados del comportamiento del sistema en los presentes resultados.

Un fenotipo similar al observado en el presente trabajo ocurre al sobreexpresar a la proteína Spo0F. Se ha descrito previamente que al inducir la sobreexpresión de la proteína Spo0F se inhibe la esporulación (Chastanet *et al.*, 2010; Eswaramoorthy *et al.*, 2010 a). Mientras que bajas concentraciones de inductor estimularon la esporulación en medio de esporulación, altas concentraciones inhibieron el desarrollo de este destino. Posiblemente debido a la previamente reportada inhibición por sustrato de la fosforilación de Spo0F-P a través de KinA en altas concentraciones de Spo0F *in vitro*. Sin embargo, este comportamiento no se ha observado para Spo0B *in vitro*. Por el contrario, la tasa de la

formación de Spo0A-P vía el fosforrelevo completo muestra una dependencia lineal de la concentración de Spo0B (Grimshaw *et al.*, 1998 b).

Hipótesis uno

Por un lado, la ausencia de esporas en la cepa *spo0B* inducible podría explicarse con la posibilidad de que la relación entre la cantidad de proteína Spo0B no fosforilada y fosforilada aumente. En la cepa WT, KinA y Spo0F se encuentran en exceso respecto a Spo0B, sin embargo, en la cepa *spo0B* IPTG inducible, al agregar el inductor se genera que esta relación de concentraciones presumiblemente se encuentre desbalanceada. En sistemas de dos componentes se ha observado que la fosforilación del regulador de respuesta depende de la concentración total Histidina cinasa/Regulador de respuesta (Gao and Stock, 2013) y el hecho de que la transferencia de fosfato en el fosforrelevo es reversible, podría provocar que la concentración de Spo0B-P disminuya. Un enfoque interesante a abordar sería el análisis de los niveles de fosforilación de los componentes del fosforrelevo en nuestra cepa durante condiciones de inducción, sin embargo, no se ha reportado ningún trabajo que haya evaluado la proporción fosforilada de alguno de los componentes del fosforrelevo. Dentro de las desventajas para su análisis se encuentran la ausencia de anticuerpos comerciales para las proteínas del fosforrelevo y la labilidad de las formas fosforiladas, como Spo0A-P. Por ejemplo, se ha determinado que la estabilidad de Spo0A-P es muy baja por lo que no se ha logrado evaluar su estado de fosforilación. En cambio, se asume que la mayoría de Spo0A se encuentra fosforilada debido a los *loops* de retroalimentación positiva en los que el regulador de respuesta directa e indirectamente estimula la expresión de genes implicados en su propia fosforilación (Fujita *et al.*, 2005).

Por otro lado, la identificación de proteínas mediante fosfoproteómica en *B. subtilis* ha sido incompleta respecto al número de proteínas detectadas. El trabajo más reciente y, al parecer más completo, identifica 1,085 eventos de fosforilación en 488 proteínas, dentro de las que no se detectan proteínas relacionadas al fosforrelevo, si no, principalmente proteínas relacionadas a metabolismo (Ravikumar *et al.*, 2018). La baja concentración de la proteína Spo0B podría dificultar su identificación en técnicas de este mismo tiempo, aunque posteriormente a la inducción de la expresión con IPTG la proteína Spo0B podría ser más identificable. Sin embargo, se mantiene incierto si los niveles de fosforilación de la proteína podrían ser detectables.

Finalmente, una estrategia para asegurar la continua alimentación del sistema con flujo de fosfato es sobreexpresar a KinA o KinC en la misma cepa que contiene la versión IPTG inducible de *spo0B*, debido a que previamente su sobreexpresión ha comprobado ser suficiente para alimentar al sistema con flujo de fosfato, que como se describió previamente (Chastanet *et al.*, 2010) es el parámetro principal para una esporulación exitosa .

Hipótesis 2

Una segunda hipótesis es que la sobreexpresión de *spo0B* provoque que las concentraciones más elevadas que la concentración nativa de la proteína Spo0B per se dentro de la célula generen la inhibición del fenotipo por dos razones: a) aglomeración de la proteína y b) desbalance de dosis proteica dentro de las células.

En ciertos casos se ha observado que la sobreexpresión de la proteína per se es la que provoca la aglomeración *in vivo*. Por ejemplo, se ha observado que la agregación de la β -lactamasa solo se observa cuando su expresión se excede más allá de un 2.5 % de la tasa total de síntesis de proteína. Se han sugerido varios factores que podrían generar aglomeración *in vivo* o cuerpos de inclusión. Se incluye, alta concentración local de la proteína; un ambiente reductor en el citoplasma; ausencia de modificaciones post-traduccionales; interacciones no apropiadas con chaperones y otras enzimas y *crosslinking* intermolecular a través de grupos disulfuro (aunque los cuerpos de inclusión también se forman a partir de proteínas que carecen de cisteínas). Además, intermediarios parcialmente plegados ocurren con frecuencia, cuyos destinos pueden ser: proteólisis, formación de agregados, plegamiento nativo o unión a chaperonas (Fink, 1998).

Para evaluar esta posibilidad, se propone extraer proteína total antes y después de la inducción con IPTG y hacer análisis proteicos mediante geles nativos de poliacrilamida, en los que la proteína Spo0B aglomerada se observaría en un peso no correspondiente al de un dímero Spo0B-Spo0B o monómeros independientes.

Respecto al desbalance de dosis proteica dentro de la célula, se ha observado que se pueden producir fenotipos inhibitorios provocados por distintas combinaciones de interacciones entre proteínas dentro de la célula. Durante una reacción de transferencia de fosfato a través del fosforrelevo (al menos *in vitro*) no se ha observado que altas concentraciones de Spo0B tengan algún efecto inhibitorio sobre la activación de Spo0A, aunque no se descarta la posibilidad de que Spo0B interactúe con otras proteínas en el entorno celular, que Spo0F y Spo0B formen interacciones no funcionales (debido a que se ha observado que durante la transferencia de fosfato se forman tetrámeros Spo0F(2):Spo0B(2)) o que se generen interacciones inespecíficas al encontrarse concentraciones superiores a las nativas dentro de la célula como se describe a continuación.

En la **figura 31**, se pueden observar tres mecanismos que pueden influir en un fenotipo inhibitorio durante la sobreexpresión de proteínas (Moriya, 2015). Resource overload: Cuando una proteína requiere grandes cantidades de recursos celulares para la traducción, el plegado, la localización o la degradación, la sobreexpresión de la proteína sobrecarga esos recursos celulares. Desde este punto de vista, en un trabajo reciente (DeLoughery *et al.*, 2018) se ha sugerido que la maduración del policistrón *spo0B-obgE* podría llevarse a cabo por la RNasa Y, en conjunto con el complejo de proteínas Y (YlbF-YmcA-YaaT), por lo que podría haber una sobrecarga de recursos de procesamiento. Desequilibrio estequiométrico: cuando una proteína es una subunidad de un complejo de proteínas, la sobreexpresión de la proteína altera la estequiometría. El exceso de subunidades provoca

la modulación de la vía, formación anormal de complejos, o sobrecarga de los recursos de control de calidad de proteínas celulares. *Interacciones promiscuas*: la sobreexpresión de determinadas proteínas podría provocar el secuestro de proteínas esenciales mientras que, en condiciones nativas, la asociación de estas proteínas es escasa o inexistente.

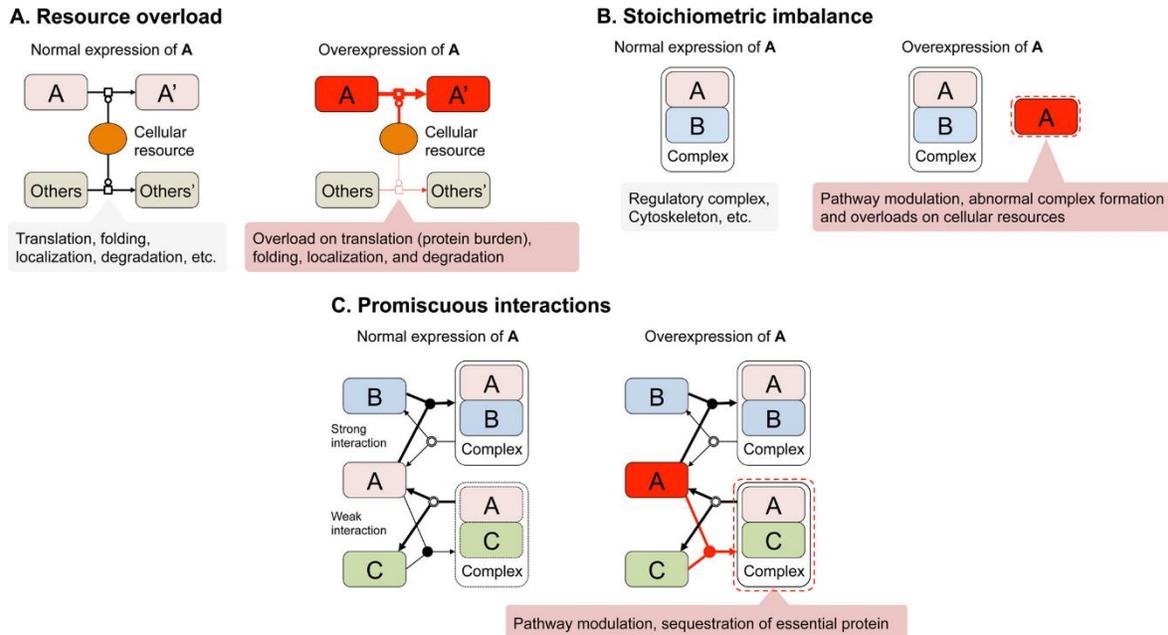


Figura 31. Mecanismos que generan defectos celulares durante la sobreexpresión de una proteína. Modificada de Moriya, 2015.

Otro posible mecanismo de inhibición de fenotipo puede ocurrir cuando una proteína B participa en dos complejos distintos (B-C y B-A), la sobreexpresión de una subunidad A no compartida podría competir por las concentraciones limitantes de B, reduciendo la cantidad de complejos B-C funcionales, como se observa en la **figura 32** (Prelich, 2012).

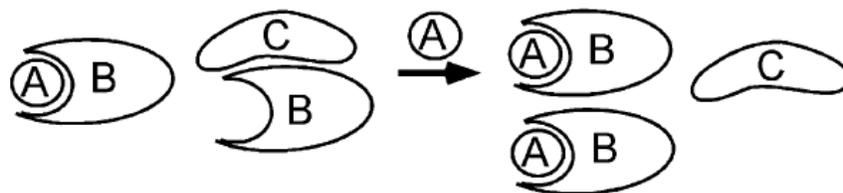


Figura 32. Modelo de inhibición de fenotipo mediante subunidades compartidas de dos complejos distintos. Modificada de Prelich, 2012.

Sin embargo, Eswaramoorthy *et. al* en el año 2010, realizaron experimentos de sobreexpresión de distintos genes (Spo0F, Spo0B, Spo0A, KinA) del fosforrelevo en medio rico LB bajo el promotor P_{Hyperspank}, como se observa en la **tabla 10**. El medio LB se considera rico en nutrientes, sin embargo, estrictamente es un medio limitante en cuanto a fuente de carbono. Por ello una pequeña parte de la población tiende a esporular en este medio, como se logró observar en nuestro laboratorio. El objetivo de este grupo de trabajo fue demostrar que induciendo la síntesis de la KinA más allá de un determinado nivel lleva a la entrada irreversible del proceso de esporulación independientemente de la disponibilidad de nutrientes. A pesar de que los medios LB y SM son completamente distintos, y, en estos experimentos no se evaluó la decisión de esporular en un momento en el que la célula se encuentra dentro de un ambiente que promueva la esporulación de forma masiva, la sobreexpresión artificial de *spo0B*, no inhibió el fenotipo de esporulación incluso al utilizar concentraciones mucho más altas de IPTG (500 μM) a las que se utilizaron en el presente trabajo (10 μM y 100 μM), aunque sí se observa una sutil disminución en la proporción de esporas en la población conforme se aumenta la expresión de este gen. Es importante destacar como diferencia que el Shine-Delgarno de nuestras versiones inducibles por IPTG está diseñado para una traducción más eficiente, aun así, la diferencia de concentraciones utilizada sigue siendo notable.

IPTG concn (μM)	KinA			Spo0F			Spo0B			Spo0A		
	CFU/ml		Efficiency									
	Viable cells	Spores		Viable cells	Spores		Viable cells	Spores		Viable cells	Spores	
0	5.1×10^8	2.0×10^4	3.9×10^{-5}	5.2×10^8	2.5×10^4	4.8×10^{-5}	4.8×10^8	2.8×10^4	5.8×10^{-5}	4.4×10^8	2.7×10^4	6.1×10^{-5}
10	4.8×10^8	2.1×10^8	4.4×10^{-1}	4.5×10^8	2.3×10^3	5.1×10^{-6}	6.6×10^8	3.1×10^4	4.7×10^{-5}	5.0×10^8	2.0×10^4	4.0×10^{-5}
50				2.2×10^8	1.8×10^3	8.2×10^{-6}	6.3×10^8	4.5×10^4	7.1×10^{-5}	5.4×10^8	2.3×10^4	4.3×10^{-5}
100				1.2×10^8	5.0×10^3	4.2×10^{-5}	5.0×10^8	4.1×10^4	8.2×10^{-5}	6.0×10^8	2.2×10^4	3.7×10^{-5}
200				1.2×10^8	9.8×10^2	8.2×10^{-6}	5.5×10^8	1.5×10^4	2.7×10^{-5}	7.0×10^8	2.4×10^4	3.4×10^{-5}
500				1.2×10^8	1.8×10^2	1.5×10^{-6}	4.5×10^8	1.6×10^4	3.6×10^{-5}	5.0×10^8	2.5×10^4	5.0×10^{-5}

Tabla 10. Inducción masiva de la esporulación mediante la sobreexpresión sutil de KinA en medio LB. La sobreexpresión de Spo0B, Spo0F y Spo0A no es suficiente para la inducción de la esporulación en un medio rico en nutrientes. Tomada de Eswaramoorthy *et. al.*, 2010.

Posiblemente, en caso de que alguno de los mecanismos de inhibición previamente descritos estuviera provocando el fenotipo observado, se debería a proteínas diferencialmente expresadas en medio LB y SM.

Propuesta de diseño de la modulación de la expresión de *spo0B* para la disminución del escape del promotor

El escape del promotor P_{Hyperspank} provoca que previamente a la inducción con IPTG los niveles de *spo0B* sean suficientes para esporular. Podría pensarse que la concentración baja de Spo0B dentro de la célula sea necesaria para el adecuado flujo de fosfato a través del fosforrelevo y que previamente a la inducción con IPTG el sistema se encuentre cerca al punto de saturación de respuesta y, por lo tanto, el intervalo de aumento de la

concentración mediante el inductor IPTG se vuelva muy estrecho y provoque la poca o nula posibilidad de aumento de la respuesta, e incluso la posible desestabilización del sistema después de atravesar una determinada concentración umbral.

Se plantea evaluar la dinámica de la población utilizando concentraciones de inductor en el intervalo de 0 y 10 μM e identificar si en ese intervalo de concentración, observamos esporulación. Mediante RT-qPCR, la cepa $\Delta spo0B/P_{\text{Hyspank}}spo0B::amyE$ nos permitiría identificar los niveles de expresión del transcrito en los que sin inducción por IPTG la cepa se comporta similar a la cepa WT, los niveles en los que las células no pueden esporular y, en caso de encontrarse, la concentración en la que las células pueden esporular al inducirse la sobreexpresión de *spo0B*.

Adicionalmente, se propone diseñar un nuevo sistema de inducción de *spo0B*, en el que se realizarían modificaciones en el promotor IPTG inducible P_{Hyspank} con el objetivo de hacer menos eficiente su reconocimiento por la RNA polimerasa para su transcripción (Helmann, 1995; Song *et al.*, 2016) y, además, reemplazar el espaciador y la secuencia Shine-Delgarno de la construcción por una versión menos eficiente, como el Shine-Delgarno nativo de *spo0B* (GGAG) el cual correlaciona con una baja tasa de traducción. Los datos que se obtengan en el experimento descrito en el párrafo anterior, podrían permitir obtener un panorama de las concentraciones de trabajo a replicar para evaluar el papel de Spo0B como factor limitante en la fosforilación de Spo0A-P.

Recientemente se ha sugerido a Spo0B como responsable del ruido generado dentro del fosforrelevo a nivel teórico (Lecca *et al.*, 2016) y es claro que *spo0B/Spo0B* es un componente especial del fosforrelevo. Parece ser que el abordaje que se requiere para la comprobación de su posible papel como factor limitante debe considerar la sutileza del cambio en la concentración dentro de las células, posibles resultados falsos negativos y las posibles dificultades técnicas que se podrían presentar al hacer análisis de la proteína y o transcrito debido a sus bajas concentraciones.

7 CONCLUSIONES

Durante este presente trabajo se logró la estandarización y exploración de distintas técnicas para el estudio de *B. subtilis* en el laboratorio. Con las cepas construidas durante este trabajo se abre la posibilidad de analizar el posible efecto que tiene la concentración de Spo0B en la célula sobre el fenotipo de esporulación. El hecho de que estas cepas contengan dos reporteros fluorescentes de la esporulación permitirá un análisis a fondo del comportamiento de *B. subtilis* durante los ensayos de inducción de la esporulación mediante técnicas diferentes y complementarias como son citometría de flujo y microfluídica. Especialmente, la microfluídica es una técnica novedosa que genera la probabilidad de analizar el comportamiento de organismos vivos a niveles tan delimitados como es en célula única durante largos periodos de tiempo en condiciones ambientales contantes. El reportero $P_{\text{spoIIA}}\text{-DsRed}::\text{lacA}$ permitirá determinar las células que inicien el proceso de esporulación, sin que necesariamente se comprometan a esporular, mientras que el reportero $P_{\text{spoIIQ}}\text{-GFP}::\text{sacA}$ permitirá analizar qué células terminan el proceso de formación de la espora.

Por otro lado, el escape del promotor $P_{\text{Hyperspank}}$, representa una desventaja para la modulación de expresión de *spo0B*, debido a los bajos niveles nativos de expresión de *spo0B*, en donde se ha reportado que existen alrededor de 20-50 moléculas por célula. Debido a esto, se requiere la búsqueda de un promotor con el menor escape posible y una inducción no eficiente para que sea adecuado para nuestros estudios.

Finalmente, al evaluar la dinámica de esporulación al inducir la expresión de *spo0B* en la cepa $\Delta\text{spo0B}/P_{\text{Hy}}\text{spo0B}::\text{amyE}$, se observa que se inhibe la esporulación. Estudios posteriores son requeridos para investigar la causa de este fenómeno inhibitorio dentro de la población.

8 PERSPECTIVAS

- Analizar la causa de la inhibición de la esporulación durante la inducción de *spo0B* en la cepa $\Delta\text{spo0B}/P_{\text{Hy}}\text{spo0B}::\text{amyE}/P_{\text{spoIIQ}}\text{-GFP}::\text{sacA}/P_{\text{spoIIA}}\text{-DsRed}::\text{lacA}$ y evaluar si la población esporula en el intervalo de 0 y 10 μM de inductor IPTG).
- Elegir a partir de herramientas moleculares ya existentes o, en su caso, diseñar un sistema que posea un promotor inducible que permita modular la expresión de *spo0B* en niveles que correlacionen con los niveles nativos bajos de expresión de este gen, para evitar el escape de expresión observado con el promotor $P_{\text{Hyperspank}}$.

- Escindir los genes nativos de *kinA* y *spo0F* del cromosoma de su respectiva cepa IPTG inducible construida en este trabajo para evitar efectos relacionados al ruido de fondo de su expresión en los experimentos de esporulación.
- Evaluar el comportamiento de las cepas a nivel de escala poblacional en un citómetro de flujo durante la inducción de la esporulación. Asimismo, evaluar el comportamiento de las cepas a nivel de célula única en un microchip tipo *mother machine* con la técnica de microfluídica.
- Determinar el esquema de expresión del transcrito de *spo0B* durante las diferentes fases del crecimiento de *B. subtilis* WT en los medios de inducción de la esporulación (CH y SM), con el objetivo de realizar un entendimiento integral de la expresión de *spo0B*, del cual solo se conoce su comportamiento durante la resuspensión en medio SM.

9 BIBLIOGRAFÍA

- Asai, K.; Kawamura, F.; Yoshikawa, H.; Takahashi, H., 1995: Expression of *kinA* and accumulation of $\sigma(H)$ at the onset of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **177**, 6679–6683.
- Bara, I., 2010: Comparison of different *Bacillus subtilis* expression systems, **161**.
- Barba-Ostria, C. A., 2014: Los sistemas de dos componentes: circuitos moleculares versátiles. *Tip.*, **17**, 62–76.
- Bijlsma, J. J. E.; Groisman, E. A., 2003: Making informed decisions: Regulatory interactions between two-component systems. *Trends in Microbiology*, **11**, 359–366.
- Bouvier, J.; Stragier, P.; Bonamy, C.; Szulmajster, J., 1984: Nucleotide sequence of the *spo0B* gene of *Bacillus subtilis* and regulation of its expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **81**, 7012–7016.
- Bretl, D. J.; Demetriadou, C.; Zahrt, T. C., 2011: Adaptation to Environmental Stimuli within the Host: Two-Component Signal Transduction Systems of Mycobacterium tuberculosis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **75**, 566–582.
- Cabrera-Valladares, N.; Martínez, L. M.; Flores, N.; Hernández-Chávez, G.; Martínez, A.; Bolívar, F.; Gosset, G., 2012: Physiologic consequences of glucose transport and phosphoenolpyruvate node modifications in *Bacillus subtilis* 168. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, **22**, 177–197.
- Carpentier, B., 2014: Biofilms. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition*, 259–265.
- Chastanet, A.; Vitkup, D.; Yuan, G. C.; Norman, T. M.; Liu, J. S.; Losick, R. M., 2010: Broadly heterogeneous activation of the master regulator for sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**, 8486–8491.
- Chibazakura, T.; Kawamura, F.; Takahashi, H., 1991: Differential regulation of *spo0A* transcription in *Bacillus subtilis*: Glucose represses promoter switching at the initiation of sporulation. *Journal of Bacteriology*, **173**, 2625–2632.
- Davis, K. M.; Isberg, R. R., 2016: Defining heterogeneity within bacterial populations via single cell approaches. *BioEssays*, **38**, 782–790.
- De Jong, I. G.; Veening, J. W.; Kuipers, O. P., 2010a: Heterochronic phosphorelay gene expression as a source of heterogeneity in bacillus subtilis spore formation. *Journal of Bacteriology*, **192**, 2053–2067.
- De Jong, I. G.; Veening, J. W.; Kuipers, O. P., 2010b: Heterochronic phosphorelay gene expression as a source of heterogeneity in bacillus subtilis spore formation. *Journal of Bacteriology*, **192**, 2053–2067.
- Decatur, A.; Losick, R., 1996: Identification of additional genes under the control of the transcription factor $\sigma(F)$ of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **178**, 5039–5041.
- DeLoughery, A.; Lallane, J. B.; Losick, R.; Li, G. W., 2018: Maturation of polycistronic mRNAs by the endoribonuclease RNase Y and its associated Y-complex in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **115**, E5585–E5594.
- Elowitz, M. B.; Siggia, E. D.; Levine, A. J.; Swain, P. S., 2002: Stochastic Gene Expression in a Single Cell. *Science Reports*, **297**, 1183–1187.
- Errington, J., 2003: Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nat Rev Microbiol.*, **1**, 117–126.
- Eswaramoorthy, P.; Duan, D.; Dinh, J.; Dravis, A.; Devi, S. N.; Fujita, M., 2010a: The threshold level of the sensor histidine kinase KinA governs entry into sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, **192**, 3870–3882.
- Eswaramoorthy, P.; Dinh, J.; Duan, D.; Igoshin, O. A.; Fujita, M., 2010b: Single-cell measurement of the levels and distributions of the phosphorelay components in a population of sporulating *Bacillus subtilis* cells. *Microbiology*, **156**, 2294–2304.
- Fawcett, P.; Eichenberger, P.; Losick, R.; Youngman, P., 2000: The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**, 8063–8068.
- Fink, A. L., 1998: Protein aggregation: folding aggregates, inclusion bodies and amyloid. *Folding & Design*, **3**,

9–23.

Freyre-González, J. A.; Manjarrez-Casas, A. M.; Merino, E.; Martínez-Nuñez, M.; Pérez-Rueda, E., 2013: Lessons from the modular organization of the transcriptional regulatory network of *Bacillus subtilis*, 1–14.

Fujita, M.; Losick, R., 2005a: Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is mediated by gradual activation of a master regulator. *Genes Dev.*, **19**, 2236–2244.

Fujita, M.; Losick, R., 2005b: Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is mediated by gradual activation of a master regulator. *Genes Dev.*, **19**, 2236–2244.

Fujita, M.; González-Pastor, J. E.; Losick, R., 2005: High- and low-threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology.*, **187**, 1357–1368.

Gao, R.; Stock, A. M., 2013: Probing kinase and phosphatase activities of two-component systems in vivo with concentration-dependent phosphorylation profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, **110**, 672–677.

Granados-Castro, A. A.; Gutiérrez-Ríos, R. M., 2013: Procesamiento de información y toma de decisiones en el sistema de esporulación de *Bacillus subtilis*. *Instituto de Biotecnología, UNAM.*, **Tesis de M.**

Grimshaw, C. E.; Huang, S.; Hanstein, C. G.; Strauch, M. A.; Burbulys, D.; Wang, L.; Hoch, J. A.; Whiteley, J. M., 1998a: Synergistic kinetic interactions between components of the phosphorelay controlling sporulation in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry.*, **37**, 1365–1375.

Grimshaw, C. E.; Huang, S.; Hanstein, C. G.; Strauch, M. A.; Burbulys, D.; Wang, L.; Hoch, J. A.; Whiteley, J. M., 1998b: Synergistic kinetic interactions between components of the phosphorelay controlling sporulation in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry.*, **37**, 1365–1375.

Guespin-Michel, J. F., 1971: Phenotypic reversion in some early blocked sporulation mutants of *Bacillus subtilis*. *Molecular and General Genetics MGG.*, **112**, 243–254.

Harwood, C. R., 2007: *Bacillus subtilis* as a Model for Bacterial Systems Biology. *Encyclopedia of Life Sciences.*

Helmann, J. D., 1995: Compilation and analysis of *Bacillus Subtilis* σ A-dependent promoter sequences: Evidence for extended contact between RNA polymerase and upstream promoter DNA. *Nucleic Acids Research.*, **23**, 2351–2360.

Hoch, J. A.; Mathews, J. L., 1973: Chromosomal location of pleiotropic negative sporulation mutations in *Bacillus subtilis*. *Genetics.*, **73**, 215–228.

Hoch, J. A., 1976: Genetics of bacterial sporulation. *Advances in Genetics.*, **18**, 69–98.

Hoch, J. A., 2000: Two-component and phosphorelay signal transduction, 165–170.

Hoch, J. A.; Zhou, X. Z.; Varughese, K. I.; Whiteley, J. M.; Madhusudan, 2004: Formation of a Novel Four-Helix Bundle and Molecular Recognition Sites by Dimerization of a Response Regulator Phosphotransferase. *Molecular Cell.*, **2**, 485–493.

Igoshin, O. A.; Alves, R.; Savageau, M. A., 2016: Hysteretic and graded responses in bacterial two-component signal transduction, **15**, 477–491.

Jong, I. G. De; Veening, J. willem; Kuipers, O. P., 2010: Heterochronic Phosphorelay Gene Expression as a Source of Heterogeneity in *Bacillus subtilis* Spore Formation □ †, **192**, 2053–2067.

Kuchina, A., 2013: Dynamics of Cell Fate Decision Making Between Sporulation and Competence in *Bacillus subtilis*. *Doctoral dissertation.*

Kuchina, A.; Espinar, L.; Garcia-Ojalvo, J.; Süel, G. M., 2011: Reversible and noisy progression towards a commitment point enables adaptable and reliable cellular Decision-Making. *PLoS Computational Biology.*, **7**.

Kuo, S.; Demeler, B.; Haldenwang, W. G., 2008: The Growth-Promoting and Stress Response Activities of the *Bacillus subtilis* GTP Binding Protein Ogb Are Separable by Mutation, **190**, 6625–6635.

Lamont, I. L.; Mandelstam, J., 2009: Use of Temperature-sensitive Mutants to Study Gene Expression of Two Closely Linked Sporulation Loci in *Bacillus subtilis*. *Microbiology.*, **130**, 1263–1269.

- Laub, M. T.; Goulian, M., 2007: Specificity in Two-Component Signal Transduction Pathways. *Annual Review of Genetics.*, **41**, 121–145.
- Lecca, P.; Mura, I.; Re, A.; Barker, G. C.; Ihekweba, A. E. C., 2016: Time series analysis of the *Bacillus subtilis* sporulation network reveals low dimensional chaotic dynamics. *Frontiers in Microbiology.*, **7**, 1–17.
- Lopez, D.; Vlamakis, H.; Kolter, R., 2009: Generation of multiple cell types in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews.*, **33**, 152–163.
- López, D.; Kolter, R., 2010: Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Reviews.*, **34**, 134–149.
- Middleton, R.; Hofmeister, A., 2004: New shuttle vectors for ectopic insertion of genes into *Bacillus subtilis*. *Plasmid.*, **51**, 238–245.
- Mielich-Süss, B.; Lopez, D., 2015: Molecular mechanisms involved in *Bacillus subtilis* biofilm formation. *Environmental Microbiology.*, **17**, 555–565.
- Mitrophanov, A. Y. A.; Groisman, E. E. a, 2008: Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes & development.*, **22**, 2601–2611.
- Mondragón-Palomino, O.; Danino, T.; Selimkhanov, J.; Tsimring, L.; Hasty, J., 2011: Entrainment of a population of synthetic genetic oscillators. *Science.*, **333**, 1315–1319.
- Moriya, H., 2015: Quantitative nature of overexpression experiments. *Molecular Biology of the Cell.*, **26**, 3932–3939.
- Nicholson, W. L., 2002: Roles of *Bacillus* endospores in the environment. *Cellular and Molecular Life Sciences.*, **59**, 410–416.
- Norman, T. M.; Lord, N. D.; Paulsson, J.; Losick, R., 2013: Memory and modularity in cell-fate decision making. *Nature.*, **503**, 481–486.
- Norman, T. M.; Lord, N. D.; Paulsson, J.; Losick, R., 2015: Stochastic Switching of Cell Fate in Microbes. *Annual Review of Microbiology.*, **69**, 381–403.
- Overkamp, W.; Beilharz, K.; Weme, R. D. O.; Solopova, A.; Karsens, H.; Kovács, Á. T.; Kok, J.; Kuipers, O. P.; Veening, J. W., 2013: Benchmarking various green fluorescent protein variants in *Bacillus subtilis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Lactococcus lactis* for live cell imaging. *Applied and Environmental Microbiology.*, **79**, 6481–6490.
- Piggot, P. J.; Coote, J. G., 1976: Genetic aspects of bacterial endospore formation. *Bacteriological reviews.*, **40**, 908–962.
- Predich, M.; Nair, G.; Smith, I., 1992: *Bacillus subtilis* early sporulation genes-kinA, spo0F, and spo0A are transcribed by the RNA polymerase containing σ H. *Journal of Bacteriology.*, **174**, 2771–2778.
- Prelich, G., 2012: Gene overexpression: Uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics.*, **190**, 841–854.
- Radeck, J.; Kraft, K.; Bartels, J.; Cikovic, T.; Dürr, F.; Emenegger, J.; Kelterborn, S.; Sauer, C.; Fritz, G.; Gebhard, S.; Mascher, T., 2013: The *Bacillus* BioBrick Box: Generation and evaluation of essential genetic building blocks for standardized work with *Bacillus subtilis*. *Journal of Biological Engineering.*, **7**.
- Raser, J. M.; O’Shea., E. K., 2010: Noise in Gene Expression: Origins, Consequences, and Control. *Science.*, **309**, 2010–2014.
- Ravikumar, V.; Nalpas, N. C.; Anselm, V.; Krug, K.; Lenuzzi, M.; Šestak, M. S.; Domazet-Lošo, T.; Mijakovic, I.; Macek, B., 2018: In-depth analysis of *Bacillus subtilis* proteome identifies new ORFs and traces the evolutionary history of modified proteins. *Scientific Reports.*, **8**, 1–11.
- Russell, J. R.; Cabeen, M. T.; Wiggins, P. A.; Paulsson, J.; Losick, R., 2017: Noise in a phosphorelay drives stochastic entry into sporulation in *Bacillus subtilis*. *The EMBO Journal.*, **36**, e201796988.
- Schaeffer, A. B.; Fulton, M. D., 1930: A Simplified Method of Staining Endospores. *Science.*, **77**, 1930.
- Schmidt, R.; Margolis, P.; Duncan, L.; Coppolecchi, R.; Moran, C. P.; Losick, R., 1990: Control of developmental transcription factor F by sporulation regulatory proteins SpoIIAA and SpoIIAB in *Bacillus subtilis*.

Proc.Natl. Acad. Sci USA., **87**, 9221–9225.

Schultz, D.; Wolynes, P. G.; Ben, E., 2009: Deciding fate in adverse times : Sporulation and competence in *Bacillus subtilis*, **106**.

Sharma, R. C.; Schimke, R. T., 1996: Preparation of electro-competent *E. coli* using salt-free growth medium. *BioTechniques.*, **20**, 42–44.

Song, Y.; Nikoloff, J. M.; Fu, G.; Chen, J.; Li, Q.; Xie, N.; Zheng, P.; Sun, J.; Zhang, D., 2016: Promoter screening from *Bacillus subtilis* in various conditions hunting for synthetic biology and industrial applications. *PLoS ONE.*, **11**, 1–18.

Soufo, H. J. D., 2016: A novel cell type enables *B. subtilis* to escape from unsuccessful sporulation in minimal medium. *Frontiers in Microbiology.*, **7**.

Sterlini, J. M.; Mandelstam, J., 1969: Commitment to Sporulation in *Bacillus subtilis* and its Relationship to Development of Actinomycin Resistance. *The Biochemical journal.*, **113**, 29–37.

Strauch, M. A.; Trach, K. A.; Day, J.; Hoch, J. A., 1992: SpoOA activates and represses its own synthesis by binding at its dual promoters. *Biochimie.*, **74**, 619–626.

Tan, I. S.; Ramamurthi, K. S., 2014: Spore formation in *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology Reports.*, **6**, 212–225.

Varughese, K. I.; Tsigelny, I.; Zhao, H., 2006: The crystal structure of beryllofluoride Spo0F in complex with the phosphotransferase Spo0B represents a phosphotransfer pretransition state. *Journal of Bacteriology.*, **188**, 4970–4977.

Veening, J.; Murray, H.; Errington, J., 2009: A mechanism for cell cycle regulation of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Genes & development.*, 1959–1970.

Veening, J. W.; Hamoen, L. W.; Kuipers, O. P., 2005: Phosphatases modulate the bistable sporulation gene expression pattern in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology.*, **56**, 1481–1494.

Wang, S., 2012: Bacterial Two-Component Systems: Structures and Signaling Mechanisms. *INTECH OPEN SCIENCE.*, **CHAPTER 15**, 439–466.

Wang, X.; Llopis, P. M., 2016: Visualizing *Bacillus subtilis* During Vegetative Growth and Spore Formation, **1431**, 275–287.

Wang, X.; Meng, S.; Han, J., 2017: Morphologies and phenotypes in *Bacillus subtilis* biofilms. *Journal of Microbiology.*, **55**, 619–627.

10 APÉNDICE

10.1 Técnicas moleculares frecuentemente utilizadas durante este trabajo

10.1.1 Extracción de DNA genómico de *B. subtilis*

(Algunas de las soluciones utilizadas pertenecen al kit [DNA Isolation Kit for Cells and Tissues Roche](#), pero se adaptaron algunos pasos para su uso en el laboratorio).

- 1.- Crecer un cultivo de 3-5 ml *over night* (O. N.).
- 2.- Centrifugar a 13,000 rpm y desechar el sobrenadante (congelar si es necesario para continuar con la extracción al siguiente día).
- 3.- Resuspender las células en 100 µl de buffer Tris pH 7.2-7.6 50 mM + lisozima a 2.5 µg/µl. La enzima se encuentra en stock a 50 µg/µl (50 mg/ml). Para preparar las alícuotas individuales de 100 µl, agregar 5 µl del stock de lisozima a 95 µl de buffer Tris pH 7.2-7.6 50 mM.
- 4.- Incubar 30 min. a T. A.
- 5.- Agregar 450 µl de “*Cellular lysis buffer*” (Atemperar previamente a su uso para que las sales en el buffer se disuelvan). Incubar 15 min a T. A.
- 6.- Agregar 30 µl de solución de Proteinasa K (1:1000 v/v), agitar en vórtex por 3 segundos.
- 7.- Incubar 1 h. a 65 °C.
- 8.- Enfriar con la tapa abierta.
- 9.- Agregar 5 µl de “*RNA solution*”, agitar en vórtex por 3 seg.
- 10.- Incubar 30 a 60 min a 37 °C.
- 11.- Agregar 180 µl de “*Protein precipitation solution*”, agitar en vórtex 10 seg.
- 12.- Incubar en hielo por 5 min.
- 13.- Centrifugar 20 min a 13,000 rpm.
- 14.- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 15.- Agregar 1 vol. de fenol:cloroformo:isoamílico. Homogenizar en vórtex 5 seg.
- 16.- Centrifugar 3 min a 13,000 rpm.
- 17.- Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
- 18.- Agregar 1 vol. de cloroformo. Agitar en vórtex 5 seg. Centrifugar 3 min a 13,000 rpm.
- 19.- Recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo y agregar 0.7 volúmenes de isopropanol, mezclar por inversión.

- 20.- Centrifugar 5 min. a 13,000 rpm. Desechar el sobrenadante.
- 21.- Agregar 500 µl de etanol al 70%, mezclar por inversión y centrifugar 5 min a 13,000 rpm.
- 22.- Descartar el sobrenadante y secar el pellet.
- 23.- Resuspender el pellet en 100 µl de TE buffer (1/10 v/v) pH 8 o H₂O. Incubar 10 min. a 55 °C y almacenar a -20 °C.

10.1.2 Extracción de DNA plasmídico utilizando perclorato de sodio

- 1.- Inocular 3 ml de cultivo y dejar crecer toda la noche.
- 2.- Centrifugar a 13,000 rpm durante 2 minutos.
- 3.- Resuspender el pellet en 175 µl amortiguador TES (15% sacarosa, 50 mM Tris pH 8.5, 50 mM EDTA pH 8).
- 4.- Adicionar 25 µl de lisozima (10 mg/ml) y mantener en hielo 20 minutos.
- 5.- Adicionar 400 µl de agua helada e incubar a 75°C durante 15 minutos.
- 7.- Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos.
- 8.- Retirar el pellet con palillo y conservar el sobrenadante.
- 9.- Adicionar 60 µl de perclorato de sodio 5M
- 10.- Adicionar 600 µl de isopropanol y homogenizar suavemente.
- 11.- Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos y descartar el sobrenadante.
- 12.- Resuspender el pellet en 500 µl de etanol al 70% y centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos.
- 13.- Dejar secar el *pellet* y resuspender en 30 µl de H₂O.
- 14.- Verificar el proceso de extracción utilizando 3 µl de muestra.

10.1.3 PCR en colonia

- 1.- En 20 µl de H₂O agregar una asada de la colonia de interés.
- 2.- Calentar la muestra durante 15 minutos a 95 °C.
- 3.- Centrifugar la muestra 15 minutos a 13,000 rpm. En el fondo del tubo se observa el pellet celular. En la parte acuosa de la muestra se encuentra el DNA; al tomar el DNA tener cuidado de no tocar el pellet celular.
- 4.- Tomar 1 µl o 2 µl de la muestra acuosa como templado para el PCR.

10.1.4 Precipitación de DNA con butanol

- 1.- Agregar a la reacción de ligación de 20 μ l, 230 μ l de H₂O.
- 2.- Añadir 1 ml de butanol. Agitar en vórtex durante 5 segundos.
- 3.- Centrifugar 5 min a 13,000 rpm. Eliminar la fase orgánica, conservar la acuosa.
- 4.- Añadir 1 ml de butanol y centrifugar de nuevo a 13,000 rpm. Retirar el sobrenadante. En este caso solo habrá una fase.
- 5.- Agregar 1 ml de etanol al 100% y centrifugar 5 minutos. Eliminar el sobrenadante.
- 6.- Secar el *pellet* y resuspender en 20 μ l de H₂O.

10.2 Plásmidos y oligonucleótidos utilizados

10.2.1 Tabla de oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Oligonucleótido	Clave	Secuencia (5'->3')
2289	KANhelFw	GGG CAT GCT AGC ACA TAA GGA GGA ACT ACT gtg GAA CAG GAT ACG CAG CAT GTTA
2290	KASphIRv	AGG AAT AGC ATG Ctt aTT TTT TTG GAA ATG AAA TTT TAA ACG CT
2291	0FNhelFw	GGG CAT GCT AGC ACA TAA GGA GGA ACT ACT atg ATG AAT GAA AAA ATT TTA ATC
2610	lacAIIADsRedFw	CTG AAT TAA TTA ATC ATC GCG ACT GC
3544	lacA Fw	GGC CCG ATA TTT TAG CTG ACG ATA
3545	lacA Rv	TCA TAC TTT TCC ATC GTC AGG TCG
2292	0FSphIRv	AGG AAT AGC ATG Ctc aGT TAG ACT TCA GGG GCA GA
4821	spolIQ_140InF	TAC TTG AAG TGG ATC CGT TTT TGG CAC TCC
4822	spolIQ_Rv	GTT CTT CTC CTT TGC TAG CCA TTG TTT CAT CAC CTC AGC AAC
4823	Q-GFP_Fw	ATG TTG CTG AGG TGA TGA AAC AAT GGC TAG CAA AGG AGA AGA AC
5205	0BpRedC	GAA AT T AAA TGA TTG GGA GTG CGA AAA TGG TGC GCT CCT CCA AGA AC
5206	0BpRedB	GTT CTT GGA GGA GCG CAC CAT TTT CGC ACT CCC AAT CAT TTA ATT TC
5207	0BpRedD	ACT GGA ATT CGC TGC TAC AGG AAC AGG TGG
5208	0BmupA	ACT GTG AAT TCC CTG AAT CTC TTG ATC C
5213	0BmdownF	TCA TAT GGA TCA CGG CCT TCT AAG
5214	0BmupSpC	GA AAT TAA ATG ATT GGG AGT GCG AAA TAC TTC TCG AGG TCG ACG GTA TC
5217	0BmupSpB	GAT ACC GTC GAC CTC GAG AAG TAT TTC GCA CTC CCA ATC ATT TAA TTT C
5218	0BmdownSpE	TAC TTC TCG AGG TCG ACG GTA TCA CGG TTT AGA ACG GAG GAC ATT ATG
5219	0BmdownSpD	CAT AAT GTC CTC CGT TCT AAA CCG TGA TAC CGT CGA CCT CGA GAA GTA
5220	oamyE_450FW	GAT TTC CAA TGA GGT TAA GAG TAT TC
5221	oamyE_750RV	GTA TTG ATA GAG ACA GAG GAT GAA C
5222	osacA_570FW	CTT CTG ATA ACC TGA CAG AGT GG
5223	osacA_1060RV	CAG ATG ATC CAT GCA TGT TGA TG
5877	pIIAXbal_FwA	ACT GTC TAG AAA GCG AAA TAT TGT CTG ACT GCT T
5878	pIIA-DsRed_RvB	GTT CTT GGA GGA GCG CAC CAT GCT CAT TCC TCC TTG ATA TGA TC
5879	pIIA-DsRed_FwC	GAT CAT ATC AAG GAG GAA TGA GCA TGG TGC GCT CCT CCA AGA AC
5880	pIIANotI_RvD	TAG AGT ATG CGG CCG CGC TGC TAC AGG AAC AGG TGG T
6203	opIIAXbal_A	ACT GTC TAG AGC AAG TGA CAA AAA TGC TTG AC
6204	opIIAYFP_B	GCT TAC CTT TTCT ATT GAA TCC ATA GTA GTT CCT CCT TGA TAT GAT CGG ATA ATG
6205	opIIAYFP_C	CAT TAT CCG ATC ATA TCA AGG AGG AAC TAC TAT GGA TTC AAT AGA AAA GGT AAG
6206	oYFPstI_D	ATG CCT GCA GTT ACT TGT ACA GCT CGT CCA TG
6309	0BmdownSpE-N	ATC CTA GGC CTA TTA ATA TTC CGG ACG GTT TAG AAC GGA GGA CAT TAT G
6310	0BmdownSpD-N	CAT AAT GTC CTC CGT TCT AAA CCG TCC GGA ATA TTA ATA GGC CTA GGA T

7533	GFP-R	AAT GAC TAG CTA GCG AAT TCA GTT GTA CAG TTC ATC CAT GCC
8065	LacA_Up	GGC CCG ATA TTT TAG CTG ACG ATA
8066	LacA_Dn	TCA TAC TTT TCC ATC GTC AGG TCG
11778	0BNdeIFW	AGG AAT ACA TAT GAA GGA TGT TTC AAA AAA TCA AG
11779	0BBamHlstopRV	AAA GGA TCC CTA GTC CAA CCC AAT TTC AAT C
11780	0BNcolFW	AGG AAT CCA TGG ATG AAG GAT GTT TCA AAA AAT CAA G
11781	0BBamHIRV	AAA GGA TCC GTC CAA CCC AAT TTC AAT CAG AC
11782	0BNhelFW	GGG CAT GCT AGC ACA TAA GGA GGA ACT ACT ATG AAG GAT GTT TCA AAA AAT CAA G
11783	0BSphIRV	AGG AAT AGC ATG CCT AGT CCA ACC CAA TTT CAA TC

Tabla S1. Oligonucleótidos utilizados durante este trabajo.

10.2.1 Tabla de plásmidos utilizados en este trabajo

Plásmido/#BGSC	Características	Referencia
pDR111gfp (Sp)/ECE278	<i>bla^R amyE= Phyperspank-gfp(Sp) spec^R lacI =amyE</i> (Plásmido <i>shuttle</i> en <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i>)	(Overkamp <i>et al.</i> , 2013)
pSac-Cm/ECE174	Vector vacío, amp ^R <i>sacA</i> = cm ^R = <i>sacA</i> (Plásmido <i>shuttle</i> en <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i>)	(Middleton and Hofmeister, 2004)
pBS2E/ECE258	Vector vacío, amp ^R <i>lacA</i> = mls ^R = <i>lacA</i> (Plásmido <i>shuttle</i> en <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i>)	(Radeck <i>et al.</i> , 2013)
pCRM-Ts-Phleo	Plásmidos de replicación termosensible (30 °C), amp ^R , phleo ^R , contiene al gen <i>cre</i> (Plásmido <i>shuttle</i> en <i>E. coli</i> y <i>B. subtilis</i>)	Fernando Valle (Genencor)
ploxSpec-Walt	Plásmido de <i>E. coli</i> plasmid, amp ^R ; el gen <i>aadA</i> está flanqueado por los sitios <i>loxP</i> .	Fernando Valle (Genencor)

Tabla S2. Plásmidos utilizados durante este trabajo. En la primera columna, se menciona el nombre del vector y enseguida, posterior al símbolo “/”, se coloca el número de código del BGSC (*Bacillus Genomic Stock Center*), en caso de aplicar. amp^R/*bla^R*, resistencia a ampicilina/β-lactámicos; cm^R, resistencia a cloranfenicol; mls^R, resistencia a macrólidos, lincosamidas y estreptograminas (MLS) inducida por eritromicina; phleo^R, resistencia a fleomicina; spc^R, resistencia a espectinomicina. ==, locus de integración en el cromosoma de *B. subtilis*, si aplica.

10.3 Técnicas microbiológicas frecuentemente utilizadas en este trabajo

10.3.1 Preparación de células competentes de *E. coli*

Las células se prepararon como se indica en la referencia (Sharma and Schimke, 1996) con algunas modificaciones. El cultivo ON es ajustado a una $DO_{600}=0.05$ y se recrece hasta una $DO_{600}=0.5$, para empezar a cosechar las células. Además, todos los lavados se hacen en glicerol al 10%.

10.3.2 Protocolo de transformación de *E. coli*

Previamente a la transformación las ligaciones se purifican utilizando precipitación con butanol, como se describe previamente.

- 1.- En frío, agregar a un tubo de células de 50 μ l, 5 o 10 μ l de la ligación o 40 ng de DNA circular y transferir el contenido a una celda de electroporación fría.
- 2.- Incidir un choque de 1.75 mV a las celdas; inmediatamente agregar 700 μ l de medio SOC y transferir el contenido a un tubo de 1.5 ml.
- 3.- Mantener en agitación durante una hora 37 °C y 250 rpm.
- 4.- Plaquear en cajas Petri con medio LB + antibiótico de selección.

10.3.3 Protocolo de transformación mediante inducción de competencia natural en *B. subtilis*

- 1.- Crecer dos cultivos de la cepa *B. subtilis* a transformar en medio LB a 37°C y 200 rpm toda la noche.
- 2.- En un matraz hacer una dilución del cultivo en 25 ml de medio TF1, ajustando la OD_{600} (de 0.05 a 0.15). Dejar creciendo de 4 a 5 horas, hasta que el cultivo se vea turbio (aproximadamente a una OD_{600} de 0.76).
- 3.- En un segundo matraz diluir el cultivo 1/10 en medio TF2, agitar en vórtex (OD_{600} de aprox. 0.076).
- 4.- Añadir 0.5 ml de cultivo en tubos diferentes. Agregar a cada tubo 2 μ g de DNA linealizado o 1 μ g de DNA circular, según sea el caso, el tubo control no debe tener DNA. La muestra de DNA no debe exceder los 20 μ l.
- 5.- Incubar los tubos a 37°C de 2 a 3 hrs. y plaquear en cajas selectivas (con los antibióticos correspondientes).

10.3.4 Protocolo de inducción de la esporulación de *B. subtilis*

(Sterlini and Mandelstam, 1969; Wang and Llopis, 2016)

- 1.- Sembrar la cepa de *Bacillus subtilis* que se va a utilizar en caja, en medio LB, una vez que la cepa de interés creció mantener la caja a temperatura ambiente (la caja tiene que tener células frescas, sin guardar en el refrigerador).
- 2.- En 5 ml de medio CH (preparado el mismo día) sembrar la cepa de interés (tomar una asada) para dejar un overnight, este tiene que ser de 12 h, no más ni menos, tiene que ser siempre las mismas horas para que el experimento sea reproducible.
- 3.- Medir la D.O. $_{600nm}$ del overnight y calcular la cantidad de volumen necesario para comenzar el experimento de esporulación. Comenzar a D.O. $_{600nm}$ de 0.05 en 50 ml de medio CH en matraces de 200 ml (tener muy en cuenta no cambiar aleatoriamente la medida del matraz, ya que puede cambiar totalmente la cinética del experimento) a una temperatura de 37° C, 200 rpm.
- 4.- Monitorear la D.O. cada hora por al menos tres horas, hasta tener una densidad óptica de 0.6 aproximadamente (tener cuidado de no pasar de estas horas o medir a las dos horas y media por que la densidad en ese tiempo podría llegar hasta 0.9). Previamente comenzar a preparar el medio de resuspensión (aproximadamente unos 500 ml)
- 5.- Una vez que se alcanzó esa densidad centrifugar en frío en tubos falcón de 50 ml, limpios y estériles a 3600 rpm por 18 min.
- 6.- Eliminar el sobrenadante y adicionar unos 50 ml de **medio de resuspensión** (SM) y centrifugar nuevamente a 4° C, 3600 rpm por 18 min
- 7.- Eliminar el sobrenadante en condiciones estériles y adicionar otros 50 ml de SM, centrifugar a 4° C, 3600 rpm por 17 min.
- 8.- Eliminar el sobrenadante y adicionar 50 ml de medio de resuspensión, resuspender la pastilla celular y verterla en matraces estériles de 250 ml.
- 9.- Medir la D.O. inicial (Tiempo 0h) e incubar a 37° C, 200 rpm.
- 10.- Monitorear la D.O. cada hora durante 8 horas y tomar las muestras para el análisis a realizar;
 - a) Conteo de UFC en placa de LB. Se toman dos muestras de 100 μ l. Una de ellas se calienta durante 20 minutos a 80°C. De esta forma sólo las esporas sobrevivirán. Las diluciones se realizan en medio SM.

10.3.5 Tinción de esporas con verde de malaquita

(Modificado de Schaeffer and Fulton, 1930)

Preparación de la muestra:

1. Tomar una muestra de 1 ml de caldo de cultivo. La muestra debe estar en el rango de 0.1 a 0.5 unidades de absorbancia a 600nm. Diluir o concentrar en solución salina (0.9% NaCl, 0.05% Tween 80) según sea necesaria.
2. Centrifugar a 12000 rpm por 3 min. Y lavar el pellet con solución salina.
3. Centrifugar a 12000 rpm por 3 min. Resuspender en agua destilada.

Tinción con verde de malaquita:

1. Colocar 40 μ l de muestra en un portaobjetos.
2. Fijar en una parrilla eléctrica a 55°C (observar que la muestra se seque completamente)
3. Colocar el portaobjetos sobre baño de maría de tal manera que los vapores calienten la muestra.
3. Cubrir la muestra en el portaobjetos con verde de malaquita al 5% (esta solución debe estar filtrada a 0.45 μ m). Mantener al baño maría por 10 minutos cuidando que el colorante no se seque. Adicionar otro poco en caso de ser necesario.
4. Retirar la muestra del baño maría, permitir que la muestra se enfríe y eliminar el exceso de verde de malaquita con agua destilada (esto debe hacerse en un recipiente para almacenar los desechos de tinción).
5. Secar la muestra y cubrirla con fucsina fenicada diluida (0.1% en agua) durante 5 minutos.
6. Lavar el exceso de colorante con agua destilada y secar.
7. Observar al microscopio en el objetivo 100X.

La célula vegetativa se tiñe violeta mientras que la endoespora y la espora se tiñen de color verde.

10.4 Medios y soluciones

10.4.1 Transformación por inducción de competencia natural en *B. subtilis*

a) Sales de *Bacillus* 10X

Sales de <i>Bacillus</i> 10X		
Compuesto	1000 ml	100 ml
K ₂ HPO ₄	140 g	14 g
KH ₂ PO ₄	60 g	6 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g	2 g
Na citrate	10 g	1 g

Tabla S3. Componentes de las sales de *Bacillus* 10X. Se muestran la cantidad de compuesto a añadir para la preparación de 1 L y 100 ml de solución.

*Esterilizar por autoclave.

b) Glucosa al 20%

Disolver 20 g de dextrosa en H₂O mQ, aforar a 100 ml y esterilizar mediante filtración.

c) CAAs al 2%

Disolver 1 g de casaminoácidos en H₂O mQ, aforar a 50 ml y esterilizar mediante filtración. Almacenar a 4 °C.

d) Preparación de medios TF1 y TF2

Solución stock	TF1 25 ml	TF1 50 ml	[Final]	TF2 25 ml	TF2 50 ml	[Final]
Sales de <i>Bacillus</i> 10X	2.5 ml	5 ml	1X	2.5 ml	5 ml	1X
Glucosa 20%	625 µl	1.25 ml	0.5%	625 µl	1.25 ml	0.5%
MgSO ₄ 10 mM	12.5 ml	25 ml	5 mM	12.5 ml	25 ml	5 mM
Casaminoácidos 2%	250 µl	500 µl	0.02%	125 µl	250 µl	0.01%
Triptófano 2mg/ml	625 µl	1.25 ml	50 µg/ml	62.5 µl	125 µl	5 µg/ml
H ₂ O mQ	8.5 ml	17 ml		9.18 ml	18.3 ml	

Tabla S4. Componentes de los medios TF1 y TF2. En color rosa se denota la cantidad de soluciones *stock* que se necesitan agregar para preparar 25 y 50 ml de medio TF1. En color verde se denota la cantidad de soluciones *stock* que se necesitan agregar para preparar 25 y 50 ml de medio TF2.

*Tanto el medio TF1 como TF2 se preparan el día de su uso en condiciones de esterilidad.

e) Triptófano 2mg/ml

Disolver 50 mg de triptófano en H₂O mQ, aforar a 25 ml y esterilizar mediante filtración. Almacenar a 4 °C.

* Este protocolo considera agregar triptófano al asumir el uso de la cepa auxótrofa a triptófano *B. subtilis* 168 *trpC2*. Para cepas protótrofas, este aminoácido puede ser omitido. En cepas con auxotrofías adicionales, deben añadirse los nutrientes correspondientes.

10.4.2 Inducción de la esporulación en *B. subtilis* (Sterlini and Mandelstam, 1969; Wang and Llopis, 2016)

Medio CH

El medio se prepara con las soluciones CHI+II, CHIII, CHIV y CHV. Todas estas soluciones se juntan en condiciones de esterilidad el día de uso.

a) CHI+II

CHI+II (940 ml)	
Compuesto	Cantidad
Hidrolizado de caseína	8.6 g
L-ácido glutámico	3.16 g
L-alanina	2.14 g
L-asparagina monohidratada	1.2 g
KH ₂ PO ₄	1.36 g
NH ₄ Cl	0.535 g
Na ₂ SO ₄	0.107 g
NH ₄ NO ₃	0.096 g
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.6 mg

Tabla S5. Componentes de la preparación del medio CHI+II.

Forma de prepararlo: Se disuelve el ácido L-glutámico en agua destilada (800 ml de agua). Ajustar hasta un pH aproximado de 6.8 con NaOH 10 M, agregar gota a gota el hidróxido de sodio. Agregar los reactivos restantes y terminar de ajustar el pH a 7 final. Finalmente aforar a un volumen de 940 ml.

b) CH III

CH III (100 ml)	
Compuesto	Cantidad
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.198 g
10% (w/v) CaCl ₂ ·6H ₂ O	0.4 ml

Tabla S6. Componentes de la preparación del medio CH III.

Forma de prepararlo: se prepara 1ml de cloruro de calcio al 10% (se pesan 0.1 g) y se pesan 0.169 g de sulfato de magnesio pentahidratado en 100 ml de agua destilada. Si utilizamos 10% (w/v) CaCl₂·2H₂O, se agregan 0.269 ml a 100 ml de agua destilada.

- c) CH IV
Disolver 0.11 g de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 10 ml de agua destilada. Esterilizar
- d) CH V
Disolver 10 mg de L-triptófano en 5 ml de agua, filtrada y esterilizada (2mg/ml)

Medio de resuspensión SM

El medio de resuspensión se prepara mezclando la solución A, solución B, solución C, solución D y solución E el día de uso.

a) Solución A

Solución A (100 ml)	
Compuesto	Cantidad
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.089 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.830 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.979 g

Tabla S7. Componentes de la preparación de la solución A.

Forma de Prepararlo: Utilizar agua esterilizada disolver los reactivos y filtrar (no esterilizar por calor porque el tricloruro de hierro se puede reducir a dicloruro de hierro), posteriormente guardar esta solución a 4° C y con papel aluminio o en un frasco ámbar estéril.

b) Solución B

Solución B (100 ml)	
Compuesto	Cantidad
NH_4Cl	5.35 g
Na_2SO_4	1.06 g
KH_2PO_4	0.68 g
NH_4NO_3	0.97 g

Tabla S8. Componentes de la preparación de la solución B.

Forma de Prepararlo: Disolver todos los reactivos en 80 ml de agua destilada y ajustar el pH a 7 con NaOH 10 M (gota a gota), ajustar el volumen a 100 ml, esterilizar y guardar la solución a 4° C.

c) Solución C

5% de L-glutamato. Se ajusta a pH 7 con NaOH 10 M para su disolución. Esterilizar por autoclave.

d) Solución D

0.1 M CaCl_2 . Disolver 1.47 g de $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ en 100 ml de H_2O . Esterilizar por autoclave.

e) Solución E

1 M MgSO₄·H₂O. Esterilizar por autoclave.

Los medios se mezclan el mismo día que se utilizan (no mezclarlos ni siquiera un día antes, porque los reactivos van precipitándose durante el transcurso de las horas, por lo tanto, el medio de cultivo pierde funcionalidad).

f) Preparación de medios CH y SM

CH (100 ml)		SM (100 ml)	
Solución	Volumen (ml)	Solución	Volumen (ml)
CHI + II	94.0	H ₂ O	88.9
		CH V	1
		Solución A	0.1
		Solución B	1
CH III	5	Solución C	4
CH IV	0.2	Solución D	1
CH V	1	Solución E	4

Tabla S9. Componentes de la preparación de los medios CH y SM; 100 ml de medio CH (azul) y 100 ml de medio SM (verde).

* Este protocolo considera agregar triptófano al asumir el uso de la cepa auxótrofa a triptófano *B. subtilis* 168 *trpC2*. Para cepas protótrofas, este aminoácido puede ser omitido. En cepas con auxotrofías adicionales, deben añadirse los nutrientes correspondientes.