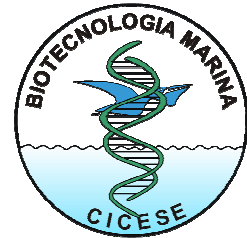


**CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE EDUCACIÓN
SUPERIOR DE ENSENADA, B. C.**



DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA

**DEPARTAMENTO DE ACUICULTURA,
BIOTECNOLOGÍA MARINA**



**Efecto de SinR en *aprE* y su función en la regulación
transcripcional en *Bacillus subtilis***

TESIS
que para cubrir parcialmente los requisitos
Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M.C. ALEJANDRO SÁNCHEZ GONZÁLEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE OLMOS SOTO

Ensenada B. C.

29 de agosto del 2003.

**TESIS DEFENDIDA POR
Alejandro Sánchez González
Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ**

**Dr. Jorge Olmos Soto
DIRECTOR DEL COMITÉ**

**Dra. Elizabeth Ponce Rivas
MIEMBRO DEL COMITÉ**

**Dr. Eugenio Carpizo Ituarte
MIEMBRO DEL COMITÉ**

**Dr. Alexei F. Licea Navarro
Miembro del comité**

**Dr. Benjamín Barón Sevilla
Jefe del Depto. de Acuicultura,
Biotecnología Marina**

**Dr. José Luis Delgado Argote
Director de Estudios de Postgrado**

29 DE AGOSTO DEL 2003.MIEMBRO DEL COMITE

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Introducción	1
Antecedentes	4
II.1 Regulación por medio de interacciones moleculares	11
II.2 Análisis molecular de interacciones proteína-proteína....	12
Justificación	15
Objetivos	16
CAPÍTULO 1 CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES	
Introducción	18
Materiales y métodos	19
VI.1 Cepas, plásmidos y medios de cultivos.....	19
VI.2 Diagrama general para la construcción de mutantes.....	20
VI.3 Técnicas	21
VI.4 Mutagénesis puntual por PCR	27
Resultados y Discusión.....	24
VII.1 Análisis de mutantes SinD2A	26
VII.2 Análisis de mutantes SinD3A	28
VII.3 Mutantes seleccionadas para secuenciación	32
VII.3.1 Purificación de los plásmidos seleccionados	33
VII.4 Análisis de las secuencias construidas	35
VII.5 Relación de las secuencias con su Actividad	35
Conclusión	38
CAPITULO 2 EFECTOS DE LA ALTERACIÓN DEL SITIO DE UNIÓN DE LA PROTEINA HPR EN <i>APRE</i>	
Introducción	41
Materiales y métodos	42
X.1 Determinación de A _E de β-galactosidasa	42
X.2 Construcción de cepas mutantes de <i>B. subtilis</i>	42
X.3 Construcción de cepas mutantes por inserción.....	42
Resultados y Discusión.....	43
XI.1 Determinación de A _E de β-galactosidasa	43
XI.2 Construcción de cepas mutantes de <i>B. subtilis</i> -204	45
XI.3 Análisis de la cepa -204	46
XI.3 Construcción de cepas mutantes de <i>B. subtilis</i> -244	47
XI.4 Análisis de la cepa -244	48
XII. Inserciones 5, 10, 15 y 20 pb en <i>aprE</i>	49
XII.1 Resultados de inserciones en <i>E. coli</i>	49
XII.2 Resultados de inserciones en <i>B. subtilis</i>	50
XIII. Conclusión.....	52
XIV. Posible heterodimerización.....	53

	PÁG.
CAPITULO 3 NUEVO SITIO DE UNION PARA SINR	
XV. Introducción	56
Materiales y métodos	57
XVI.1 Programa DNASTAR	57
XVI.2 Resultados de alineamientos y análisis de homología <i>utilizando el programa DNASTAR</i>	57
XVI.3 <i>Búsqueda de otros sitios de unión para SinR a nivel genómico con Herramientas Bioinformáticas</i>	59
XVII. Resultados y Discusión.....	60
XVIII. Conclusión	62
CAPITULO 4 SISTEMA DE DOS HÍBRIDOS BACTERIANO LEXA	
XIX. Introducción	65
XX. Materiales y métodos	67
XX.1 Cepas	67
XX.2 Plásmidos.....	68
XX.3 Diseño de oligos	71
XX.4 Construcción de plásmidos	74
XXI. Resultados y Discusión.....	76
XXI.1 Resultados de las transformaciones con el sistema DHB.....	81
XXI.1.1 <i>Cepa SU101</i>	82
XXI.1.2 <i>Cepa SU202</i>	82
XXII. Conclusión	86
CONCLUSIÓN GENERAL	
XXIII. Conclusiones generales.....	89
Modelo de regulación de <i>aprE</i>	92
Perspectivas	93
Bibliografía.....	95
ANEXOS Técnicas Detalladas	
Columnas de cromatografía para purificación de ADN.....	A1
Determinación de A _E de β-galactosidasa.....	A2
Digestión con enzimas de restricción.....	A3
Ligación.....	A4
Preparación de reactivos, antibióticos y medios de cultivo.....	A5
Purificación de ADN cromosomal de bacterias.....	A6
Purificación de ADN plasmídico.....	A7
Purificación por filtración en Centricones.....	A8
Purificación por la técnica Fenol-Cloroformo.....	A9
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	A10
Transformación de <i>B. subtilis</i>	A11
Transformación de <i>E. coli</i> DH5α.....	A12
Tratamiento para preparar células competentes.....	A13

LISTA DE TABLAS

Tabla		Pág.
I	Cepas utilizadas	19
II	Oligonucleótidos utilizados	22
III	Cepas que presentaron alteración de estructura y/o secuencia.	27
IV	Mutantes SinD2A y A _E en U.M	27
V	Cepas SinD3A con alteración de estructura y/o secuencia.	28
VI	Cepas mutantes SinD3A y A _E en U.M.	28
VII	Mutantes seleccionadas para secuenciar.	32
VIII	Análisis de pureza del DNA de las cepas	34
IX	A _E de β-galactosidasa en el estadio T ₂ de cepas -204	45
X	A _E de β-galactosidasa en el estadio T ₂ de cepas -244	47
XI	A _E de β-gal en el estadio T ₂ de cepas PLK5,10,15, 20	49
XII	A _E de β-gal en el estadio T ₂ de cepas BB80 y BB82	50
XIII	Comparación del efecto causado por inserciones	51
XIV	Algunos de los Genes co-regulados por SinR	61
XV	Oligonucleótidos para el sistema DHB LexA	73
XVI	Interacción que presentaron las cepas.	84
XVII	Cepas que presentaron interacción proteína-proteína	85
XVIII	Cepas que presentaron interacción proteína-proteína	86

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema general del operón <i>sinIR</i> . A) en forma de secuencia de nucleótidos y aminoácidos. (B) en forma lineal	6
2	Esquema de la región reguladora del gene <i>aprE</i> . A) como secuencia de nucleótidos. B) en forma lineal.....	7
3	Esquema donde se señala a las guaninas sustituidas por la técnica de PCR.....	23
4	Plásmido pSG35.1 de 11.0 Kb.....	24
5	Gel de poliacrilamida 7% donde se observan fragmentos de ~600 pb que representan la <i>rraprE</i> modificada o mutada.....	25
6	Mutantes SinD3A en un gel de poliacrilamida 7%.....	25
7	Más mutantes SinD3A en un gel de poliacrilamida 7%...	26
8	Absorbancia medida a 600 nm en función del tiempo, de las mutantes SinD2A.....	29
9	A_E que presentaron las cepas SinD2A de <i>E. coli</i> en función del tiempo.....	30
10	Cinética de crecimiento de las cepas SinD2A en <i>B. subtilis</i> a condiciones estandar.....	30
11	A_E en U.M. de las cepas SinD2A de <i>B. subtilis</i>	31
12	Continuación de la A_E en U.M. de las cepas SinD2A de <i>B. subtilis</i>	31
13	A_E de las cepas SinD3A de <i>E. coli</i> donde observamos 3 tipos de expresiones distintas.....	32
14	Construcciones resultantes de secuencias de <i>aprE</i> donde se une	35

SinR.....

15	Cinética de crecimiento de la cepa <i>E. coli</i> DH5 α transformada con pSG35.1 y p-244.....	44
----	--	----

LISTA DE FIGURAS (continuación)

página

16	A _E de β -galactosidasa de las cepas <i>E. coli</i> DH5 α	44
17	Alineamiento del gene <i>aprE</i> de la base -665 a la +50 con respecto del punto de inicio de la transcripción.....	58
18	Plásmidos pDP804 y pMS604, requeridos para el sistema DHB basadoi en LexA.....	68
19	Promotores de las cepas SU101 y SU202.....	69
20	Fundamento del sistema DHB basado en LexA.....	70
21	Plásmidos del sistema DHB basado en LexA en un gel de agarosa 1.2%.....	71
22	Gel de agarosa 1.5%, el numero 58 (pSR658) o 59 (pSR659) indican a que plásmido serán ligados.....	76
23	Gel de agarosa 1.5%. En el carril 1 y 2 estan los genes <i>hpr</i> y <i>sinR</i> respectivamente.....	77
24	Productos de PCR de 3 cepas seleccionadas al azar para verificar su genotipo adquirido.....	78
25	Productos de PCR provenientes de las cepas SU101 transformadas con los plásmidos <i>hpr1.1</i> y <i>sin1.1</i>	79
26	Fragmentos de DNA que corresponden a productos de PCR a partir de los plásmidos 2.1.....	80
27	Gel de agarosa 1.5% conteniendo los genes anzuelo de la cepa <i>su202</i> del carril 1-12.....	80

28	Colonias transformantes del sistema DHB LexA.....	81
29	Modelo de Regulación de <i>aprE</i> , con todos los resultados integrados.....	92
30	Columnas de Shepadex 50.....	ANEXO
31	Centricones.....	ANEXO

I. INTRODUCCIÓN

El gene *aprE* codifica para la proteasa extracelular subtilisina, ha sido utilizado como modelo para tratar de entender el sistema complejo de regulación que controla la expresión genética durante el estado de transición y la fase estacionaria en *Bacillus subtilis* (Kunst *et al.* 1974; Ferrari *et al.* 1985, 1986, 1988). La expresión de *aprE* es controlada por varios reguladores; DegU/DegS (Olmos *et al.* 1997; Henner *et al.* 1988; Kunst *et al.* 1988; Msadek *et al.* 1990), AbrB (Strauch *et al.* 1989; Olmos *et al.* 1998), Hpr (también conocida como ScoC) (Kallio *et al.* 1991) y SinR (Gaur *et al.* 1991; Mandic-Mulec *et al.* 1992; Bai *et al.* 1992; Olmos *et al.* 1997). Según el análisis *in-vitro* por geles de retardamiento y/o análisis de “footprinting”, SinR se une a la región reguladora de *aprE* entre las bases -217 y -263 con respecto al punto de inicio de la transcripción, que es un sitio palindrómico dividido en SB1-A y SB1-B (Gaur *et al.* 1991).

SinR es una proteína reguladora que tiene como función inducir efectos positivos y negativos en la expresión de diferentes genes. La inactivación de SinR por mutaciones nulas, provoca un incremento en las actividades de las proteasas extracelulares, alteración de crecimiento en forma filamentosa, pérdida de la competencia, motilidad y una deficiencia en la producción de autolisinas (Gaur *et al.* 1986; Bai *et al.* 1993). Altos niveles de SinR (plásmidos multicopia) reprimen la esporulación, la producción de proteasas extracelulares y la expresión de *lacZ* en una fusión *aprE-lacZ* (Henner *et al.* 1988; Olmos *et al.* 1997).

Basándose en estos resultados, es generalmente asumido que SinR es un represor que actúa directamente sobre *aprE*. Una predicción de este modelo es que una mutación nula en *sinR* debería elevar los niveles de expresión de *aprE*; sin embargo, Olmos *et al.* 1997, mencionan que si se interrumpe *sinR* con el gene que confiere resistencia a cloranfenicol, disminuye la expresión de *aprE* aproximadamente en un 50%. Esto fue medido utilizando la fusión transcripcional *aprE-lacZ* donde se determinó la actividad específica de β -galactosidasa.

Además, en este mismo trabajo se presentan resultados que muestran que una mutación nula de SinR induce la expresión de los genes del estadio-II una hora antes con respecto a la cepa control (Mandic-Mulec *et al.* 1992). Este acortamiento del periodo de expresión del gene estructural de la subtilisina podría ser la causa del efecto negativo observado en las mutaciones nulas de SinR sobre *aprE* (Olmos *et al.* 1997), lo que podría estar enmascarando el verdadero papel funcional que lleva a cabo la proteína SinR sobre *aprE*.

Una pregunta central en el estudio de cualquier proteína es el determinar que otras proteínas hacen contacto con ella. Las interacciones proteína-proteína son esenciales para la mayoría de los procesos biológicos, incluyendo replicación, transcripción, secreción, traducción de señales y metabolismo. Los complejos multiprotéicos constituyen un extenso arreglo de agentes biológicos importantes dentro de las células. El reto es

identificar los elementos importantes claves que manejan el proceso bajo estudio (Garente L. 1993)

En este trabajo se llevaron a cabo mutaciones por remoción y mutaciones puntuales en el supuesto sitio de unión de la proteína SinR, en *aprE*. Estudiamos los efectos ocasionados por las mutaciones, y utilizamos herramientas de Bioinformática como alineamientos de secuencias y el programa Regulon-DB para tratar de entender los procesos de unión y mecanismos de función de SinR. Analizamos a los reguladores transcripcionales AbrB, DegU, Spo0A, Hpr y SinI con el sistema de dos híbridos bacteriano para identificar interacciones *in-vivo* de SinR con otros factores que participen en la regulación de *aprE* en *B. subtilis*. Estudiamos también a SinR como regulador global de la transcripción, para determinar las causas por lo cual se afecta un numero elevado de genes que aparentemente no tienen relación, en esta parte utilizaremos herramientas actuales de Bioinformática como el programa Regulon-DB.

II. ANTECEDENTES

El gene *sin* fue aislado por primera vez a partir de un fragmento del cromosoma de *B. subtilis*, el cual, cuando se encontraba en plásmidos de alto número de copias, causaba la inhibición de la esporulación y de la producción de proteasas extracelulares (Gaur *et al.* 1986). Dentro de este locus, el gene *sinR* forma parte de un operón dicistrónico y es precedido por un gene llamado *sinI* (Bai *et al.* 1992). Este operón cuenta con tres promotores, dos de los cuales regulan la transcripción de ambos genes (P1 y P2), mientras que el otro (P3) regula únicamente la transcripción de *sinR* (Fig. 1A y 1B) (Gaur *et al.* 1988). El gene *sinR* se expresa a un nivel bajo constantemente durante el crecimiento vegetativo y la esporulación, es independiente de SpoOA y SpoOH. Se cree que la mayor parte de la regulación del gene *sinR* ocurre a nivel postraducciona l y es llevada a cabo por el producto de *sinI*, el otro gene del operón *sin*. SinI interacciona con la región C-terminal de SinR por interacción proteína-proteína, rompiendo al dímero e impidiendo que SinR se una al DNA (Bai *et al.* 1993).

La inactivación del gene *sinR* en el cromosoma provoca una pérdida de la habilidad para desarrollar competencia y movilidad (Gaur *et al.* 1988). SinR es una proteína dimérica de unión a DNA de 14 KDa (Cervin *et al.* 1998).

Es un miembro de la familia Cro de reguladores transcripcionales y tiene una estructura de Hélice-vuelta-hélice (H-V-H) Leucina Zipper (Gaur *et al.* 1991). SinR se une a la región reguladora de *aprE* entre las bases -217 a -263 con respecto al punto de inicio de la transcripción que es un sitio palindrómico dividido en SB1-A y SB1-B (Fig. 2A y 2B), según análisis *in-vitro* por geles de retardamiento y/o análisis de “footprinting” (Strauch *et al.* 1989, Gaur *et al.* 1991; Kallio *et al.* 1991). Esta región de unión se localiza adyacente a una región donde se une la proteína Hpr (-290 a -265) (Gaur *et al.* 1991; Strauch y Hoch, 1995). En experimentos de competencia con mezclas se ha determinado que la unión de Hpr y SinR ocurre independientemente una de otra. Ambas proteínas reprimen a *aprE* en forma independiente, aunque es probable que actúen sinérgicamente (Strauch y Hoch, 1995).

SinR es una proteína pleiotrópica esencial para los procesos de crecimiento tardíos, como la competencia y movilidad, también es represor de otros, p.ej., esporulación y síntesis de subtilisina (exoproteasa) (Gaur *et al.* 1986; Mandic-Mulec *et al.* 1992; Sekigushi *et al.* 1988). Se ha mencionado que la proteína SinR podría actuar como “switch” regulador, favoreciendo el desarrollo de algunos procesos de adaptación e impidiendo el gasto de energía que utilizaría la célula al entrar a otros procesos, pero aun hay mucho por entender acerca del proceso de regulación donde participa SinR. En nuestro trabajo de tesis de maestría titulado “Mutagénesis del sitio de unión de la proteína SinR en

la región reguladora del gene *aprE*', se buscó determinar el papel que desempeña la proteína SinR dentro de los mecanismos de regulación en la expresión del gene *aprE*.

A)

XbaI
TCTAGAAAACAGGCGCTGAAAACCTTGATCAACCAAGATATCAGTTGAAATTGAAAATGCCCCATTGTTTATCTGTGCAAATAATATTTCAACCTA 99

ACTTTTTACCATTTCGACATCAITCTCGTTTTTTTGGAGAAAATACGATTATAATAAAGGTATATTGGAAAAAATCTGGTGATTAATGGTGAATAATGGCAAATGA 198

CTTCGAGAGACTAATCAAGGATACAATAAGTCATGGCCCCACTGGTTCAAATAACATAAAACAAGTATTTGGGAGGAGAAACTGG ATG AAG AAT 291
Sin R S. D. 1 f-met Lys Asn

GCA AAA CAA GAG CAC TTT GAA TTG GAT CAA GAA TGG GTT GAA TTA ATG GTG GAA GCC AAA GCC GCA AAT ATC AGC 366
Ala Lys Gln Glu hss Phe Glu Leu Asp Gln Glu Trp Val Glu Leu met Val Glu Ala Lys Glu Ala Asn Tle Ser

GCG GAA GAA ATA CGA AAA TAT TTA CTT TTA AAC AAA AAG TCT GCT CAT CCT GCT GGT GCA GCC AGA AGT CAT ACC 441
Pro Glu Glu Ile Arg Lys Tyr Leu Leu Leu Asn Lys Lys Ser Ala Hfs Pro Gly Pro Ala Ala Arg Ser His Thr

GTA AAT CCT TTC TGA ATGTGCTATAATACACAAGGAAGCTGATGACA TTG ATT CGC CAG CGT ATT AGC TCA TAC CGT AAA 522
Val Asn Pro Phe *** S. D. 2 f-met Ile Gly Gln Arg Ile Lys Gln Tyr Arg Lys

GAA AAA CGC TAC TCA CTA TCA GAA CTA GCT GAA AAA GCT GGG GTA GCG AAG TGT TAT TTA AGC TCA ATA GAA CGA 597
Glu Lys Gly Try Ser Leu Ser Glu Leu Ala Glu Lys Ala Gly val Ale Lys ser tyr Leu Ser Ser Ile Glu Arg

AAT GTA CAA ACGAAC CGG TCC ATT CAA TTT CTC CAA AAA GTC TCC GCT GTT CTG GAC GTC TCG GTT CAT ACT TTG 672
Asn Leu Gln Trn Asn Pro Ser Ile Gln Phe Leu Glu Lys Val Ser Ala Val Leu Asp Val Ser Val His Inr Leu

CTC GAT GAG AAA CAT GAA ACC GAA TAC GAT GGT CAA TTA GAT AGT GAA TGG GAG AAA TTG GTT CGC GAT GCC ATG 747
Leu Asp Glu Lys His Glu Tyr Glu Tyr Asp Gly Gln Leu Asp Ser Glu Trp Glu Lys Leu Val Arg Asp Ala Hef

ACA TCC CGG GTA TCG AAA AAA CAA TTT CGT GAA TTT TTA GAT TAT CAA AAA TCG AGA AAA TCC CAA AAA GAG GAG 822
Thr Ser Gly Val Ser Lys Lys Gln Phe Arg Glu Phe Leu Asp Tyr Gln Lys Trp Arg Lys Ser Gln Lys Glu Glu

TAG TGCCTGAGCAGAGGCCACTAATCTCTCTTTTGTCAATAACCATCGCGACGCCCCAGTAT ATG ACT GGGCCG TCT CTT TTT TTT 910
Thr S. D. 3 f-Met Asn Thr Gly Pro Ser Leu Phe Phe

GCT GTT ATT AAT TTT TAT CCT CGC TAT GCC CTT TTT CAT TTT CTT TCA CCT AAG CAT CTT TAT CAG TAT GGT CCT 985
Ala Val Ile Asn Phe Try Pro Arg Tyr Ala Leu Phe His Phe Leu Ser Arg Asn His Leu Try Gln Tyr Gly Pro

Hind III
TTT TGA TTGCAAGCCGTTCCACTGTGTAGCTTCCAATGACAATTGAAGCTT 1037
Phe ***

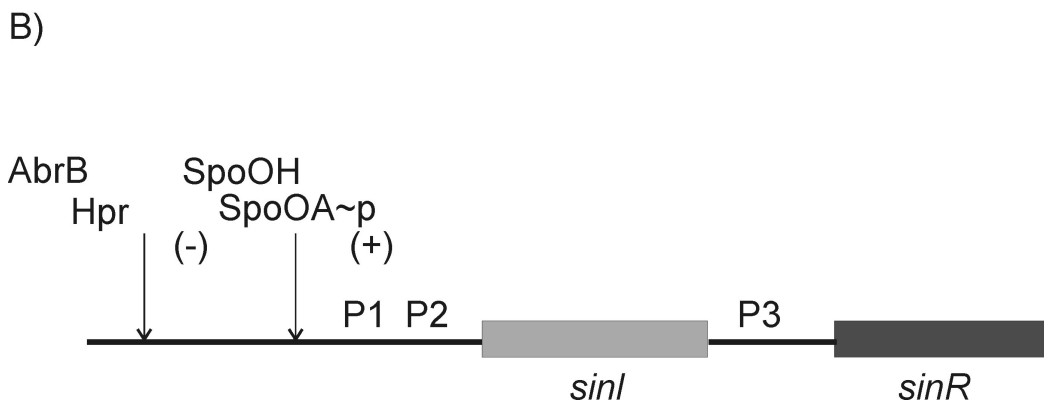


Figura 1. Esquema general del operón *sinIR*, en forma de secuencia de nucleótidos y aminoácidos (A) y en forma lineal (B). En fase exponencial el gene *sinR* es transcrito a partir del promotor P3, debido a que los promotores P1 y P2 se encuentran reprimidos por las proteínas Hpr y AbrB. Al inicio de la fase estacionaria (To) SpoOA-P en conjunto con SpoOH induce la transcripción del operón *sinIR*.

A)

-400 OA

GGCGGCCGCA TCTGATGTCT TTGCT **TGGCG AAT** GTTTCATC TTATTTCTTC CTCCCTCTCA

HPR (1) -300

ATAATTTTTT CATTCTATCC CTTTTCTGTA A **AGTTTATTT TTCAGAATAC TTTTATCATC**

HPR (2) SIN

A TG **CTTTGAA AAAATATCAC GATAATATC** C AT **TGTTCTCA CGGAAGCACA CGCAGGTCAT**

OA -200

TTGAACGAAT TTTTTCGACA GGAATTTGCC GGGACTCAGG AGCATTTAAC CTAAAAAAGC

B)

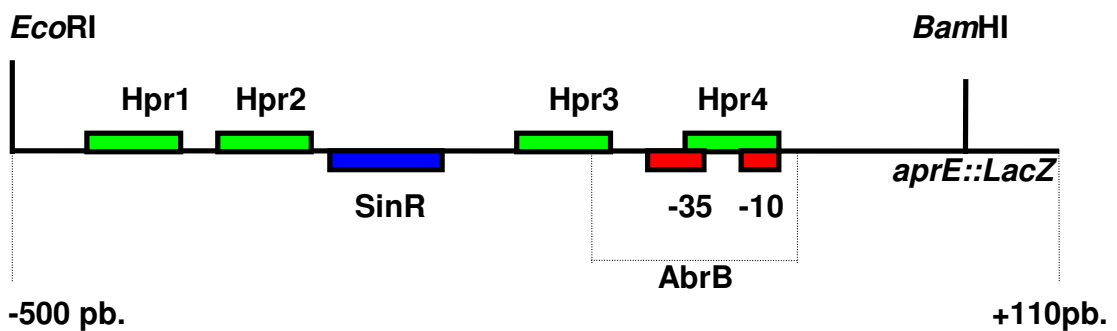


Figura 2. Esquema de la región reguladora del gene *aprE*, como secuencia de nucleótidos (A), en forma lineal (B). Los cuadros representan los sitios de unión para las proteínas reguladoras, entre ellas SinR. Los sitios de restricción para *EcoRI* y *BamHI* son señalados. También se muestra los pares de bases con respecto al punto de inicio de la transcripción. Estos sitios fueron determinados por medio de experimentos de “footprinting” *in vitro* para el caso de las proteínas Hpr, SinR y AbrB, por experimentos de remoción para la proteína DegU y por análisis de secuencia para SpoOA (Gaur *et al.* 1991; Henner *et al.* 1988a; Kallio *et al.* 1991; Strauch y Ayazifar, 1995).

Como parte inicial se construyeron mutantes en el sitio de unión de la proteína SinR en la región reguladora de *aprE*. Fue construida la mutante -244 por la estrategia de remoción (véase materiales y métodos) y se analizó bajo distintos fondos genéticos (*hpr*, *sinR*, *hpr/sinR*) al igual que la mutante -204 (Olmos *et al.* 1996). En este trabajo de Doctorado se estudiaron y cuantificaron los efectos de las mutaciones introducidas y se determinó actividad específica de β -galactosidasa. Analizando los resultados se diseñó un posible modelo de regulación teórico que explica el comportamiento de nuestras mutantes. Este trabajo permitió entender mejor los procesos de reconocimiento y pegado de SinR y con este modelo surgió la hipótesis sobre la existencia de dos sitios de unión para SinR, lo que incrementaba la posibilidad de que SinR funcione por medio de la formación de un doblez en el DNA. Además se determinó que SinR ejerce su efecto aun estando presente la mitad de su sitio de unión y que se une en este sitio (Kallio *et al.* 1991).

Este tipo de regulación por medio de la formación de un doblez de DNA es un mecanismo de acción a distancia para la regulación de la expresión genética ha sido descrito en otros complejos transcripcionales de procariotas como es el caso para el operón de arabinosa (Huo *et al.* 1988; Lee & Schlieff 1989); y el represor-operador de *lac*. Además se ha observado que éste proceso no solo aumenta la afinidad de una proteína

por su DNA "blanco", sino también cambia dramáticamente la estructura del complejo regulatorio (Pruss *et al.* 1989).

Se ha sugerido que la expresión genética es regulada, por lo menos en parte, por cambios osmóticos inducidos en la topología del DNA y que el estado super enrollado *in vivo* es influenciado por la osmolaridad del medio de cultivo (Higgins *et al.* 1992).

Esta suficientemente claro que el superenrollamiento y la reestructuración forman parte del amplio repertorio celular regulatorio; y que algunas proteínas pueden contribuir con estos procesos provocando variaciones locales y generales significativas (Pruss *et al.* 1989). Existen casos de proteínas que inducen cambios en la topología del DNA para procesos reguladores, tal es el caso de la proteína HN-S que forma parte de los componentes estructurales de cromatina bacteriana en *E. coli* (Owen. 1992). La interacción de HN-S con DNA curvo localizado hacia abajo del promotor del gene *proU* es requerida para la regulación normal de su expresión. No existe una conexión obvia entre los genes regulados por H-NS, los cuales se encuentran distribuidos alrededor del cromosoma y son regulados en respuesta a distintos estímulos. Las mutaciones *hns* además de afectar la transcripción, también afectan la frecuencia de corte cromosomal, transcripción y eventos de recombinación sitio-específica (Higgins *et al.* 1992; Lejeune & Danchin, 1990; Falconi *et al.* 1992). Por ello los fenotipos de las mutantes *hns* no se consideran proteínas reguladoras clásicas que reconocen secuencia específica, pero si contienen

características de componentes estructurales de cromatina bacteriana (Owen. 1992). Posiblemente en *Bacillus subtilis* ocurra un mecanismo de regulación semejante donde la proteína reguladora SinR tenga uno de los papeles principales y afecte regulones globales. Mutantes *sinR* podrían estar provocando la inactivación transcripcional de regiones completas en el cromosoma, anulando de esta manera ciertos procesos.

Comúnmente se ha estudiado a los genes como entidades individuales. Una célula era solo considerada como una bolsa llena de genes y de productos de los genes. Debido a que la presión de selección puede actuar sobre cualquier tipo de organización, el estudio de secuencias genómicas completas nos permite ahora considerar si realmente los genomas son una colección de genes, o si en realidad hay algo más por ser descubierto en términos de estructura y dinámicas de la célula y organismos a nivel global.

El perfil de expresión de la transcripción puede ser utilizado para estudiar tanto al transcriptoma (totalidad de los genes transcritos) o el proteoma (totalidad de las proteínas producidas) de una bacteria.

Al tratar de proponer un modelo de regulación que nos permita conocer y manipular el sistema de expresión de genes para la producción de proteínas heterólogas se realizaron mutaciones puntuales y cortes en el sitio de unión de SinR en la región reguladora de *aprE*, se estudiaron las interacciones proteína-proteína para determinar algún posible sistema de

regulación de este tipo y se utilizaron herramientas bioinformáticas para el estudio de la regulación transcripcional a nivel específico y global.

Buscaremos obtener más resultados que puedan generar información para conocer, entender y poder manipular sistemas de regulación, tomando como gene modelo a *aprE*.

II.1 REGULACIÓN POR MEDIO DE INTERACCIONES MOLECULARES

Muchos problemas en la biología moderna involucran arreglos complejos de proteínas que interactúan y en algunos casos, moléculas de RNA. Las maquinarias biológicas como los ribosomas, espliceosomas o polimerasas contienen muchas especies de polipéptidos y llevan a cabo pasos fundamentales en la síntesis macromolecular. Un ejemplo de esto lo constituyen los sistemas de factores transcripcionales que interactúan para regular la expresión de genes que controlan el crecimiento y la diferenciación celular.

Por medio de algunos estudios comunes se han identificado a proteínas específicas que, aunque son esenciales para alguna función, no son más que simples dispositivos o partes de un arreglo complejo de elementos que interactúan. El reto experimental en estos casos es utilizar a la proteína disponible como herramienta para aislar los otros componentes de la interacción (Garente L. 1993).

El ejemplo muy utilizado como caso de prueba son las interacciones c-jun-c-fos.

En contraste a esta búsqueda *in-vitro*, se han descrito semejanzas *in-vivo* que emplean por ejemplo a *Saccharomyces cereviceae*, en el caso del di-híbrido (Field y Song, 1989).

II.2 ANÁLISIS MOLECULAR DE INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEÍNA

Los enfoques para detectar las proteínas que interactúan incluyen los métodos tradicionales como: co-inmunoprecipitación, unión cruzada (crosslinking) y copurificación a través de gradientes o columnas cromatográficas. (Midgley CA and DP Lane, 1993). Estos métodos bioquímicos tienen la gran desventaja de que las proteínas que interactúan son generalmente observadas solo como bandas de una movilidad relativa particular en un gel de poliacrilamida (Midgley CA and DP Lane, 1993).

Algunos de los sistemas mas actuales son: Inmunoprecipitación, sistema de dos híbridos, descendientes del sistema de dos híbridos, métodos de transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET), espectrometría de masas de proteínas y métodos de desvanecimiento de ondas, sistema de dos señuelos o cebos, métodos de reconstitución, transferencia de energía de resonancia bioluminiscente (BRET), sistemas que emplean la proteína verde fluorescente (GFP), “sets” de unigenes en la forma de productos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para construir microarreglos de DNA (Schena *et al.* 1995), clonas segregadas en vectores de expresión para estudiar la función de proteínas *in-vivo* (Uetz and Hughes, 2000) e *in vitro* utilizando ensayos bioquímicos

(Martzen *et al.* 1999), microarreglos para estudiar funciones de las proteínas. Todo esto con el objeto de conocer mas acerca del funcionamiento colectivo de estos genes y proteínas, en términos de estructura y dinámicas de la célula y organismos a escala global (Midgley CA and DP Lane, 1993).

Estos enfoques tienen sin embargo ciertas limitaciones:

- Las interacciones proteicas son detectadas *in-vitro*, generalmente en filtros de nitrocelulosa. Por ello las interacciones deben ser estables bajo las condiciones del amortiguador que se esta utilizando.
- Muchas proteínas podrían no mantener las propiedades correctas *in-vitro* (conformación, solubilidad, fosforilación, etc.) para este método.
- Las interacciones especificas de moléculas proteicas para formar homo y hetero oligómeros manejan muchos eventos en la biología, desde el ensamblaje de virus la formación de maquinarias proteicas multisubunitarias de gran complejidad.
- Tradicionalmente, el estudio de estas interacciones demanda grandes cantidades de estos componentes purificados, y que los miembros de un complejo hayan sido identificados a través de una extensiva copurificación.

Estas técnicas se encuentran restringidas a el análisis de asociaciones fuertes entre proteínas relativamente abundantes, y no pueden ser utilizadas para estudiar la regulación biológica de complejos de proteínas bajo distintos ambientes celulares (Midgley CA and DP Lane, 1993).

Por ello es que muchas de las técnicas empleadas hasta hoy, producen una serie de resultados sin sentido en donde ocurren interacciones específicas que probablemente nunca se lleven a cabo *in-vivo*.

Mas recientemente, se han desarrollado métodos poderosos que permiten el estudio de eventos donde ocurren interacciones proteína-proteína débiles, aun cuando las proteínas purificadas no están disponibles, cuando se conoce solo una de las dos proteínas interaccionantes y cuando los componentes se presentan solo en cantidades trazas en mezclas del complejo.

III. JUSTIFICACIÓN

Dentro de las bacterias Gram (+) que se consideran importantes para el ambiente, la medicina y la industria, se encuentra a *B. subtilis*. Su fisiología, bioquímica y genética han sido intensamente estudiadas por más de 40 años. *B. subtilis* es una herramienta importante para la producción industrial de amilasas, insulina, anticuerpos, albúmina y proteasas, siendo el mayor interés comercial su capacidad para secretar proteínas en concentraciones de gramo por litro. En este sentido, es de suma importancia estudiar y entender los mecanismos de regulación de la expresión genética, muchos de los cuales continúan sin esclarecerse en este microorganismo. Así se podrán desarrollar cepas más eficientes para la producción de subtilisina y por ende de otras proteínas heterólogas que se pudieran producir en *B. subtilis*, además de aportar información básica

muy importante sobre los sistemas de esporulación y producción en esta bacteria.

Debido a que existen contradicciones en la literatura con respecto al papel que desempeña SinR sobre *aprE*, en este trabajo nos interesa conocer el papel de esta proteína reguladora en la expresión del gene *aprE* (subtilisina) y en los procesos de regulación global, las posibles interacciones de la misma con otros factores y su mecanismo funcional en *B. subtilis*.

IV. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar el papel que desempeña la proteína SinR en la regulación de *aprE* y analizar el mecanismo de función de SinR en *Bacillus subtilis*.

Objetivos específicos:

- 1. Construir mutantes con cambios específicos en las bases nucleotídicas que hacen contacto directo con SinR para analizar su interacción en *aprE*.**
- 2. Construir y analizar mutantes con remociones del promotor de *aprE* removiendo la mitad y el sitio completo de unión para SinR.**

3. Analizar los efectos ocasionados por las mutaciones puntuales y por remoción en la expresión de *aprE*, bajo distintos fondos genéticos.
4. Corroborar la hipótesis de un nuevo sitio de unión de SinR dentro de *aprE* detectado al utilizar alineamientos por computadora y herramientas actuales de bioinformática.
5. Realizar un análisis de la función de SinR sobre *aprE* y a nivel global en *B. subtilis* utilizando el programa Regulon-DB.
6. Determinar y conocer si existe interacción *in-vivo* entre SinR y las proteínas reguladoras que afectan a *aprE* aplicando el sistema de “Dos híbridos bacteriano (DHB) basado en LexA

Integrar los resultados generados para proponer un modelo de regulación a nivel específico y global en *B. subtilis*

CAPITULO 1 CONSTRUCCION DE MUTANTES (POR REMOCIÓN Y PUNTUALES).

V. INTRODUCCIÓN

El gene *aprE* de *Bacillus subtilis* codifica para la proteasa extracelular alcalina conocida como subtilisina, su expresión está regulada por una red compleja de activadores y represores transcripcionales, entre los que se encuentran SinR. Debido a que los resultados con respecto al papel que desempeña SinR sobre *aprE* son contradictorios, y debido a que aun faltan muchos datos para llegar a un modelo de regulación que nos permita descifrar este sistema de expresión de genes para la producción de proteínas heterólogas, en este trabajo se construyeron cepas de *B. subtilis* con mutaciones puntuales en el sitio de unión de esta proteína, en la región reguladora del gene *aprE*. Asimismo se estudiaron los efectos causados por las mutaciones, a partir de una cinética de crecimiento tanto de *E. coli* como de *B. subtilis*, para analizar las construcciones en presencia de los reguladores transcripcionales de *B. subtilis* y en *E. coli*. Posteriormente se realizó la secuenciación de 10 clonas seleccionadas por su Actividad específica (A_E) expresada, para tratar entender mejor la función global y los procesos de reconocimiento y pegado de SinR.

Gaur *et al.* 1991, muestra una secuencia de DNA del promotor de *aprE* de ~46 pb, en esta secuencia se muestran las guaninas que presentaron protección en

un experimento de metilación con DMS. En nuestro trabajo nos basamos en esas guaninas para diseñar y construir las mutantes SinD2A y SinD3A (Fig. 5).

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

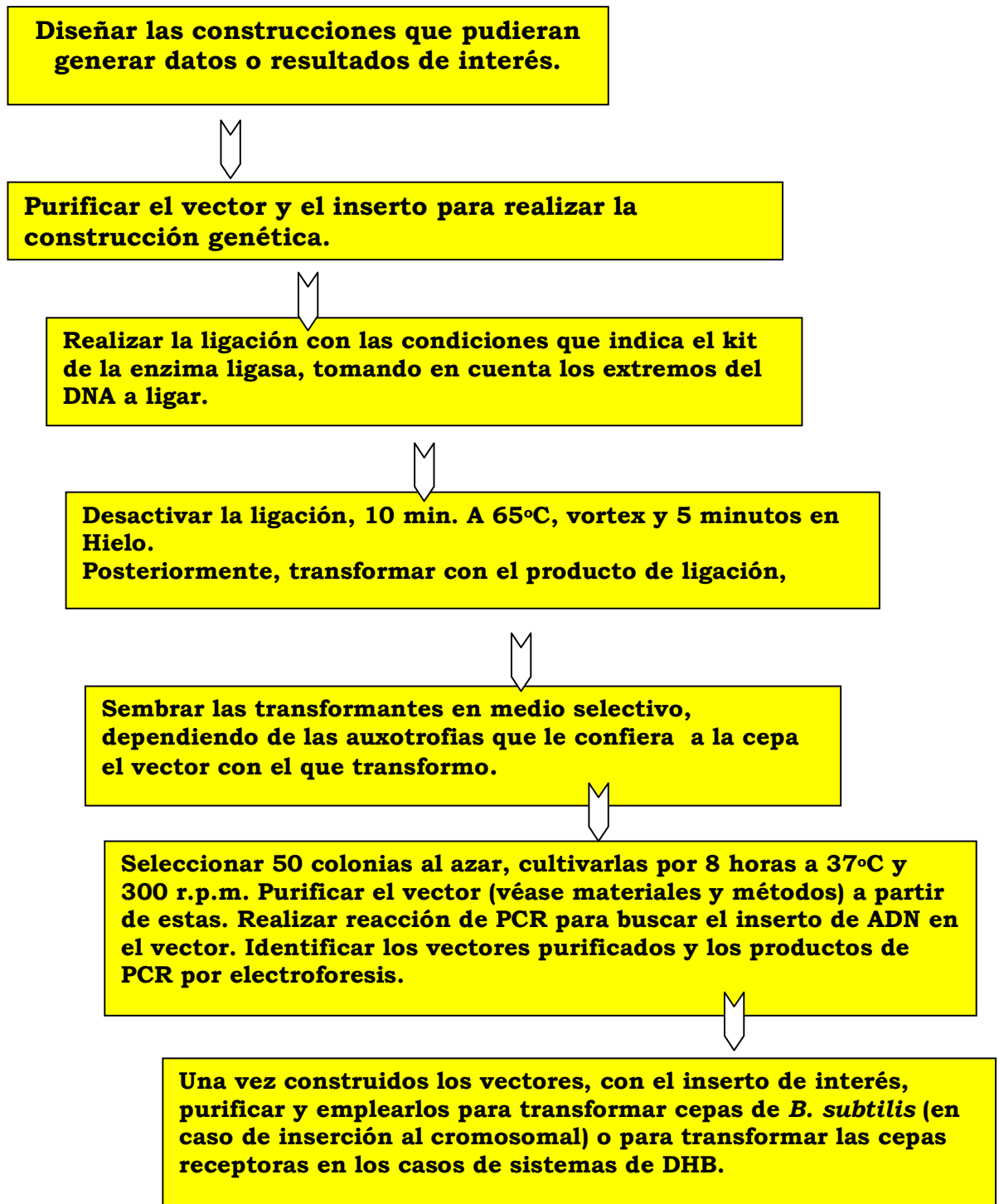
VI.1 CEPAS, PLÁSMIDOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Se utilizó la cepa BB80 de *B. subtilis* y la cepa DH5 α de *E. coli* las cuales forman parte del cepario del laboratorio de Microbiología Molecular, área de Biotecnología Marina, (CICESE) Tabla I. Se utilizó el plásmido pSG35.1 (Fig. 4). Se utilizó medio de cultivo Luria Bertani (LB) (Sambrook *et al.* 1989) y medio de esporulación Schaeffer (Schaeffer *et al.* 1965).

Tabla I. **Cepas utilizadas.**

Cepa	Descripción	fuentes
<i>B. subtilis</i> BB80	Δnpr hisA glyB	Ferrari
sinR -	BB80 sinR:: Pm	Este trabajo
sinR +++	BB80 (pIS74)	Este trabajo
sinI -	BB80 sinI::Cm	Este trabajo
aprE244	BB80 ΔaprE::lacZ Cm	Este trabajo
aprE204	BB80 ΔaprE::lacZ Cm	Olmos

VI.2 DIAGRAMA DE FLUJO PARA LA CONSTRUCCIÓN Y SELECCIÓN DE MUTANTES.



VI.3 TÉCNICAS

NOTA: TODAS LAS TÉCNICAS DETALLADAS SE ENCUENTRAN EN ANEXO FINAL.

VI.3.1 CLONACIÓN

La clonación en fase de los productos de los PCRs se realizó según el procedimiento tomado de Ausubel *et al.* (1992).

VI.3.2 PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO

La purificación de DNA plasmídico se realizó como se describe en Ausubel *et al.* (1992).

VI.3.3 MÉTODO DE TRANSFORMACIÓN PARA *BACILLUS*

La transformación de cepas de *B. subtilis* se realizó de acuerdo al procedimiento descrito en Cutting *et al.* (1990).

VI.3.4 ACTIVIDAD ESPECÍFICA DE β -GALACTOSIDASA (MÉTODO DE MILLER)

La determinación de la actividad específica de β -galactosidasa se realizó tomando muestras de T₋₂ a T₄ y basándonos en el método descrito en Ferrari *et al.* (1986).

VI.3.5 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY

La determinación de proteínas se realizó como se describe en Lowry, *et al.* (1951).

VI.3.6 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE ESPORULACIÓN SCHAEFFER

El medio de esporulación Schaeffer se preparó como se describe en Schaeffer, *et al.* (1965).

VI.3.7 OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS.

Tabla II. Oligos utilizados. Lo símbolos significan: # Para amplificar la región reguladora de *aprE*; * Contiene mutación en las dos primeras guaninas reconocidas por SinR; \$ Contiene mutación en las tercera y cuarta guaninas reconocidas por SinR.

Nombre	Secuencia	Tm	pb	funcion
<i>EcoRI</i> 500	GGAATTCCTCCATTTTCTTCTG	58	23	Secuencia <i>aprE</i> #
subfus1	CGG GAT CCC GTT AAC GCA AAC AAC AAG	58	27	Secuencia <i>aprE</i> #
SinD2A	CATTGTT ⁴ TCA ⁴ GGAAGCA C	58	20	Degenerado *
SinD3A	CGGAAG ⁴ ACA ⁴ GCAGGTC	58	18	Degenerado \$

VI.4 MUTAGÉNESIS PUNTUAL POR PCR.

Se emplearon los oligonucleótidos (oligos) *EcoRI*500 y subfus1 para amplificar la región reguladora del gene *aprE* utilizando el plásmido pSG35.1 como DNA molde dando un fragmento de 600 pb (Fig. 4). A partir del producto de dicho PCR, se utilizaron los oligos SinD2A y SinD3A para mutar por medio de la amplificación por PCR las citocinas del supuesto contacto de *aprE* con SinR. Una vez amplificados las regiones de interés, fueron purificadas por la técnica de fenol-CHCl₃ (anexo # 9), digeridas (anexo # 3) y fueron ligadas (anexo # 4)

al plásmido pSG35.1 en su sitio múltiple de clonación. Posterior a la ligación, se transformo *E. coli* DH5 α (véase anexo). Se realizaron cinéticas de crecimiento en medio Shaeffer, tomando muestras cada hora durante 9 horas para determinar proteínas totales por el método de Lowry y A_E de β -galactosidasa.

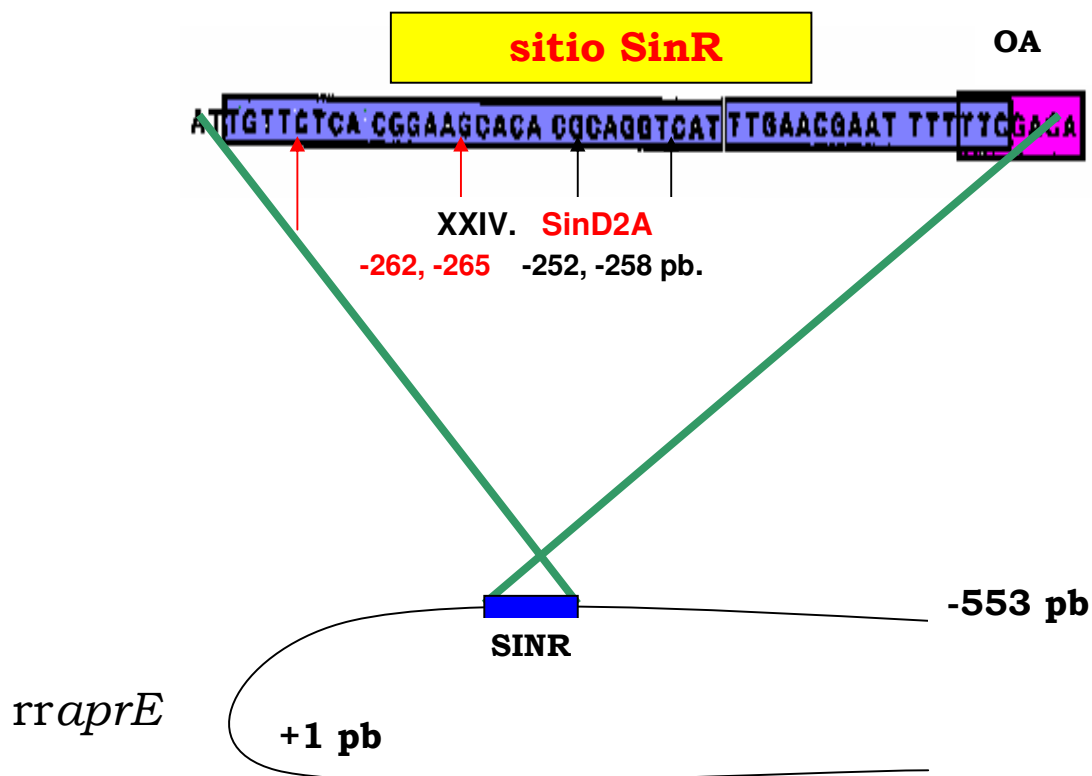


Figura 3. Esquema donde se señala a las guanineas sustituidas por medio de Mutagénesis puntual utilizando oligos y la técnica de PCR. Se observa el sitio de unión de SinR en la región de regulación del gene *aprE* y los sitios de las mutaciones puntuales.

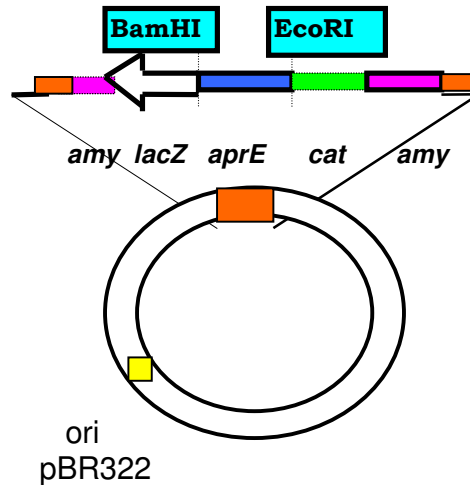
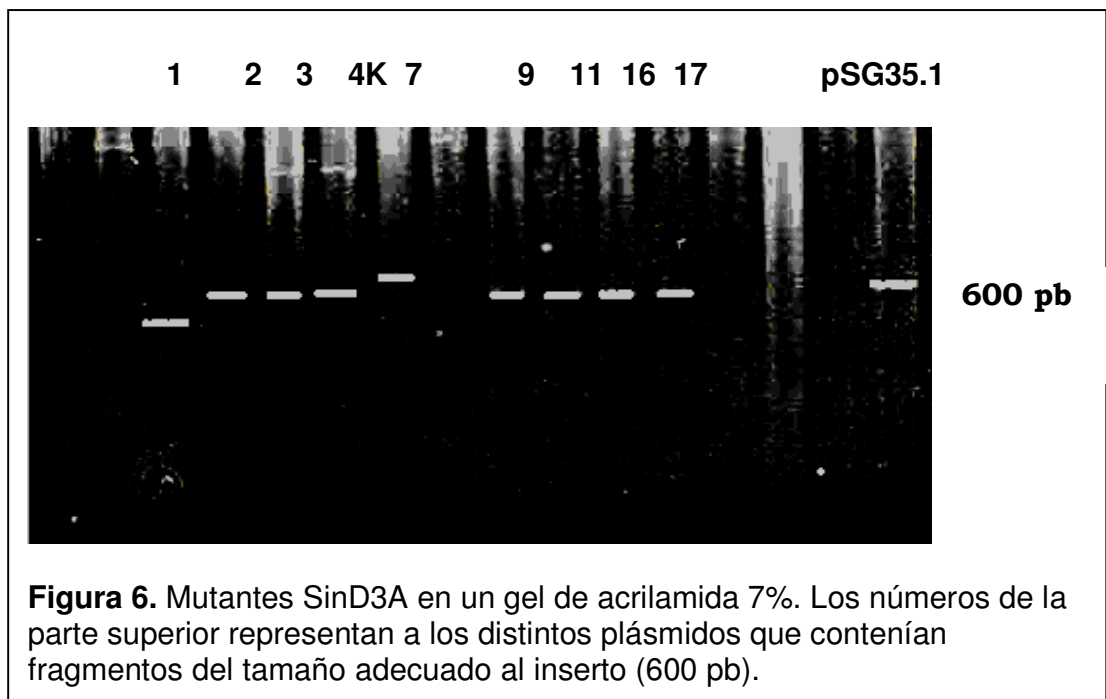
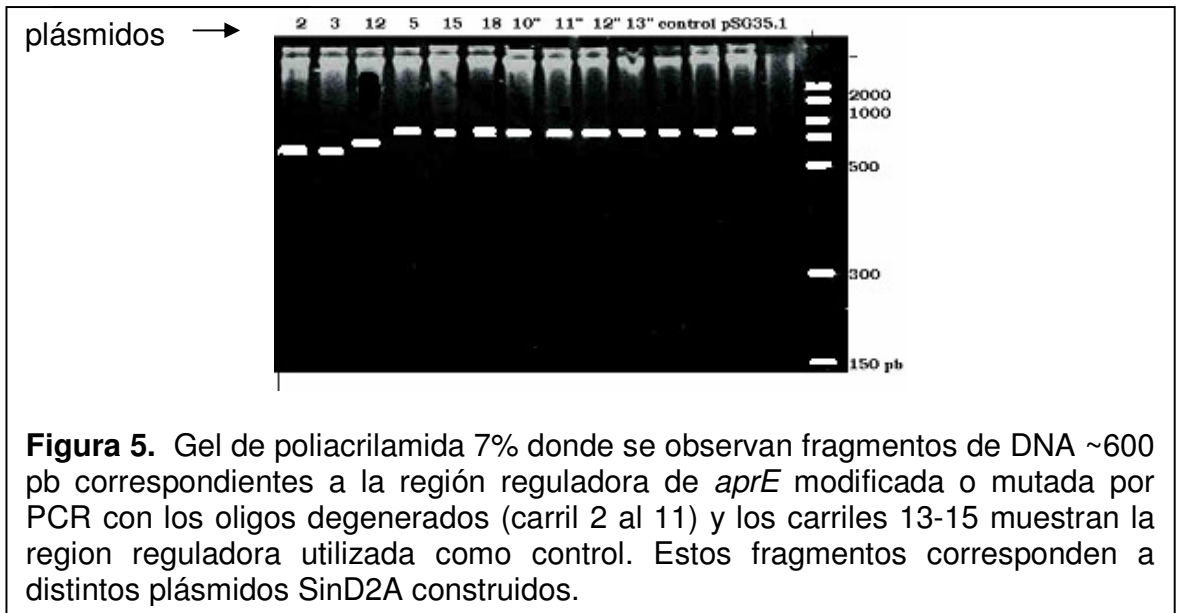


Figura 4. Plásmido pSG35.1 de 11.0 Kb. El rectángulo azul representa la región reguladora de *aprE* de la base -553 a la base +110 pb. Los rectángulos de los extremos muestran los sitios de *amy* (amilasa) y la flecha gruesa representa el gene estructural *lacZ*.

VII. Resultados

Una vez realizados las mutaciones puntuales y por remoción, y de haber ligado y transformado cepas de *E. coli*, se purificó DNA plasmídico y por medio de digestión con las enzimas *EcoRI* y *BamHI* se procedió a comprobar que los plásmidos purificados efectivamente contaban con un inserto del tamaño de interés (Fig. 5-7). Posteriormente los plásmidos con el fragmento de tamaño adecuado fueron utilizados para transformar *B. subtilis*.





VII.1 ANÁLISIS DE LAS MUTANTES SIND2A.

En la tabla III y IV enlistamos las mutantes SinD2A con su respectiva A_E de β -galactosidasa. En *E. coli*, las cepas que presentan similar expresión que la cepa control se dice que: no presentan alteración de la estructura del ADN. Las cepas que presentan menor, o 0 de A_E se dice que: presentan posible alteración de la estructura del ADN, ya que en *E. coli* no se encuentran presentes las proteínas reguladoras de *aprE* que podrían ser causantes de tal efecto. Otro planteamiento es que las mutantes cuya expresión sea igual al control en *E. coli* (~3,500 U.M.), pero en *B. subtilis*, modifican su expresión, entonces, significa

que la causa puede ser las proteínas reguladoras que se unen en ese sitio modificado. En todos estos casos sugerimos que la causa de disminución de la expresión se debe a que las proteínas reguladoras de unión a este sitio, dejaron de unirse o se unieron con menos fuerza.

Tabla III. Cepas que presentaron una posible alteración de estructura (E) del ADN y cepas en las que se altero la secuencia (S) mas no se altero la estructura del ADN. ↓ = representa disminución de la expresión de A_E; =0 representa represión total de la expresión.

Analizadas en:	Cepa	Alteración	Analizadas en:	Cepa	Alteración
<i>E. coli</i> DH5α	2 ↓	E	<i>B. subtilis</i> BB80	2 =0	E, S
	3 ↓	E		3 =0	E, S
	5 =0	E		5 =0	E, S
	12 =0	E		12=0	E, S
	10''	S		10'' ↓	S
	11''	S		11'' ↓	S
	12''	S		12'' ↓	S
	13''	S		13'' ↓	S
	15	S		15 ↓	S
18	S	18 ↓	S		

Tabla IV. Mutantes SinD2A y su A_E en Unidades Miller.

Clona	Color en <i>E. coli</i>	A _E en Unidades Miller. Estadío T ₂	Color en <i>B. subtilis</i>	A _E en Unidades Miller. Estadío T ₂	Alteración Estructura (E) O Secuencia (S)
2	Azul	2577.7	Blanca	0	E,S
3	Azul	1093.2	Blanca	0	E,S
5	Blanca	0	Blanca	0	E
10''	Azul	3487.3	Azul	450.6	S
11''	Azul	3527.8	Azul	489.0	S
12''	Azul	3847.3	Azul	399.6	S
12	Blanca	0	Blanca	0	E
13	Azul	3501.4	Azul	465.7	S
15	Azul	3372.1	Azul	399.2	S
18	Azul	3431.3	Azul	698.3	S
PSG35.1	Azul	3301.6	Azul	3990.7	Control

MUTANTES SIND3A.

En la tabla V y VI enlistamos las mutantes SinD3A con su respectiva A_E de β -galactosidasa. En *E. coli*, las cepas que presentan similar expresión que la cepa control se dice que: no presentan alteración de la estructura del ADN. Las cepas que presentan menor, o 0 de A_E se dice que: presentan posible alteración de la estructura del ADN, ya que en *E. coli* no se encuentran presentes las proteínas reguladoras de *aprE* que podrían ser causantes de tal efecto. Otro planteamiento es que las mutantes cuya expresión sea igual al control en *E. coli* (~3,500 U.M.), pero en *B. subtilis*, modifican su expresión, entonces, significa que la causa puede ser las proteínas reguladoras que se unen en ese sitio modificado.

Tabla V. Cepas SinD3A con alteraciones de Estructura (E) y/o Secuencia (S).
↓ = representa disminución de la expresión de β -galactosidasa. =0 representa represión total de la expresión.

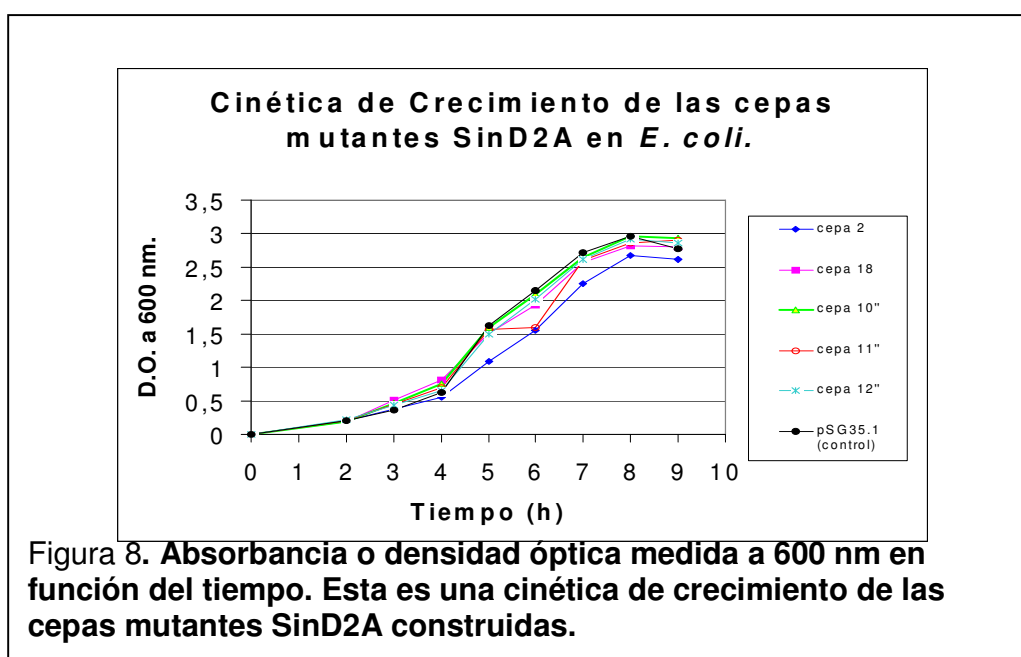
Analizadas en:	Cepa	Alteración	Analizadas en:	cepa	Alteración
<i>E. coli</i> DH5 α	2	S	<i>B. subtilis</i> BB80	2	S
	3	S		3	S
	17	S		17	S
	4K ↓	E			
	7K =0	E			
	7 =0	E			
	11 =0	E			
	9 =0	E			
	16 ↓	E			

Las cinéticas de crecimiento (Fig. 8-13) presentaron comportamientos similares entre las distintas cepas. Las proteínas totales determinadas por el método de Lowry, también presentan datos de expresión similar tanto

en *E. coli* como en *B. subtilis* (Fig. 8-13). En la A_E graficada podemos observar las distintas expresiones de *aprE* provocadas por las construcciones genéticas realizadas.

Clona	Color en <i>E. coli</i>	A_E en Unidades Miller. Estadío T ₂	Color en <i>B. subtilis</i>	A_E en Unidades Miller. Estadío T ₂	Alteración Estructura (E) O Secuencia (S)
2	Azul	3,500	Azul	500	S
3	Azul	3,500	Azul	1,500	S
4	Blanca	0	-	-	E
5	Blanca	0	-	-	E
4K	azul	250	blanca	0	E,S
7K	Blanca	0	blanca	0	E
7	Blanca	0	-	-	E
9	blanca	0	blanca	0	E
17	Azul	3,500	azul	500	S
11	Blanca	0	blanca	0	E
16	Azul	1,000	blanca	0	E,S
PSG35.1	Azul	3,500	azul	2,500	CONTROL

Tabla VI. Cepas Mutantes SinD3A y A_E en U.M.



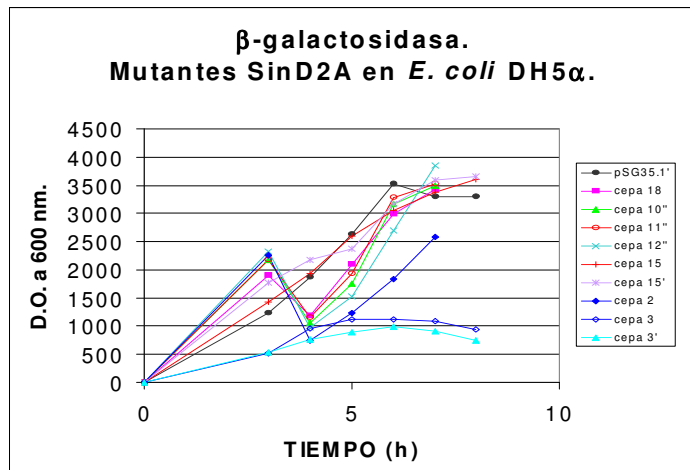


Figura 9. Actividad específica que presentaron las cepas SinD2A de *E. coli* en función del tiempo.

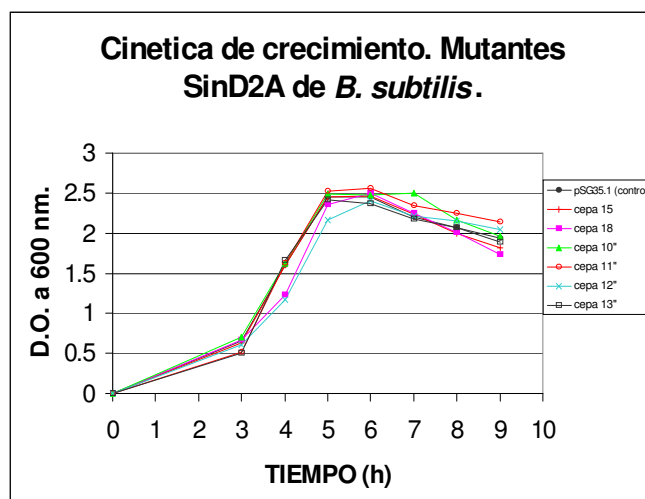
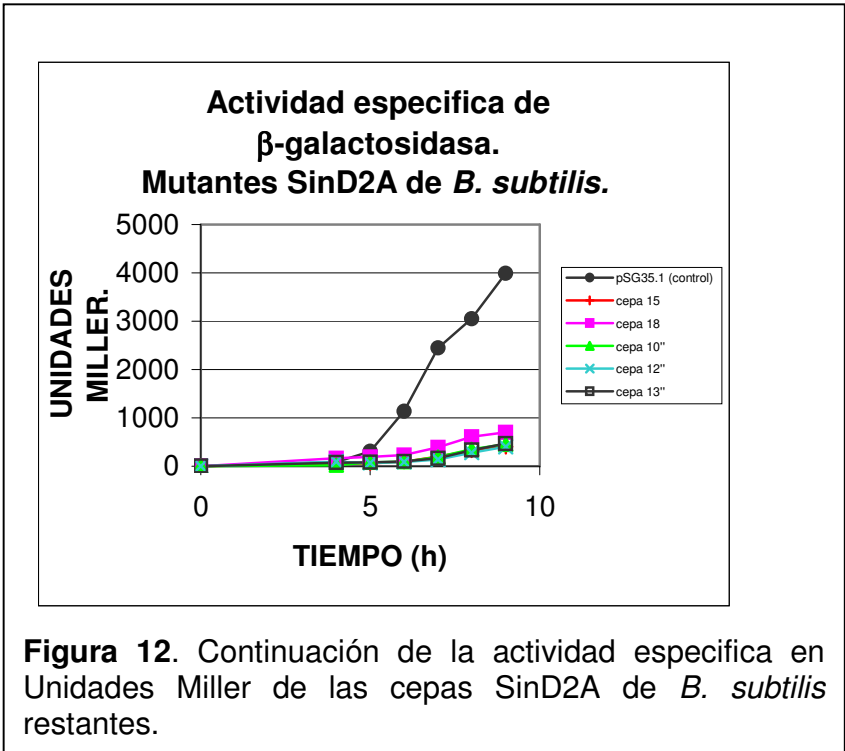
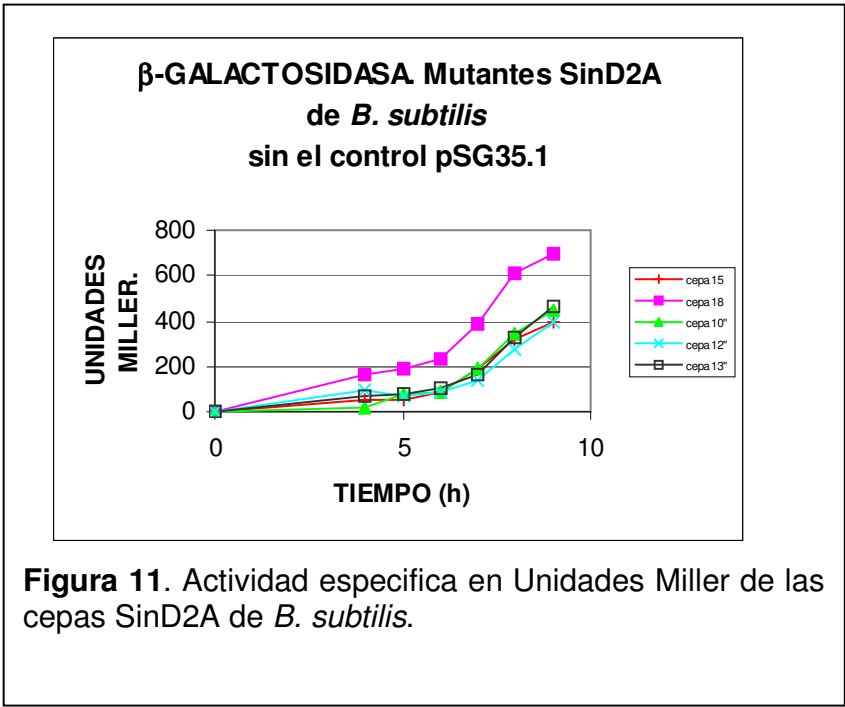
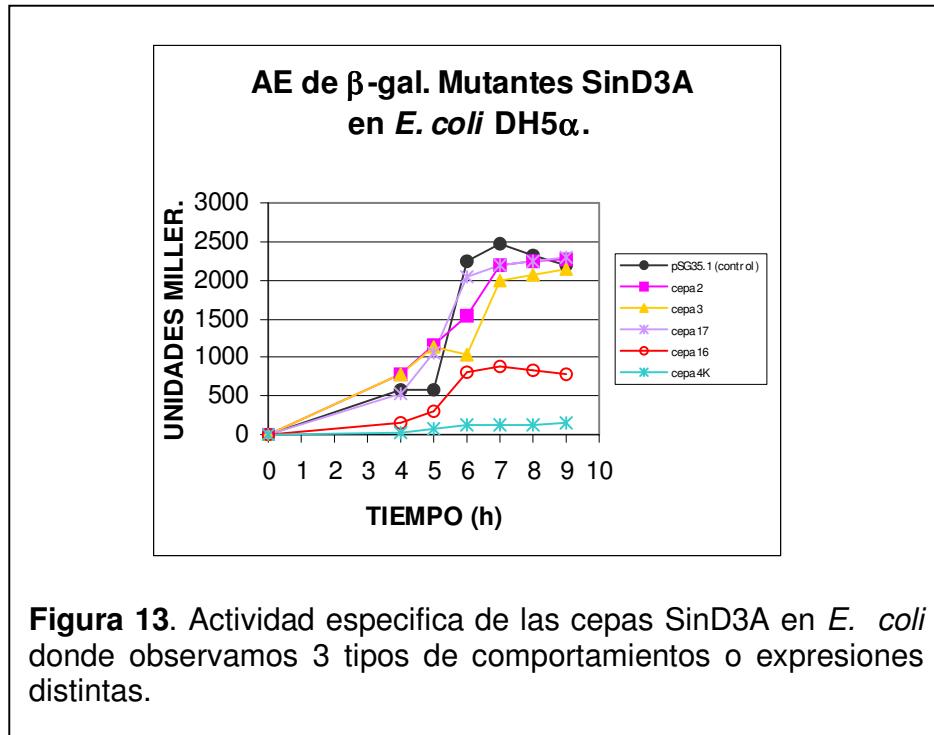


Figura 10. Cinética de crecimiento de las cepas SinD2A en *B. subtilis*, las condiciones estándar de cultivo fueron (300 rpm, 37°C en medio Shaeffer).





VII.3 Mutantes seleccionadas para ser secuenciadas, debido a sus alteraciones en la expresión de β -galactosidasa.

En la tabla (Tabla VII) se muestran las mutantes SinD2A y SinD3A que seleccionamos para ser secuenciadas. La elección de estas 10 cepas fue basada en la determinación de A_E de β -galactosidasa, seleccionando así las cepas que según nuestro criterio tenían actividad mayor o menor comparadas con la cepa control. Los plásmidos construidos tienen un tamaño de 11 Kb y las 10 clonas presentaron un fragmento de DNA de ~600 pb correspondientes a la

región reguladora de *aprE* (*rraprE*) al realizar una reacción de PCR con los oligos Eco500 y subfus1.

Tabla VII. **Mutantes seleccionadas para secuenciar y análisis posteriores.**

Clona	Característica y motivo para secuenciar
SinD2A.	
5	Posible alteración de estructura y pegado de proteínas.
15	pegado de proteínas.
18	pegado de proteínas.
10	pegado de proteínas.
11	pegado de proteínas.
SinD3A	
2	pegado de proteínas.
3	pegado de proteínas.
4K	Alteración de estructura y de pegado de proteínas.
16	Alteración de estructura y de pegado de proteínas.
17	pegado de proteínas.

VII.3.1 PURIFICACIÓN DE LAS CEPAS SELECCIONADAS PARA SER SECUENCIADAS.

La técnica de secuenciación por el método de Sanger (dideoxi), utilizando el kit de la termosecuensasa de Amersham (cat. .No. 908500), fue estandarizado en el laboratorio, pero para fines prácticos los 10 plásmidos construidos seleccionadas en base a su actividad fueron secuenciadas en San Diego State University, Microchemical Core Facility (www.sci.sdsu.edu/dnacore/sdsu_dnacore.html) (anexos # 13). Las clonas

o el DNA que se envía para secuenciar tiene que estar a una concentración de 0.1 $\mu\text{gr}/\mu\text{l}$ en un volumen mínimo de 10 μl y debe ser una muestra pura, libre de sales (relación $\lambda_{230}/\lambda_{260} = 0.3-0.6$) y libre de proteínas y/o fenol/ CHCl_3 (relación $\lambda_{280}/\lambda_{260} = 1.65-2.0$); por lo que purificamos las clonas por un proceso donde utilizamos 3 técnicas en el siguiente orden: Primero utilizamos la técnica de fenol-cloroformo (anexo # 9), posteriormente se filtraron por un centrifugador "millipore" YM-100 (P.M. 100,000) (anexo # 1). Y debido a que las clonas presentaban lecturas altas en la relación $\lambda_{280}/\lambda_{260} = 1.65-2.0$, que indica presencia de proteínas, o contaminación con fenol o cloroformo, se construyeron unas columnas de cromatografía de exclusión utilizando jeringas de insulina, empacadas con resina Sephadex 50 activada con agua (anexo # 1). Al filtrar las clonas resuspendidas en agua estéril por estas columnas, utilizamos un volumen de desplazamiento de 700 μl . Agregando 4 veces este volumen, recolectamos 4 muestras etiquetándolas como: muestra 1, 2, 3 y 4 (Tabla VIII).

Tabla VIII. Análisis de pureza del DNA de las cepas de interés.

Clona	relación $\lambda_{280}/\lambda_{260}$ (V.N.= 1.65-2.0)			
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
5	3.09	2.23	1.7	1.07
10	2.23	1.97	1.8	1.09
11	2.19	2.04	1.7	1.26
15	3.0	2.0	1.9	0.6

18	3.0	2.0	1.7	0.5
2	2.6	1.9	1.8	0.6
3	2.9	2.0	1.9	0.2
4K	2.7	2.29	1.8	1.14
16	3.3	2.36	1.66	1.16
17	2.2	1.9	1.9	0.1

Nota: Todas las clonas filtradas por columnas con Sephadex 50, se obtuvieron libres de sales, con valores de 0.4 a 0.6 al calcular la relación $\lambda_{230}/\lambda_{260}$ (V.N. = 0.3-0.6).

VII.4 Análisis de las secuencias obtenidas.

En la figura 14 se muestran las secuencias nucleotídicas obtenidas después del proceso de Mutagénesis, las cuales están siendo comparadas con la secuencia original de la región donde se une SinR en *aprE* y también se muestra la actividad que presentó cada mutante.

SECUENCIAS	cepas	A_E (U.M.)	
		E.c.	
B.s.			
TATCCATTGTTCTCACGGAAGCACACG-CAGGTGCATTTGAACGAATTTTTTCGACAGGAATT 500	2	3,500	
TATCCATTGTTCTCACGGAAGCACACG-CAGGT-CATTTGAACGAATTTTTTCGACAGGAATT 1,500	3	3,500	
TATCCATTGTTCTCACGGA-AGCACACGCAGGTTATTTGAACGAATTTTTTCGACAGGAAT-T 0	4K	250	
TATCCATTGTTCTCACGGAAGCACACGCAGGTCATTTGAACGAATTTTTTCGACAGGAAT-T	5	0	0
TATCCATTGTTCTCACGGA-AGCACACGCAGGTCATTTGAACGAATTTTTTCGACAGGAAT-T	10	3,400	450
TATCCATTGTTCTCACGGA-AGCACACGCAGGTCATTTGAACGAATTTTTTCGACAGGAAT-T	11	3,500	489
TATCCATTGTTCTCACGGAAGCACACGCGAGGT-CATTTGAACGAATTTTTTCGACAGGAATT 400	15	3,300	
TATCCATTGTTCTCACGGA-AGCACACGCAGGTCATTTGAACGAATTTTTTCGACAGGAAT A	16	1000	0
TATCCATTGTTCTCACGGAAGCACACG-CAGGT-CATTTGAACGAATTTTTTCGACAGGAATT	17	3,500	500
TATCCATTGTTCTCACGGAAGCACACG-CAGG CT CATTTGAACGA GNGG TTTC N ACAGGAATT 700	18	3,400	

TATCCATTGTTCTCACGGAAAGCACACGCAGGTCATTTGAACGAATTTTTTCGACAGGAATTT *aprE* wt 3,300
3,900

- Bases agregadas o deletadas.
- Bases protegidas en Gaur 1991.
- Citosina que queríamos sustituir o modificar.
- Región reguladora de *aprE* donde se une SinR

Figura 14. Secuencias resultantes del proceso de Mutagénesis del sitio de unión de SinR en *aprE*.

VII.5 RELACIÓN DE LAS SECUENCIAS CON SU ACTIVIDAD QUE PRESENTARON

Construcción de la cepa 2.-

La cepa 2, presenta la inserción de una G en la región que hace contacto con la parte central de SinR, según los resultados esto provoca una disminución de la expresión en *B. subtilis* hasta 500 U.M., de lo que se puede concluir que este cambio altera la distancia de reconocimiento entre las bases importantes para el pegado de SinR y no así la estructura.

Construcción de la cepa 3.-

La cepa 3 no presentó alteración de las citosinas que hacen contacto con SinR, pero hay mutaciones en la región –377 a –360 (sitio hipotético de Hpr u otro factor), a diferencia de la cepa 2, aquí se presentan 1,500 U.M. de expresión lo que puede ser debido a que el sitio donde se une

la RNA polimerasa quedo intacto, es decir, si hubo trascripción pero no estabilización del complejo (doblez) del DNA.

Construcción de la cepa 4K.-

Donde hace contacto *aprE* con la parte central de SinR, se insertó una T en el lugar de una C, esta citosina parece ser clave para la unión estable de SinR, y/o para mantener una estructura estable debido a que la actividad de ambas cepas fue nula o casi nula.

Construcción de la cepa 5.-

En la cepa 5 se insertaron una C recorriendo una de las guaninas centrales que señala Gaur *et al.* 1991, como sitio de contacto con SinR y se inserto también una G en el lugar de una citosina de supuesto contacto. Ambas mutaciones puntuales parecen ser determinantes para la expresión de *aprE* en cuanto a estructura y pegado de una proteína.

Construcción de la cepa 10.-

La cepa 10 mantuvo su actividad en *E. coli*, pero en *B. subtilis* bajo a 450 U.M., posiblemente debido a la inserción de una T en la base -277 y otra en la posición -272. Además de sufrir una serie de cambios en las posiciones de -50 a -100, afectando el promotor y la formación del

doblez, para un complejo transcripcional necesario para una adecuada expresión de *aprE*.

Construcción de la cepa 11.-

El caso de la cepa 11 es similar a lo ocurrido en la cepa 10, con la excepción de que los cambios en la región -50 son distintos.

Construcción de la cepa 15.-

El caso de la cepa 15, es muy similar a la cepa 2.

Construcción de la cepa 16.-

Aparecieron 2 inserciones de 6 bases CACTCC (~-357 pb) y ATAAAA (~-337), estos son los sitios hipotéticos entre SinR y Hpr2 y a la vez uno de los puntos críticos del doblez de la *rraprE*, por lo que se ven afectados la estructura en *E. coli* (1000 U.M.) y la formación del complejo transcripcional en *B. subtilis* (0 U.M.).

Construcción de la cepa 17.-

La cepa 17 mantuvo su A_E en *E. coli*, pero en *B. subtilis* disminuyó la expresión a 1/5, por lo que sugerimos que es debido a mutaciones en la región "TATA Box" que impide una transcripción adecuada. Otra

alteración son las mutaciones en las bases –377 y –357 donde se sustituyen AT por C, le confieren mayor rigidez a la estructura del DNA.

Construcción cepa 18.-

Similar a la cepa 2 y 15. También en la posición –215 se sustituyeron 4 guaninas.

VIII. CONCLUSIÓN DE LAS MUTANTES CONSTRUIDAS.

En todos los casos donde se modificaron los nucleótidos que se suponía hacían contacto directo con SinR disminuyó considerablemente la expresión de *aprE* en ambas bacterias (cepas 4K y 5). Este efecto fue mas drástico en los casos donde los nucleótidos modificados correspondían con la parte central de SinR. Sin embargo, en las mutantes donde se insertaron bases dentro del sitio de unión, la estructura no se alteró ya que en *E. coli* se expresó la misma actividad en estas mutantes, sin embargo en *B. subtilis* al parecer se afectó la distancia entre las bases importantes de pegado alterándose así la unión y por ende la expresión de *aprE* solo en *B. subtilis*. En cambio las cepas con un valor de A_E de β -galactosidasa menor que la cepa control (pSG35.1) en *E. coli* sugerimos que la variación es causada por modificaciones de la estructura del DNA. En la literatura referente al tema nunca antes se han reportado comparaciones de expresión de β -galactosida de *E. coli* con *B. subtilis*, para tratar de deducir un

cambio de estructura o de alteración en el sitio de unión en la región de regulación de *aprE*. Los únicos datos de determinación de β -galactosidasa utilizando una fusión *aprE-lacZ* son los de Gaur *et al.* 1991, donde realiza cortes en la región de regulación de *aprE* (*rraprE*). Su cepa con remoción hasta -600 pb presenta 2000 Unidades Miller (U.M.) y la cepa con remoción hasta -52 presenta 1500 U.M., analizando solo a *B. subtilis*. En estos casos existe una disminución de la expresión que podría deberse a que dicho corte elimina el sitio de pegado de algún complejo activador o referente a la estabilidad del complejo transcripcional de *aprE*. Al aplicar SinR multicopia (*sinR+++*) ambas mutantes presentan una disminución hasta 200 U.M y 1000 U.M. respectivamente. Aunque el efecto de disminución mas marcado se presenta cuando esta presente la mayor parte de la *rraprE* (-600 pb), la supuesta represión que ejerce SinR en este caso puede deberse a que la cantidad de SinR presente bajo estas condiciones es excesiva, lo que no ocurriría en condiciones fisiológicas normales. En los datos de Olmos *et al.* 1998, se muestra una cepa con remoción hasta -600 pb de la misma *rraprE* que expresa 2000 U.M., al igual que Gaur *et al.* 1991, ahora en la cepa con remoción -204 presentada por Olmos *et al.* 1997, hay una disminución de la expresión hasta 1000 U.M. El mismo autor presenta una cepa con mutación nula de SinR que expresa 1000 U.M., lo que comprueba la participación de SinR en este complejo activador.

CAPITULO 2. EFECTOS DE LA ALTERACIÓN DEL SITIO DE UNION DE HPR EN *aprE*.

IX. Introducción

En *Bacillus subtilis* el gen *aprE* codifica para la proteasa extracelular subtilisina. La expresión de *aprE* es controlada por varios reguladores; entre los mas importantes están SinR (Gaur *et al.* 1991; Mandic-Mulec *et al.* 1992; Bai *et al.* 1992) y Hpr (también conocida como ScoC) (Kallio *et al.* 1991)

El gene *hpr* codifica para la proteína Hpr de 23.7 KDa, la cual es un regulador negativo de las proteasas alcalina (*aprE*) y neutra (*nprE*) (Perego y Hoch, 1988).

La unión de Hpr a la región de regulación de *aprE* ha sido demostrada *in-vitro* por geles de retardamiento y/o análisis de “footprinting” (Strauch *et al.* 1989, Gaur *et al.* 1991; Kallio *et al.* 1991). Al realizar análisis con DNAsal se identificaron 4 sitios de unión en la región reguladora de *aprE*, mientras que en *nprE* tiene solo dos sitios. En experimentos de “footprinting” *in-vitro*, la proteína Hpr se une a *aprE* de la base -290 a la base -265 (Gaur *et al.* 1991; Strauch y Hoch, 1992a) adyacente a la región donde se une SinR (Kallio *et al.* 1991). En experimentos de competencia con mezclas de ambas proteínas se ha determinado que la unión de Hpr y SinR ocurre independientemente una de otra (Strauch y Hoch, 1995).

En un trabajo previo fue construida la mutante -244 por la estrategia de remoción y se analizó bajo distintos fondos genéticos (*hpr*, *sinR*, *hpr/sinR*), (Sánchez *et al.* 1999) al igual que la mutante -204 (Olmos *et al.* 1996). En este capítulo realizamos mutaciones en la región reguladora de *aprE* en los sitios donde supuestamente se une Hpr (sitios 3 y 4) para obtener más datos acerca de cómo esta proteína regula a *aprE*.

X Materiales y métodos

X.1 Determinación de la A_E de β-Galactosidasa

Con el fin de determinar los efectos de la mutación -204 y -244 por sí sola sobre *aprE* y en ausencia de distintos reguladores de *Bacillus*, se realizaron transformaciones utilizando la cepa DH5α de *E. coli* con los plásmidos pSG35.1, paprE204 y paprE244 (Olmos *et al.* 1996; Sánchez *et al.* 1999) y se determinó la A_E de β-galactosidasa (Anexo # 2).

X.2 Construcción de Cepas Mutantes de *B. subtilis*

Se transformaron cepas de *B. subtilis* con los vectores pSG35.1, paprE204 y paprE244, bajo diferentes fondos genéticos, para integrar la fusión transcripcional al cromosoma en el locus de *amy* y se determinó la A_E de β-galactosidasa de las mutantes construidas.

X.3 Construcción de mutantes por inserción de 5, 10, 15 y 20 pb.

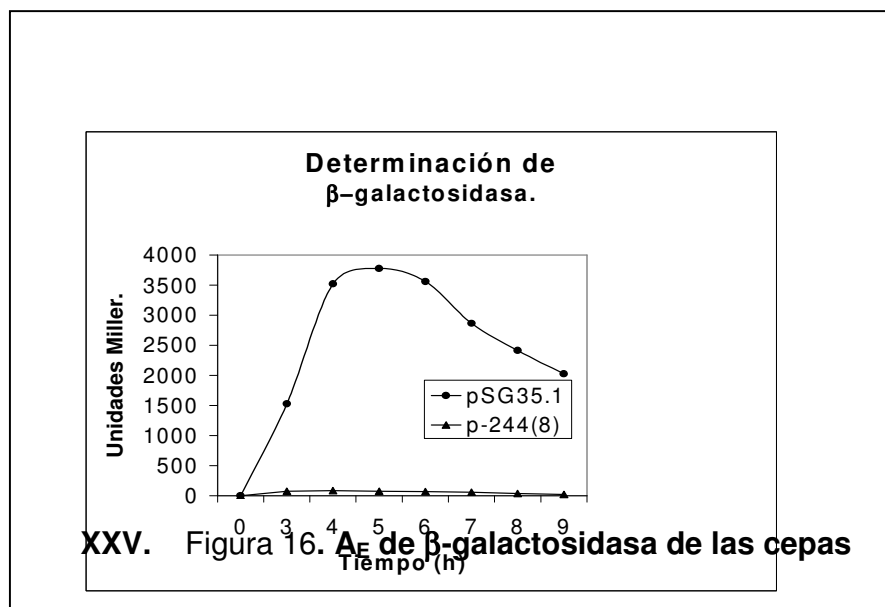
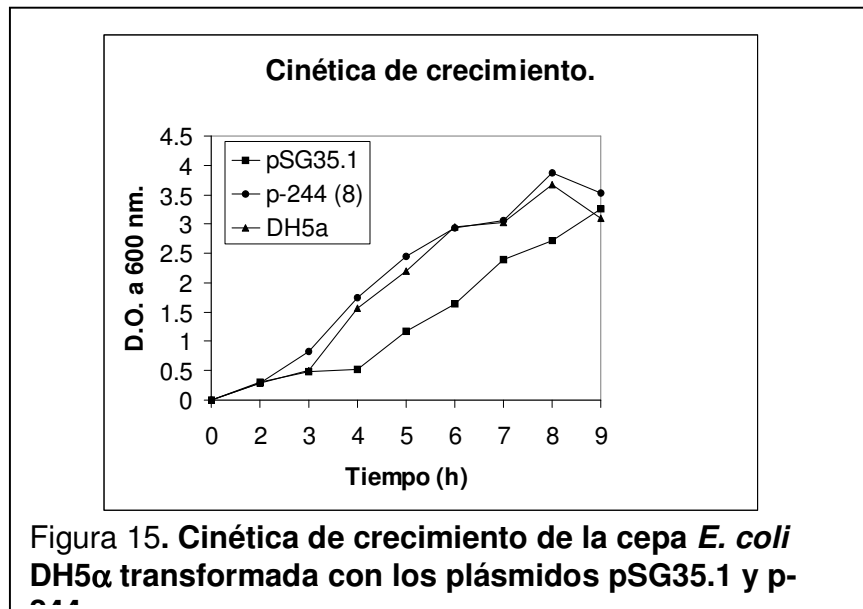
Se adquirieron 4 plásmidos pSG35.1 que contenían 5, 10, 15 o 20 pb insertadas en la región reguladora de *aprE*, específicamente entre los sitios Hpr3 y Hpr4, nombrados pPLK5, pPLK10, pPLK15 y pPLK20. Con estos plásmidos se transformo la cepa BB80 de *B. subtilis* para construir las cepas PLK5, PLK10, PLK15 y PLK20 respectivamente con el objetivo de observar el efecto de la inserción de nucleótidos en el promotor de *aprE*.

XI. Resultados.

XI.1 Determinación de A_E de β -galactosidasa

Al tratar de explicar los resultados obtenidos al realizar cinéticas de crecimiento y A_E de β -galactosidasa en las mutantes construidas (Fig. 15 y 16), se sugiere que el menor crecimiento en la cepa de *E. coli* transformada con el plásmido pSG35.1, que contiene insertada la región reguladora de *aprE* completa, es debido a que este promotor si es funcional en *E. coli*, convirtiéndose la expresión de β -galactosidasa en una carga energética considerable lo que provoca un lento crecimiento bajo estas condiciones. Por otra parte la remoción -244 no presentó A_E de β -galactosidasa, lo que sugiere que este promotor no es funcional, posiblemente esta remoción no permite que se forme un complejo transcripcional estable y por lo tanto que no exista tal actividad del promotor de *aprE* en la mutante -244. De esta manera se podría explicar

también una mayor velocidad de crecimiento para esta cepa. Estos resultados dejan claro que al menos en *E. coli* es necesario que se encuentre la región reguladora completa, para poder transcribir adecuadamente, aún y cuando las proteínas reguladoras no existan, solo la polimerasa y el factor sigma homólogos.



XI.2 Construcción de cepas mutantes de *B. subtilis* (cepa -204)

La mutante -204 fue reportada en el trabajo de (Olmos *et al.* 1996). En esta cepa se removió la secuencia reguladora de *aprE* de la base -204 en adelante, con respecto al punto de inicio de la transcripción. Se construyeron las mutantes -204 *sinR* y -204 *hpr/sinR*, -204hpr y se sometieron a cinéticas de crecimiento junto con las cepas -204 y cepa silvestre BB80 de *B. subtilis*, tomando muestras cada hora durante 9 horas y se les determinó A_E de β -galactosidasa a cada muestra (Tabla IX). Todo esto se realizó por triplicado. Se determinó la productividad total y productividad por hora para comparar y observar en que tiempo se produce la mayor cantidad de β -galactosidasa, encontrándose T_2 como el tiempo de máxima expresión de *aprE*.

Tabla IX. A_E de β -galactosidasa en el estadio de crecimiento T_2 (2 horas después del inicio de la esporulación).

Cepa	A_E de β -galactosidasa.	Fuente.
------	----------------------------------	---------

	Unidades Miller.	
-204	1000	Olmos, 1996.
-204 <i>hpr</i>	1000	Olmos 1996.
-204 <i>sinR</i>	2000	Este trabajo.
-204 <i>hpr /sinR.</i>	1500	Este trabajo.
BB80 control	2000	Este trabajo.

XI.3 Análisis de los resultados de la cepa -204.

En la tabla IX podemos observar que al eliminar a Hpr no hay variación en dicha expresión, lo que significa que Hpr no es un regulador significativo en estas condiciones. El caso de la doble mutante *hpr/sinR* donde la expresión es de 1,500 U.M. se sugiere estas posibles explicaciones:

a) Hpr no hace contacto directo por si sola en la mutante -204 ya que si está presente o ausente en esta mutante no se ve afectada la A_E de β -galactosidasa (1000 U.M. en ambas); se podría pensar que Hpr no interfiere directamente con el complejo transcripcional.

b) En el caso de la doble mutante donde eliminamos tanto a SinR como a Hpr, se sugiere que SinR ya no ejerce su represión y el complejo transcripcional es liberado para realizar la transcripción. Sin embargo al ser eliminada Hpr se disminuye la expresión lo que podría sugerir que Hpr

colabora indirectamente a disminuir la expresión de *aprE*, lo que explicaría la disminución en la doble mutante.

c) Otra sugerencia es que posiblemente se forme un complejo entre SinR u otra proteína que podría ser Hpr o algún otro factor no identificado hasta hoy y dependiendo de las señales externas que se reciban, es el papel que tendría el complejo regulador, a la vez que al no estar presente una de ellas la otra ocupe su lugar.

XI.4 Construcción de cepas mutantes de *B. subtilis* (cepa -244)

Por medio de PCR se removió la secuencia reguladora de *aprE* de la base -244 en adelante, con respecto al punto de inicio de la transcripción (Sánchez *et al.* 1999). Se construyeron las mutantes -244, -244/*hpr*, -244/*sinR* y -244*hpr/sinR* y se sometieron a cinéticas de crecimiento tomando muestras cada hora durante 9 horas y se les determinó A_E de β -galactosidasa a cada muestra (Tabla X). Todo esto se realizó por triplicado utilizando las cepas BB80 de *B. subtilis* y la cepa -204 de *B. subtilis* (Olmos *et al.* 1996) como control.

Tabla X. A_E de β -galactosidasa en el estadio T_2 de la curva de crecimiento (2 horas después del inicio de la esporulación).

Cepa	A_E de β -galactosidasa. Unidades Miller.	Fuente.
-244	0	Sánchez <i>et al.</i> 1999.
-244 <i>hpr</i>	0	Este trabajo.

-244 <i>sinR</i>	2000	Este trabajo.
-244 <i>hpr/sinR</i>	1500	Este trabajo.
BB80 control	2000	Olmos, 1996.

XI.5 Análisis de resultados de la cepa -244

Igual que en la mutante -204, al eliminar a Hpr en la mutante -244 no hay ninguna variación en el nivel de expresión de *aprE*, es decir no se libera la expresión de este gen. Esto elimina la posibilidad de que Hpr sea el regulador que ejerce tal efecto sobre la expresión de *aprE*, lo que concuerda con los resultados de la mutante -204. Analizando la mutante *sinR/hpr* se obtienen valores de 1500 U.M., lo que concuerda con la mutante -204 *sinR/hpr*, sugiriendo que Hpr podría actuar directamente en el complejo transcripcional por interacción proteína-proteína o de manera indirecta. Con estos resultados se demuestra también que SinR tiene una fuerte especificidad por el fragmento de 24 pb (SB1-B) que representa la diferencia entre ambas cepas. No descartamos la idea de la formación de

un complejo formado por SinR y Hpr u otro factor que actúen como moduladores y que dependiendo de las señales externas desempeñen su papel activando o reprimiendo requiriendo de la región mencionada para ejercer su función.

Debido a la represión ejercida por SinR en las mutantes construidas, al eliminar a Hpr no se alcanza a percibir ningún efecto significativo en la expresión de *aprE*. En la mutante *sinR* se recupera la expresión hasta alcanzar los niveles de β -galactosidasa de la cepa silvestre; en la doble mutante *hpr/sinR* la expresión de *aprE* disminuye a 1500 U.M. al parecer debido a que el efecto de Hpr, aunque indirecto, sobre la transcripción de *aprE* ya puede ser observado, perfilándose como un regulador débil, o solo de apoyo.

XII. Inserción de 5, 10, 15 y 20 pb entre los sitios Hpr3 y Hpr4 dentro de *aprE*

En otro experimento, realizamos la inserción de 5, 10, 15 y 20 pb en la región reguladora de *aprE* entre las bases -35 y -50, transformando *E. coli* DH5 α con 4 plásmidos que contenían dichas inserciones, generando las cepas PLK-5, PLK-10, PLK-15 y PLK-20. Para analizar los efectos causados por estas mutaciones se determinó A_E de β -galactosidasa en U.M., tanto en *E. coli* como en *B. subtilis*; esto nos permitió ver el efecto

en la ausencia (*E. coli*) y presencia (*B. subtilis*) de las demás proteínas reguladoras de *aprE* reportadas.

XII.1 Resultados en *E. coli*

En el caso de *E. coli* el efecto se puede atribuir casi exclusivamente a alteraciones en la estructura del DNA causadas por las inserciones y no al pegado de proteínas reguladoras (Tabla XI).

Tabla XI. A_E de β -galactosidasa en el estadio T_2 de cultivo de las cepas (2 horas después del inicio de la esporulación).

Cepa	A_E de β -galactosidasa U.M.	Fuente.
PLK-5	1,500	Este trabajo
PLK-10	2,300	Este trabajo
PLK-15	1,500	Este trabajo
PLK-20	2,300	Este trabajo

Todas las cepas presentaron una cinética de crecimiento similar. Los resultados de A_E de β -galactosidasa indican que la cepa PLK-10 y PLK-20 presentan una expresión de ~2,300 U.M. al igual que la cepa de *E. coli* que contiene el plásmido control (pSG35.1), debido a estos resultados se sugiere que al insertar una o dos vueltas completas de DNA (10 o 20 pb respectivamente) el cambio es amortiguado y la alteración no se ve reflejada en la expresión de β -galactosidasa. Sin embargo al introducir 5 o 15 pb se presenta una actividad de 1,500 U.M., es decir, una disminución que creemos se debe a alteraciones en la estructura del DNA.

XII.2 Resultados en *B. subtilis*

Las mutaciones fueron integradas al cromosoma de *B. subtilis* por medio de los 4 vectores (PLK5, PLK10, PLK15 y PLK20), conteniendo las 5, 10, 15 y 20 pb respectivamente, generando las cepas BB80-5, BB80-10, BB80-15 y BB80-20. Estas cepas se analizaron también con el fondo genético *hpr-*, generando las cepas BB82-5, BB82-10, BB82-15 y BB82-20 (Tabla XII).

Tabla XII. A_E de β -galactosidasa correspondiente al estadio T_2 de cultivo de las cepas (2 horas después del inicio de la esporulación).

Cepa	A_E de β -galactosidasa. U.M.	Fuente.
BB80-5	1300	Este trabajo.
BB80-10	1000	Este trabajo.
BB80-15	1500	Este trabajo.
BB80-20	500	Este trabajo.
BB82-5	500	Este trabajo.
BB82-10	1000	Este trabajo.
BB82-15	500	Este trabajo.
BB82-20	500	Este trabajo.

En todos los casos de estas mutantes se presentó un decremento de la A_E de β -galactosidasa, considerando que la cepa silvestre BB80 control expresa 2000 U.M. de A_E , tenemos que la cepa BB80-5 presenta 1300 U.M. y al eliminar a Hpr (cepa BB82-5) la expresión disminuye hasta 500 U.M. La cepa BB80-10 presenta 1000 U.M. (50% menos que la cepa control) y al eliminar a Hpr (cepa BB82-10), no presenta ninguna variación (1000 U.M.). La cepa BB80-15 que fue la de mayor expresión (1500 U.M.) disminuye al eliminar a Hpr (cepa BB82-15) hasta 500 U.M. La cepa BB80-20, presentó

500 U.M. y al eliminar a Hpr (cepa BB82-20) presento 500 U.M., es decir, no presentó variación.

Como se puede observar en los casos donde se introdujeron 10 o 20 pb (es decir, 1 o 2 vueltas del DNA, la ausencia de Hpr no afectó la expresión, por lo que la disminución con respecto a la cepa control se puede atribuir a alteraciones en la estructura del DNA y no a la proteína Hpr (Tabla XIII).

Tabla XIII. Comparación del efecto causado por las inserciones en los 3 fondos genéticos.

pb insertadas	A _E en <i>E. coli</i> U.M.	A _E en <i>B. subtilis</i> BB80 (silvestre)	A _E en <i>B. subtilis</i> BB82 (hpr-)	Causa sugerida
5	1,500	1,300	500	Estructura y Hpr
10	2,300	1,000	1000	Pegado de proteínas.
15	1,500	1,500	500	Estructura y Hpr.
20	2,300	500	500	Pegado de proteínas.

La inserción de 5 pb en *E. coli* produce una disminución de la A_E de β-galactosidasa, lo que atribuimos a alteración en la estructura del DNA causada por dicha inserción. Al comparar esta misma inserción en *B. subtilis* solo muestra una diferencia de 200 U.M. que consideramos no muy significativo pero lo atribuimos al pegado de proteínas, al eliminar a Hpr con esta misma inserción la expresión disminuye drásticamente hasta 500 U.M., en estas condiciones atribuimos a Hpr el efecto.

La inserción de 10 pb en *E. coli* se obtienen 2,300 U.M., sugerimos que una vuelta completa de DNA no altera la estructura de esta región, por ello la A_E se mantiene; En *B. subtilis* la expresión disminuye a 1000 U.M. por lo

que el efecto lo atribuimos al pegado de proteínas reguladoras; en esta mutante el genotipo *hpr* no causa ningún efecto en la expresión.

XIII. Conclusión de las mutantes construidas por inserción.

En el caso de la proteína reguladora Hpr, se dice que no es un represor clásico para *aprE*, ya que aunque su ausencia incrementa bastante la expresión de *aprE*, este proceso está sujeto a los controles temporales normales, y por lo tanto solo es expresado al final de la fase de crecimiento exponencial.

Henner *et al.* 1988, menciona que en una mutante *hpr* donde se removió una región del -244 y al -200 en la región reguladora de *aprE*, se contrarrestaba el efecto de la mutación Hpr. Este resultado implicaba o sugería que cierto factor o proteína reguladora se unía a este sitio en ausencia de la represión por Hpr y causaba la activación de la expresión de la subtilisina. Actualmente sólo se ha descrito a SinR como posible candidato. Nuevamente surge la hipótesis de que tal vez SinR actúe en conjunto con otra proteína en este sitio, y que puedan tener función moduladora ambivalente como un Switch que cambia de función activación-represión dependiendo de los estímulos que reciba el sistema de regulación. En una revisión realizada por Strauch y Hoch, 1995, se menciona que los efectos inhibitorios observados por Hpr, SinR, Pai y ComA, sólo han sido observados bajo condiciones fisiológicas

anormales o sea con un exceso de producción de proteínas reguladoras en plásmidos multicopia. Por lo que, no puede descartarse la idea de que estos efectos sean “artificiales” y no se relacionen con los efectos funcionales fisiológicos normales de estos reguladores. Sólo se puede decir que estos reguladores son una especie de puente entre los regulones globales de la deficiencia de nutrientes, competencia y esporulación.

XIV. Se sugiere una posible Heterodimerización y un posible nuevo sitio de unión para SinR en *aprE*.

Los distintos procesos de dimerización generan un extenso repertorio de regulación de gran potencial y aún mas, la ventaja de la heterodimerización con respecto al control transcripcional es la generación de diversidad a partir de un número limitado de codificantes genéticos o factores transcripcionales. Esta diversidad no resulta en un extenso repertorio de especificidades de unión directa a DNA , pero reflejan mas interacciones dentro de la región de regulación (Owen *et al.* 1992). El saber que SinR ejerce efecto represor sobre *aprE*, aun cuando solo se encuentra la región reguladora hasta la base -204, indica la presencia de un nuevo sitio de pegado para SinR en *aprE*. Asimismo, todos nuestros resultados parecen indicar que se requiere la región reguladora completa de *aprE* para un funcionamiento adecuado donde los

reguladores transcripcionales ejerzan su función predispuesta, donde según nuestras condiciones de experimentación, Al parecer SinR es una proteína que afecta un gran numero y variedad de procesos globales que se ven reflejados en las características fenotípicas y morfológicas de las cepas mutantes en SinR.

La siguiente parte de nuestro trabajo consistirá en corroborar nuestra hipótesis acerca de la formación de un doblez regulador en *aprE* y de buscar un nuevo sitio de unión para SinR en *aprE* antes del sitio -204 que pudiera existir y en buscar que otros factores pudieran unirse con SinR para ejercer los efectos de coactivador.

CAPITULO 3. NUEVO SITIO DE UNIÓN PARA SINR

XV. Introducción

La idea sobre la existencia de dos sitios de unión para SinR aislados, está basada en la hipótesis de que SinR funcione por medio de la formación de un dobléz del DNA. Este tipo de regulación por medio de la formación de un dobléz de DNA ha sido reportada en otros complejos procariotas como el operón de arabinosa (Huo *et al.* 1988; Lee and Schlieff, 1989), el operón de lactosa (Oehler *et al.* 1990) y otros. Ya en un artículo de Gaur y colaboradores en 1991, se comenta que posiblemente SinR tenga efecto sobre *aprE*, actuando antes de la región -200 con respecto al punto de inicio de la transcripción, cerca o sobre el sitio Sspl que esta sobre el promotor. Sin embargo, lo que mas motivó a buscar otro sitio de unión para SinR en *aprE* fueron nuestro resultados de tesis de maestría, donde la construcción en la cual se removió hasta la base -204 aun era reprimida en un 50% por SinR (Sánchez *et al.* 1999), dicha expresión era restaurada eliminando a SinR del medio. Otro factor es que las características de la región reguladora de *aprE* en cuanto a secuencia y estructura, permiten que SinR pueda unirse simultáneamente a un par de sitios adyacentes o distales, esto también atribuible en parte a la presencia de un ángulo flexible entre estos dos dominios de unión a DNA, este ángulo flexible esta presente en el sitio donde supuestamente se une DegU.

SinR es un regulador multifuncional capaz de activar y reprimir rutas alternativas, como la competencia y la esporulación en *B. subtilis*. El mecanismo por el cual SinR activa la competencia permanece aun sin ser esclarecido, pero se ha propuesto que SinR reprime la esporulación inhibiendo la transcripción de *spoOA* y tres promotores de operones clave del estadio II. En Cervin *et al.* 1998, se sugiere que SinR ejerce este efecto directamente sobre todos los genes del estadio II (Mandic-Mulec *et al.* 1995), mas que reprimiendo a SpoOA. En esta parte del trabajo empleamos un programa computacional llamado DNASTar y herramientas de bioinformática como el programa Regulon DB, para buscar el nuevo sitio de unión de sinR sobre *aprE* y sobre todos los promotores del genoma completo de *B. subtilis*.

XVI. MATERIALES Y MÉTODOS

XVI.1 PROGRAMA DNASTAR

Se realizó un alineamiento de secuencias con el programa DNASTar (Lasergene Software; Dnastar INC, Madison, WI, USA) utilizando 6 sitios de unión para SinR conocidos (Fig. 17), para determinar la similitud entre ellos. Dentro del programa DNASTar utilizamos la herramienta Meg aline para alinear y edit-sequence para editar las secuencia nucleotídica de los 6 sitios. Lo que hace esta herramienta es comparar las secuencias editadas con otras secuencias molde, en este caso *aprE*, y determinan la similitud entre ellas. Esto no se había realizado anteriormente, sólo en Gaur 1986, alinearon un fragmento del -274 al -214 que incluía los

fragmentos SB1-A y SB1-B adyacentes y en ningún momento de manera separada ni invertida. Ellos reportaron que esta secuencia completa mostraba 67% de homología con un fragmento del gene *nprE* de -110 a -55.

XVI.2 RESULTADOS DE ALINEAMIENTOS Y ANÁLISIS DE HOMOLOGIA CON EL PROGRAMA DNASTAR

Como resultado al comparar la secuencia del sitio SB1-B invertido con la región reguladora de *aprE* (600 pb), se obtuvo que se alineó de la base +9 a la base +31 (22pb) con un 90% de homología (Fig. 17), lo que podría significar un posible sitio de unión de SinR en *aprE* distinto al sitio mencionado en (Gaur *et al.* 1991).

A)

GTTCTCACGGAAGCACACGCAG	SB1-A
GCCGCACACGAAGGCACTCTTG	SB1-A INVERTIDO
GGTCATTTGAACGAATTTTTTCG	SB1-B
GCTTTTTTAAGCAAGTTTACTGG	SB1-B INVERTIDO
CGTTTTGTCGAATGTAAACATGC	<i>spo0A</i>
CGTTTTGTCACGGTGAAGGAAGT	<i>spollA</i>

B)

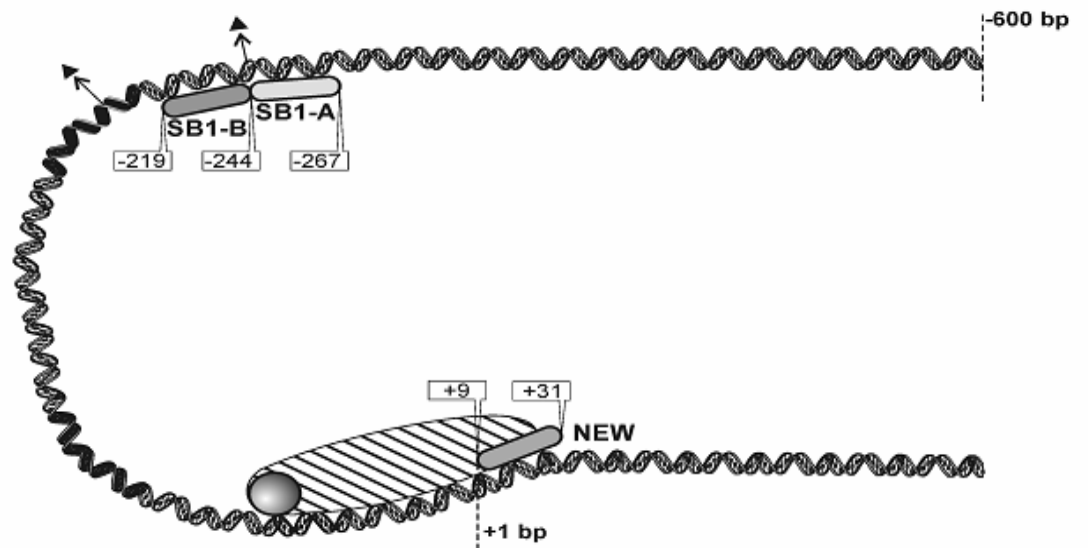


Figura 17. A) Secuencias SB1-A, SB1-B, *spo0A*, *spolIA*, SB1-A invertido y SB1-B invertido utilizados para el alineamiento con el programa DNASTar; B) Región reguladora del gene *aprE* (–665 a la base +50 con respecto al punto de inicio de la transcripción), se señala el nuevo sitio de unión para SinR encontrado entre las bases +9 a la base +31. Las regiones oscuras o negrillas representan áreas flexibles de curvatura de ADN, los triángulos negros representan puntos de remoción en –204 y –244 pb. La figura

también muestra los sitios donde se unen la RNA polimerasa con el factor sigma A.

XVI.3 BÚSQUEDA DE OTROS SITIOS DE UNIÓN PARA SINR A NIVEL GENÓMICO CON HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS

Con este experimento realizamos una búsqueda computarizada usando información actual del sitio de unión de SinR para poder identificar genes regulados por esta proteína y de alguna manera predecir nuevos genes no reportados o no identificados que también tengan sitio de unión en la región reguladora para SinR. Nos basamos en el uso de información experimental acumulada en bases de datos y del programa Regulon DB (<http://www.cifn.unam.mx/ComputationalGenomics/regulondb/>), para hacer predicciones experimentales en genomas microbianos. Este programa, es una manera gráfica de ver la información globalmente. La estrategia consistió en que, dada una colección de sitios de pegado de una proteína, se generó un “sensor” computacional (matriz de peso y umbral definido) para predecir sitios similares, potencialmente funcionales en el resto de regiones reguladoras del genoma de *B. subtilis*. Se obtuvo una larga lista de genes conteniendo sitios de unión para SinR (Tabla XIV). Los pasos a seguir fueron:

Los pasos a seguir fueron:

- I. Obtener una colección de sitios conocidos donde se une SinR.
- II. Generar una matriz de peso con los sitios seleccionados.

III. Calificar los sitios conocidos con dicha matriz.

IV. Definir un umbral de búsqueda.

V. Buscar sitios conocidos y nuevos en regiones reguladoras del genoma de *B. subtilis*.

VI. Interpretación y análisis de los resultados.

Primero organizamos en un archivo las regiones reguladoras de -400 a +52 pb (con respecto al punto de inicio de la transcripción) del genoma completo de *B. subtilis* (cepa 168, BB80). Esta lista fue organizada con ayuda del Dr. Moreno del CIFN de Cuernavaca, Morelos, México.

El archivo conteniendo 4, 222 regiones promotoras potenciales, fue analizada para buscar secuencias blancos para SinR. Utilizando la Bioinformática se calculó y construyó una “Matriz de peso” para la secuencia a la cual se une SinR basándonos en 6 sitios de unión de SinR reportados en la literatura: *spoOA*, *spollA*, *spolIE*, SBS-1A, SBS-1B y SB1-B invertido.

XVII. Resultados

Un resultado satisfactorio y a la vez esperado fue el encontrar 2 sitios de unión para SinR en *aprE*, separados por ~228 pb con un alto valor de afinidad (“score”). Uno en la posición -351 con un “score” de 13.80, que corresponde con el sitio reportado en la literatura y otro en la posición -103 con un “score” de 10.34 (sitio de unión nuevo, tabla XIV). Estos resultados ayudan a corroborar nuestra hipótesis de un nuevo sitio de

unión para SinR dentro de *aprE* y a la vez validan los resultados de β -galactosidasa.

Con el programa Regulon DB se identificaron varios genes conocidos co-regulados por SinR como *aprE* (Gaur et al. 1986), genes *com* (Van Sinderen and Venema 1994; Hamoen et al. 1998), *spoIIA* (Mandic-Mulec et al. 1995), *spo0A* (Mandic-Mulec et al. 1995). También se identificó una considerable cantidad de genes cuya regulación por SinR aun no esta reportada como *degU*, *nprB*, *ynfC* y *ywcF*. Esto es, considerando solo genes con alto “score”. Sin embargo, es necesario realizar experimentos *in-vivo* para confirmar estos resultados.

Tabla XIV. Algunos de los genes regulados por SinR según el programa Regulón DB.

Gene	NCBI # of registration	Position	“score”	Ln (it p-valued)
<i>aprE= sb1-B</i>	e1183032; g2633366	351	13.80	-18.83
<i>ynfC</i>	e1183469; y2634194	53	12.57	-16.22
<i>ywcF</i>	e1186311; y2636347	180	12.52	-16.04
<i>yisR</i>	e1183084; y2633418	225	10.91	-13.49
<i>SpoOA</i>	e1185690; g2634856	336	10.73	-13.30
<i>DegU</i>	e1184455; g2636075	398	10.68	-12.61
<i>comEB</i>	e1183788; y2635004	295	10.66	-13.16
<i>ytmM</i>	e1184184; y2635400	142	10.56	-13.02
<i>yheL</i>	e1182902; y2633236	216	10.42	-12.86
<i>yhaP</i>	E1182992; y2633326	164	10.39	-12.83
<i>aprE= nuevo</i>	e1183032; g2633366	103	10.34	-12.75
<i>groES</i>	e1182581; g2632915	195	10.34	-12.75
<i>trpS</i>	e1183162; y2633496	72	10.32	-12.73
<i>comGA</i>	e1185741; y2634907	302	9.89	-12.17
<i>nprB</i>	e1183112; g2633446	300	9.86	-12.14
<i>glnR</i>	e1183404; y2634129	291	9.70	-11.96

<i>yorY</i>	e1185493; y2634414	156	9.62	-11.85
<i>yorX</i>	e1185494; y2634415	396	9.62	-11.85
<i>cotB</i>	e1184511; y2636130	91	9.28	-11.46
<i>comEA</i>	e1183789; y2635005	327	9.23	-11.40
<i>comFC</i>	e1184451; y2636071	427	9.11	-11.8
<i>yorW</i>	e1185495; y2634416	142	9.00	-11.15
<i>yorV</i>	e1185496; y2634417	363	9.00	-11.15
<i>spo0E</i>	e1184954;g2633735	315	6.85	-8.98
<i>spo0E</i>	e1184954;g2633735	409	6.28	-8.48
<i>spollA</i>	e1185615;g2634781	237	6.59	-8.75
<i>spollA</i>	e1185616;g2634782	325	6.55	-8.72

XVIII. Conclusión

Se ha mencionado que la proteína SinR podría actuar como “switch” regulador, favoreciendo el desarrollo de algunos procesos de adaptación e impidiendo el gasto de energía que utilizaría la célula al entrar a otros procesos. A lo largo de nuestro trabajo se ha buscado determinar el papel que desempeña la proteína SinR dentro de los mecanismos de regulación estudiando la expresión de *aprE*. Hemos ido entendiendo mejor los procesos de reconocimiento y pegado de SinR. Se ha encontrado la existencia de dos sitios de unión para SinR en *aprE*, lo que incrementa la posibilidad de que SinR funcione por medio de la formación de un doblez del DNA. Además surgió la nueva hipótesis de que SinR ejerce su efecto aun estando presente la mitad de su sitio de unión sugiriendo que se une en forma dimérica en este sitio y no en forma tetramérica como indica la literatura antes de Cervin, 1998, se cree que SinR interacciona con otras

proteínas para ejercer su efecto sobre *aprE*. Siendo el candidato más apropiado para unirse al sitio SB1-A Hpr y/o SinI.

La hipótesis es que SinR sigue un comportamiento muy similar al regulón de arabinosa donde proponemos que la proteína SinR es una proteína bifuncional que regula, en conjunto con otras proteínas, operones globales, dentro de ellos al gene *aprE*. SinR está en equilibrio entre ser activador y represor. Por si sola se favorece la forma de represor ya que la proteína SinR se une a los dos sitios en *aprE*, cerca de la región del promotor en forma de dímero creando un dobléz con el DNA involucrado.

Sabemos que en una mutación nula de *sinR*, la expresión de *aprE* disminuye un 50% y que las proteasas minoritarias aumentan (Olmos *et al.* 1996). La proteasa minoritaria NprB, detectada por el programa Regulon DB, podría ser la causante del efecto que se le atribuye a *aprE* (Tabla XIII). Se conoce también que Hpr tiene cuatro sitios de unión en *aprE* (Kallio *et al.* 1991), no obstante en este trabajo al quitar a Hpr en ninguno de los fondos genéticos (BB80-204 ni BB80-244), se alteró la expresión de la fusión *aprE-lacZ*. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones hechas por (Olmos *et al.* 1996 y Henner *et al.* 1988b). Sin embargo, en un promotor completo con el fondo *hpr* se alcanzan 10.000 U.M. de β -galactosidasa, comparada con las 2.000 U.M. de la cepa silvestre (Olmos *et al.* 1998). En otro punto, Spo0A es uno de los reguladores más importantes del estado de la transición y su regulación por SinR es bien

sabida (Gaur *et al.* 1991; Msadek *et al.* 1993). Sin embargo, DegU otro regulador importante de este estado no se sabia que era regulado por SinR, interesantemente, los efectos producidos por una mutación nula de SinR y DegU32(Hy) son similares (Ferrari *et al.* 1985, 1986; Olmos *et al.* 1997), sugiriendo un efecto represivo de SinR sobre la expresión de *degU*. Es decir, cuando SinR no está reprimiendo la expresión de *degU* se presenta una producción excesiva de esta proteína que genera efectos similares que un mutante DegU32 (Hy).

En nuestro próximo trabajo trataremos de buscar a otras proteínas reguladoras que pudieran interaccionar con SinR, utilizando el sistema de dos híbridos bacteriano.

XXIV. CAPITULO 4. SISTEMA DE DOS HÍBRIDOS BACTERIANO (DHB) BASADO EN LexA.

XIX. Introducción

Este sistema es utilizado con la intención de analizar las interacciones proteína-proteína *in vivo* entre SinR y los demás reguladores transcripcionales, como AbrB, DegU, Hpr y Spo0A. Como control se utilizó la interacción de SinR con SinI ya reportada en la literatura. Lo anterior fue con el fin de construir un modelo de regulación para *aprE* lo mas completo posible.

AbrB esta formada por 96 aminoácidos con un peso molecular (P.M.) de 10.63 KDa, es un regulador pleiotrópico de los genes del estado de transición y reprime la expresión de *aprE* por impedimento físico uniéndose en la región promotora del gene (Olmos *et al.* 1998; Strauch *et al.* 1991). DegU esta constituida por 229 aminoácidos con 25.72 KDa, es un regulador de respuesta del sistema de dos componentes que al ser fosforilado por DegS, se une a la región reguladora de *aprE* en el sitio específico del dobles dando estabilidad al complejo transcripcional y favoreciendo la expresión de *aprE* (Hoch y Strauch, 1995). Hpr tiene 203 aminoácidos y un peso molecular de 23.56 KDa, esta reportado como represor de la esporulación de *aprE*, de *sin* y *nprE* (Henner *et al.* 1988). Spo0A de 267 aminoácidos tiene un peso de 29.54 KDa y además de su papel principal en el inicio de la esporulación es un regulador positivo de

aprE. El fundamento del sistema de DHB basado en la proteína LexA (Fig. 20) está reportado en la literatura (Dmitrova *et al.* 1998). LexA es miembro de la familia de factores de Transcripción hélice-vuelta-hélice (HTH) (Lamerichs *et al.* 1989; Fogh *et al.* 1994). La N-terminal de LexA tiene un dominio de unión a DNA (DBD) de aproximadamente 70 aminoácidos y en su C-terminal tiene un dominio para dimerización (Fogh *et al.* 1994).

La proteína LexA actúa como un represor transcripcional eficiente en *E. coli* solo si forma un dímero. Esta propiedad le permite reemplazar al dominio de dimerización C-terminal de LexA por un motivo de heterodimerización heterólogo sin alterar su actividad de represor (Porte *et al.* 1995).

Este sistema está basado en utilizar los plásmidos pDP804 y pMS604, en los cuales se inserta en fase el gene de las proteínas cuya interacción se desea analizar y los plásmidos construidos son co-expresados en las cepas reporteras SU101 si se busca analizar una interacción homodimérica ó SU202 si la interacción es heterodimérica. Las cepas reporteras SU101 y SU202 contienen una copia del gene *lacZ* bajo control del operador *sulA* silvestre (SU101) y del operador *op408/op+híbrido* (SU202) (Dmitrova *et al.* 1998).

Estas cepas reporteras producen un genotipo rojo/blanco detectable en medio MacConkey/lactosa permitiendo estudios de interacción proteína/proteína.

Una fusión LexA silvestre homodimérica reconoce el operador tipo silvestre de la cepa SU101 y reprime la transcripción del gene reportero. Por otra parte, solo un heterodímero de una fusión silvestre-mutante LexA puede reconocer el operador híbrido de la cepa SU202. Una co-expresión de dos proteínas híbridas generan una represión transcripcional el gene *lacZ* controlado por el operador op408/op+híbrido. Esto permite el monitoreo de interacciones proteína-proteína homodiméricas en SU101 y heterodiméricas en SU202 (Dmitrova *et al.* 1998).

Se partió de los plásmidos pMS604 y pDP804 (Fig. 18), primeramente en el plásmido pMS604 se insertó un promotor *lexA1-87wt-fos zipper* (Fig. 19), este promotor se inserto de manera que tuviera 3 marcos abiertos de lectura (MADL) generando los plásmidos pSR658, pSR660 y pSR662 que contienen los MADL del promotor pTrcHis -A, -B y -C, respectivamente. Por otro lado, en el plásmido pDP804 (mutante) se insertó el promotor *lexA1-87408-jun zipper* (Fig. 19) para construir los plásmidos pSR659, pSR661 y pSR663 de igual manera conteniendo los MADL del promotor pTrcHis -A, -B y -C, respectivamente.

XX. MATERIALES Y MÉTODOS

XX.1 Cepas.

Cepa SU101: Tiene un operador de LexA tipo silvestre hacia arriba del gene reportero *lacZ* bajo el control del promotor *sulA*. Tiene una resistencia a una concentración de 25 µg/ml de Kanamicina.

Cepa SU202: Tiene el mismo sistema reportero de la cepa SU101 pero esta controlado por el operador op408+híbrido, este operador permite que un heterodímero formado por dos proteínas que interaccionan puedan unirse a este operador híbrido, de manera que se reprima la expresión de LexA. Tiene resistencia a una concentración de 25 µg/ml de kanamicina

XX.2 Plásmidos (Fig. 18).

Plásmido pMS604: contiene la fusión LexA₁₋₈₇ WT-Fos zipper y el replicón ColE1 (vector tipo pUC); tiene resistencia a Tetraciclina. Tiene 4,179 pb.

Plásmido pDP804: contiene la fusión LexA₁₋₈₇ WT-jun zipper y el replicón de p15A y tiene resistencia a Ampicilina. Tiene 3,125 pb.

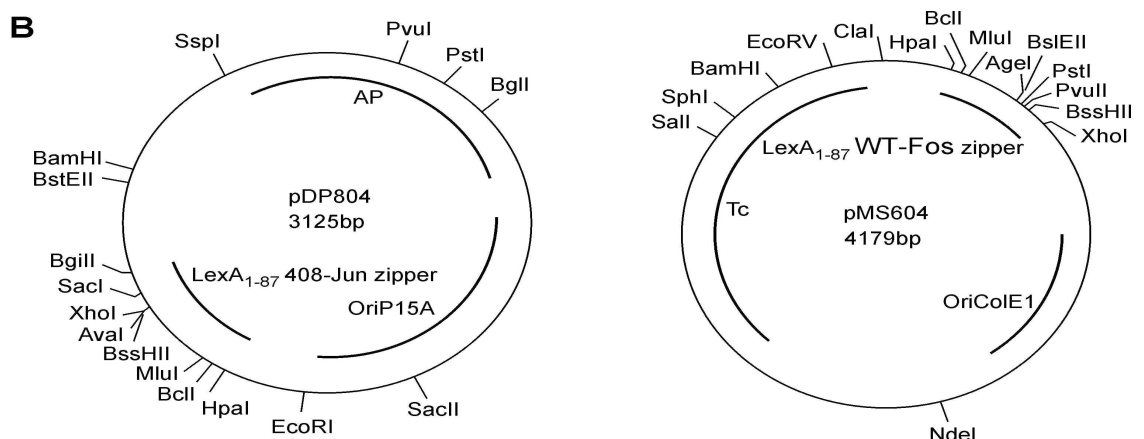


Figura 18. Plásmidos pDP804 y pMS604, requeridos para el sistema DHB basado en LexA.

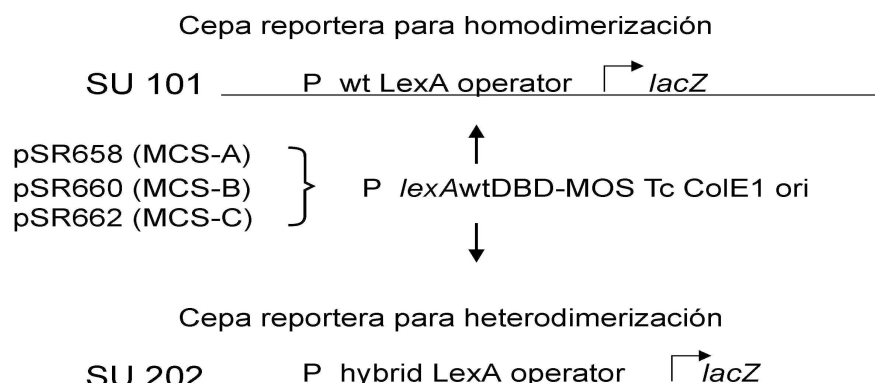


Figura 19. **Promotores de las cepas SU101 y SU**

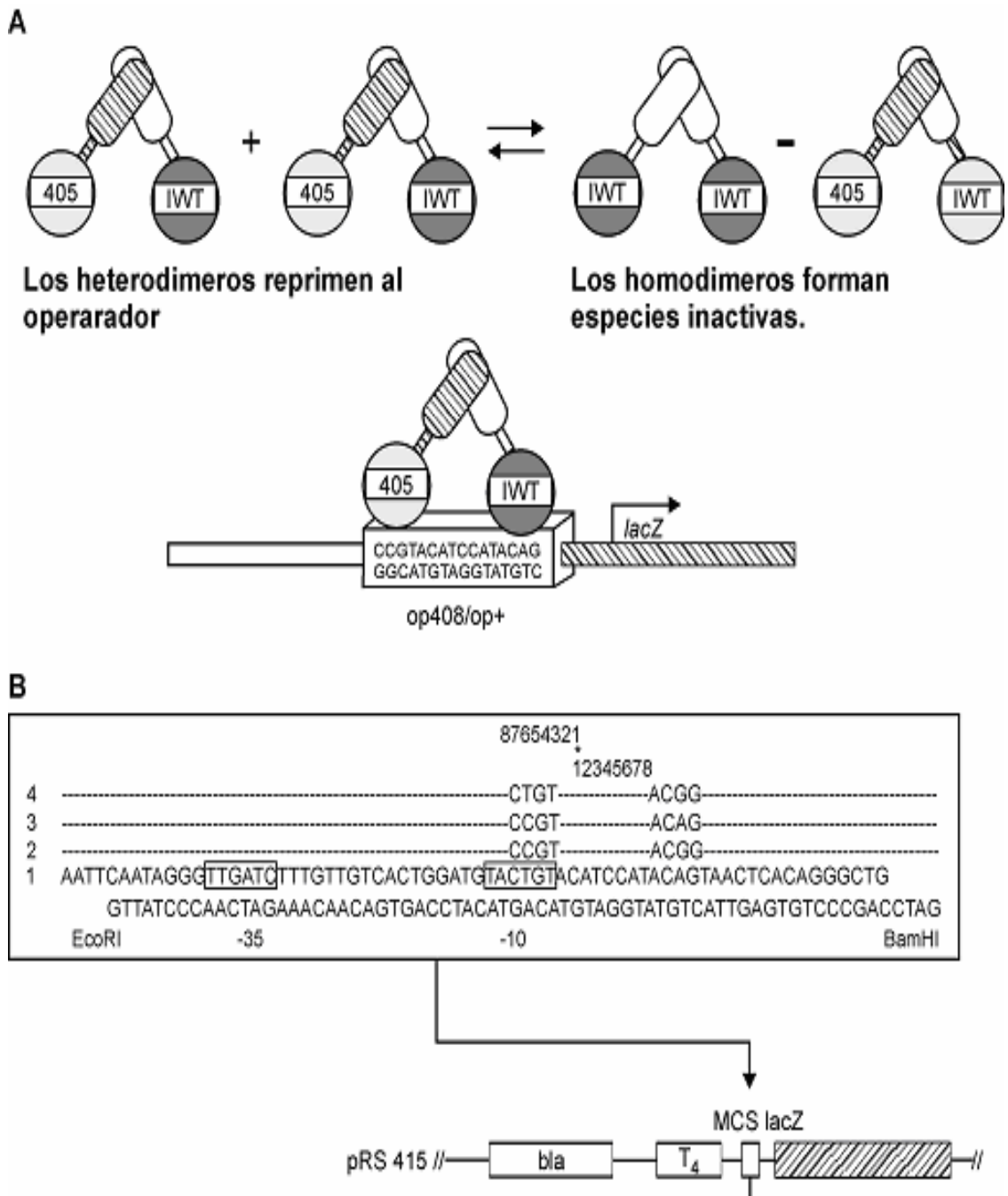
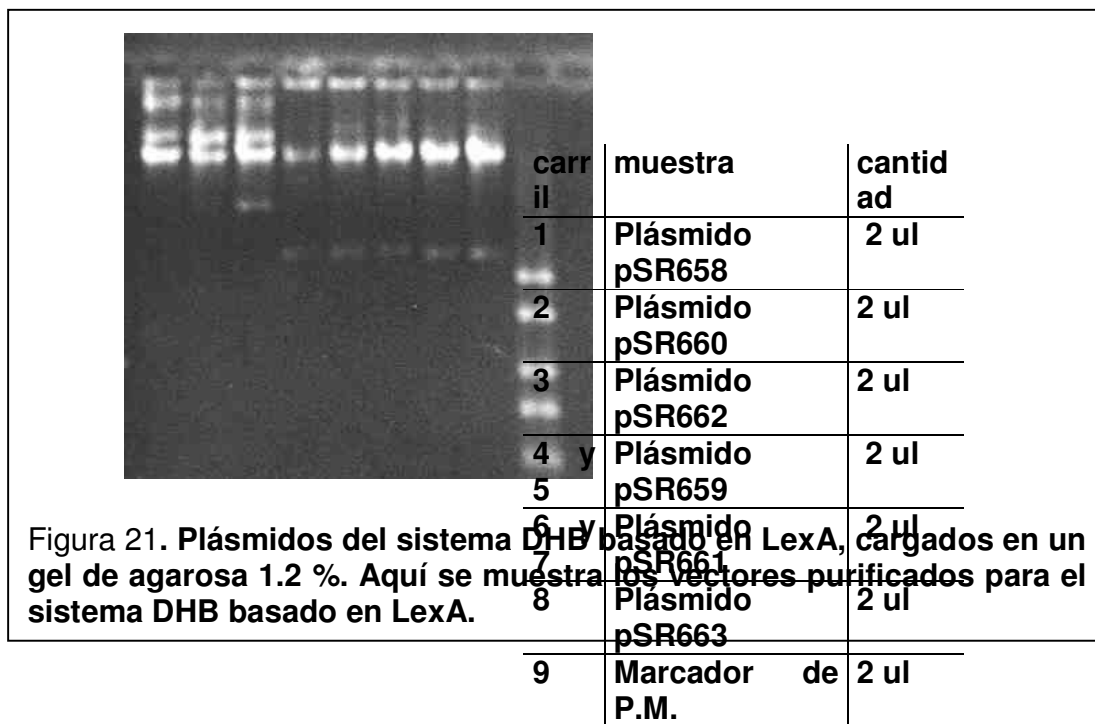


Figura 20. Fundamento del sistema DHB basado en *lexA*.



XX.3 DISEÑO DE LOS "PRIMERS" (OLIGOS) LEXA

Para fusionar genes en Marco abierto de Lectura (MADL) con el DBD ("DNA binding domain") de LexA.

La secuencia de los oligos depende de los genes que se van a insertar en los vectores de LexA. Por ejemplo, para insertar un gene en el vector pSR659 en el sitio *Bam*HI/*Hind*III, el oligo "forward" incluirá:

Cuatro nucleótidos al azar (NNNN).

El sitio de restricción de *Bam*HI (GGATCC).

De 15-20 nucleótidos que incluyan el ATG de inicio de tu gene.

ejemplo:

Si la secuencia de tu gene es:

5'- **ATG GTC AAT GGC**..... etc.,

y la quieres insertar en el vector MADL-A , -B o -C en margen abierto con el DBD de LexA.

Oligo forward

Entonces tu oligo forward será:

5'- NNNNGGATCC **ATG GTC AAT GGC**...-3'. Para MADL -A.

5'- NNNNGGATCC **.TG GTC AAT GGC**...-3'. Para MADL -B.

5'- NNNNGGATCC **..G GTC AAT GGC**...-3'. Para MADL -C.

NOTA: de 15 a 20 nucleótidos posteriores al ATG de inicio, y tratar de que tu oligo termine con GG o CC.

La terminal 5'- será cortada por la enzima de restricción, así que no importa que nucleótidos se coloquen al inicio, son solo para dar espacio de unión a la enzima de restricción.

Oligo reverso

Este no necesita estar en marco abierto de lectura con el DBD de LexA ya que hay codones de terminación en los tres marcos abiertos de lectura de los vectores. También incluimos en la secuencia del gene su codón de terminación nativo para asegurarnos de que la proteína a fusionar termine correctamente.

En este caso si tu gene termina con:

.....**CCA TTC GAA CAA TAA** -3'.

el oligo reverso será:

5'- NNNNAAGCTTTTATTGTTCTGAATGG.....-3' etc.

de 15-20 nucleótidos antes del sitio *HindIII*.

Por supuesto, los sitios de restricción que puedes usar son totalmente dependientes de la secuencia del gene que se desee clonar a los vectores, como sabemos, no debe existir un sitio *BamHI* o *HindIII* en tu gene de interés si vas a usar estos en tus oligos. (Tabla XV).

Tabla XV. **Oligos utilizados diseñados para ligar los fragmentos al plásmido pSR658 y pSR659 (Fig. 19). Posteriormente transformar con estos plásmidos la cepa SU101 para determinar homodimerizaciones y la cepa SU202 para determinar heterodimerizaciones.**

Nombre	Secuencia	Tm	plásmido
Xho-hpr	CCG CTCGAG ATGAATCGAGTGGAAACCG	54°C	pSR658
Xho-sinI	CCG CTCGAG ATGAAGAATGCAAAACAAGAG	54°C	pSR658
Xho-sinR	CCG CTCGAG TTGATTGGCCAGCGTATTA	54°C	pSR658
PstI-hpr	AA CTGCAG TTAAGTGTTCACAGGTTCTGA	54°C	pSR658
PstI-sinI	AA CTGCAG TCAGAAAGGATTTACGGTAT	54°C	pSR658
PstI-sinR	AA CTGCAG CTAAGTCTCTTTTGGGAT	54°C	pSR658
Bam-hpr	CG GGATCC ATGAATCGAGTGGAAACCG	54°C	pSR659
Bam-sinI	CG GGATCC ATGAAGAATGCAAAACAAGAG	54°C	pSR659
Bam-sinR	CG GGATCC TTGATTGGCCAGCGTATTA	54°C	pSR659
Hin-hpr	CCC AAGCTT TTAAGTGTTCACAGGTTCTGA	54°C	pSR659
Hin-sinI	CCC AAGCTT TCAGAAAGGATTTACGGTAT	54°C	pSR659

Hin-sinR	CCCAAGCTT CTA CT CCTCTTTTTGGGAT	54°C	pSR659
----------	--	------	--------

XX.4 Construcción de los plásmidos requeridos para el sistema DHB LexA.

Este sistema de DHB basado en LexA contiene 2 plásmidos que son utilizados para insertar en ellos la secuencia del gene que codifica para la proteína que queremos estudiar. Primeramente está el plásmido 1.1 (pSR658), (Fig. 20), que se utiliza como plásmido anzuelo, tiene la función de expresar un monómero de la proteína principal de interés, en este caso SinR, fusionada a la región proteica de LexA que va del aminoácido 1-87 y que es la región que hace contacto con el operador silvestre (Fig. 20). Este plásmido tiene origen de replicación tipo pUC por lo que se considera un plásmido multicopia (500-700 copias por célula) y confiere resistencia a Tetraciclina (10 ug/ml).

Este plásmido fue digerido con *Xho*I y *Pst*I por 4 horas a 37°C. En otro experimento cultivamos *B. subtilis* cepa 168 silvestre por 12 horas a 300 rpm y 37°C y purificamos ADN cromosomal (anexo # 6). Este ADN cromosomal fue empleado como ADN molde para amplificar por PCR (anexo # 10) la región estructural de los genes *sinR*, *sinI* y *hpr* respectivamente. Los oligonucleótidos (Tabla XV) empleados fueron diseñados para que los productos de PCR tuvieran en los extremos los sitios de restricción para *Xho*I y *Pst*I para posteriormente también

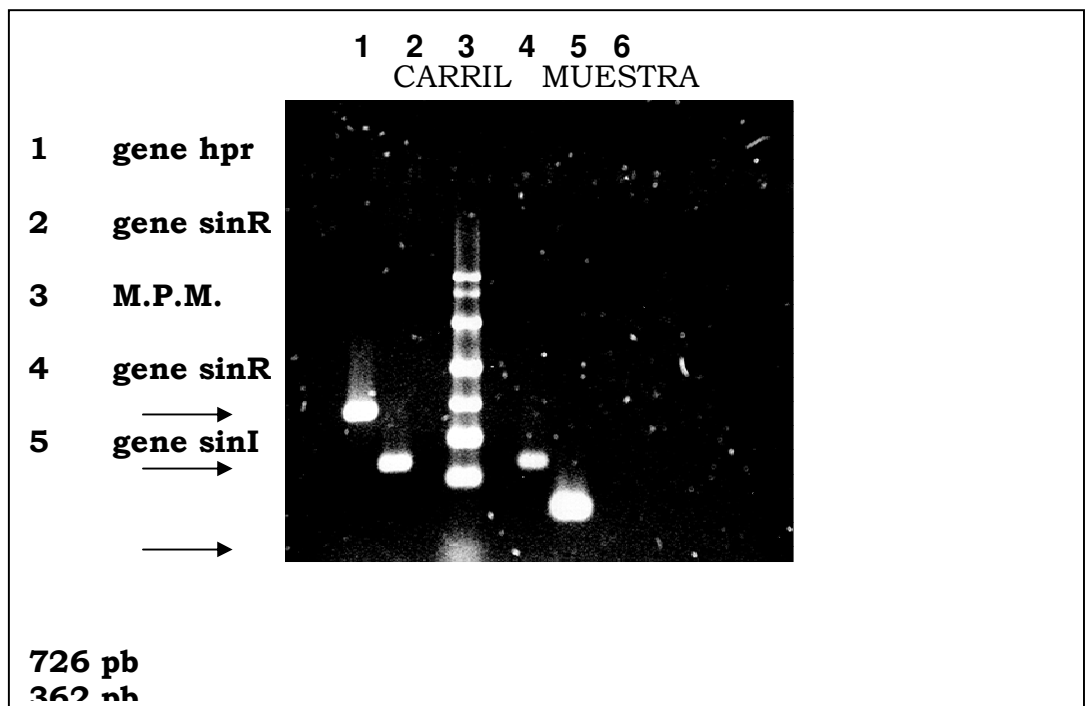
digerirlos al igual que el plásmido pSR658. Una vez digeridos el plásmido y los 3 genes, se purifican por la técnica de fenol-cloroformo (anexo # 9) y se transfieren a columnas shepadex 50 (anexo # 1).

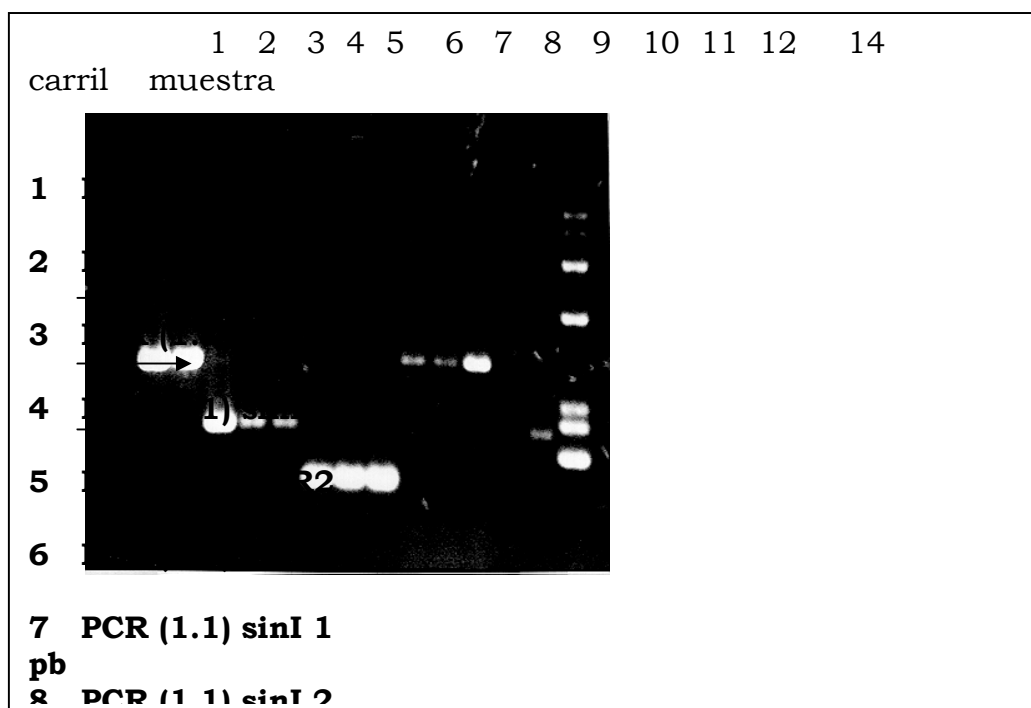
El segundo plásmido que compone al sistema DHB LexA es el plásmido 2.1 (pSR659), (Fig. 19). Este plásmido genera la parte proteica de LexA fusionada a la segunda proteína que deseamos analizar y saber si interacciona con la proteína anzuelo (SinR) de interés. Tiene un origen de replicación tipo pACYC de bajo numero de copias (10 a 12 plásmidos por célula). Este plásmido fue digerido con *Bam*HI y *Hind*III. En otro experimento se obtuvieron los genes *sinR*, *sinI* y *hpr* por PCR amplificados con los oligos correspondientes (Tabla XV) y fueron digeridos con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. Tanto el plásmido como los 3 genes fueron purificados por la técnica de fenol-cloroformo y transferidos a columnas de sephadex 50 (anexo # 1).

Es importante verificar la pureza y concentración del plásmido y de los genes que se van a utilizar posteriormente en un proceso de ligación.

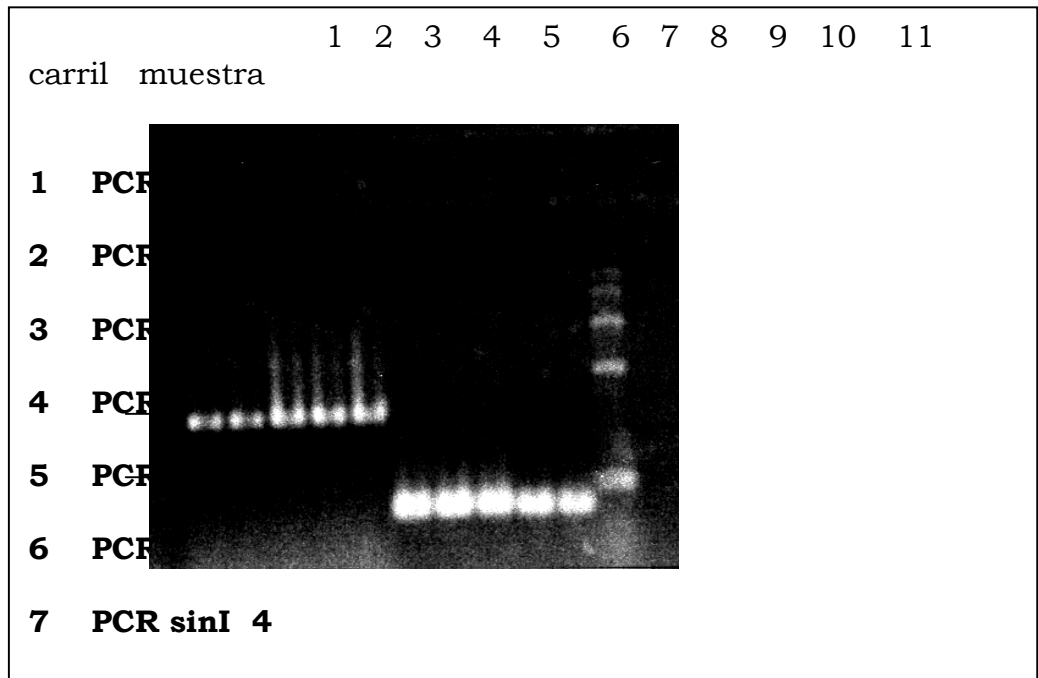
Se determina una relación $\lambda_{280}/\lambda_{260}$ buscando entrar en un rango de 1.65-2.00 y una relación $\lambda_{230}/\lambda_{260}$ buscando un valor que oscile entre 0.3-0.6 para una ligación optima. Además de agregar las cantidades de fragmento y plásmido a ligar en una relación 3:1 dependiendo de las concentraciones obtenidas (anexo # 4).

Después de obtener los genes correspondientes, se purificaron por la técnica de fenol-cloroformo (anexo # 9) y se pasaron por centricon (anexo # 8). El mismo procedimiento se utilizó para purificar los vectores pSR658 y pSR659 para posteriormente digerir (anexo # 3) los genes y los plásmidos y realizar una reacción de ligación (anexo # 4). Después de construir estos plásmidos se transformaron las cepas SU101 y SU202. A partir de estas cepas se purificó plásmido y se realizó amplificación de los genes correspondientes para buscar que tuvieran el inserto inicial (Fig. 23-24).

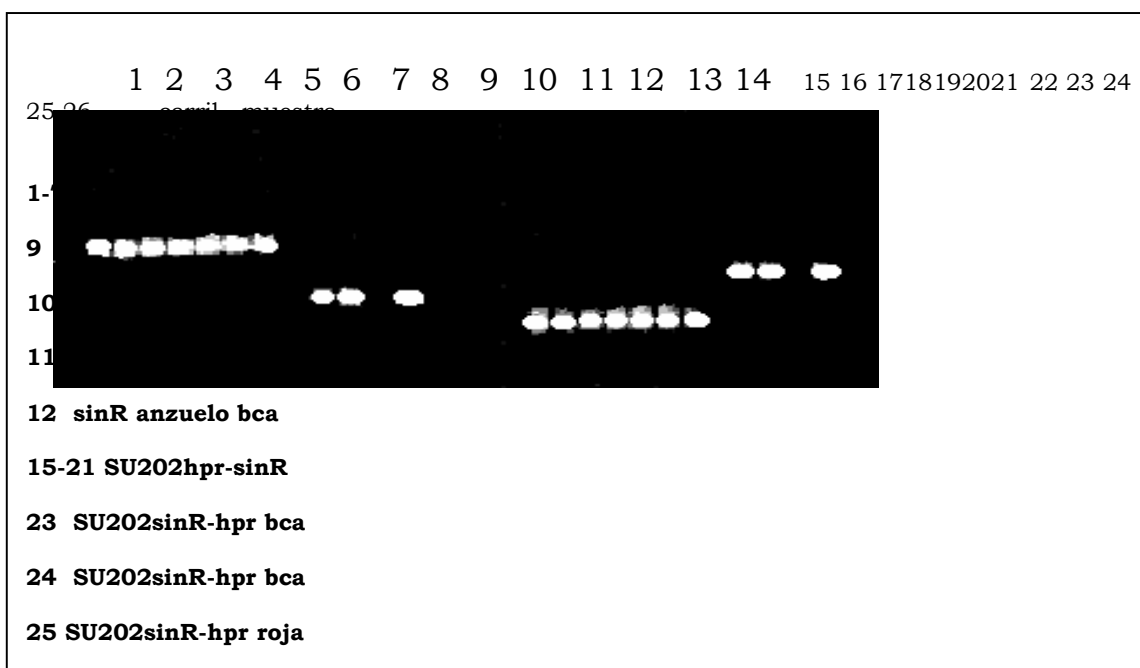
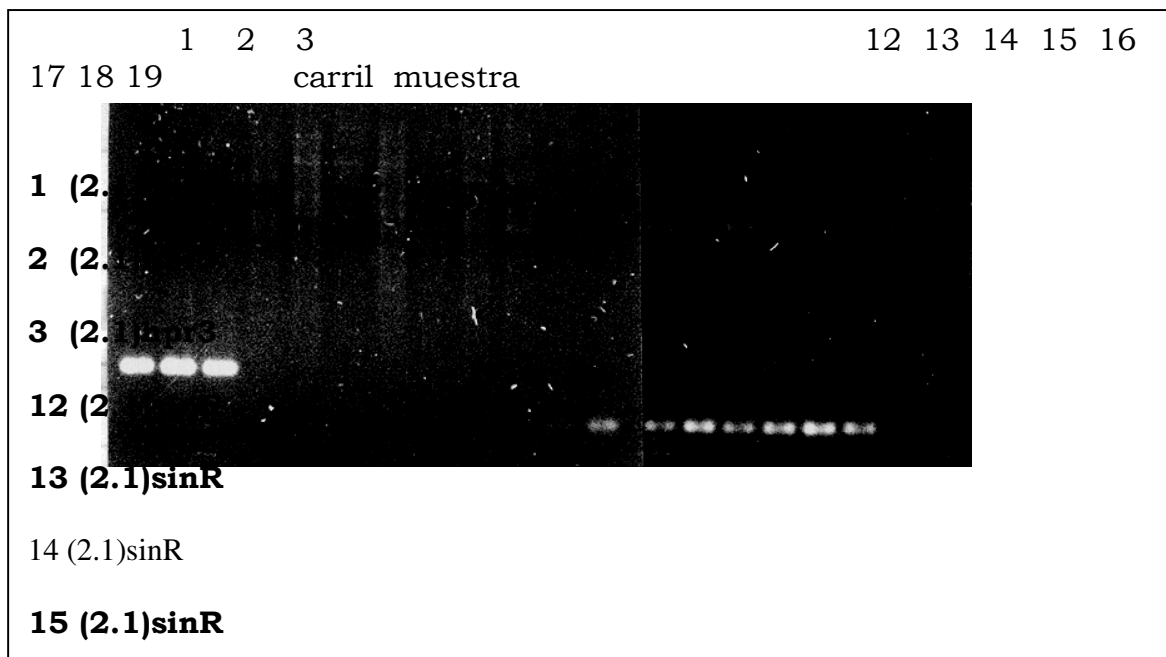




Cuando construimos la cepa SU101 que contenía doble fondo genético. Tanto la cepa Hpr-Hpr como la cepa SinI-SinI presentaron colonias blancas y por ende homodimerización (Fig. 25). Este dato no se ha reportado con anterioridad ni se había realizado este tipo de experimentos con los reguladores transcripcionales de *B. subtilis*.



Al transformar la cepa SU202 con los plásmidos contruidos y purificar plásmidos a partir de estas cepas, verificamos que estos plásmidos purificados tuvieron los insertos correctos realizando una amplificación por PCR (Fig. 26-27), los resultados fueron satisfactorios en todos los casos, corroborando una buena construcción de vectores y una adecuada transformación.



XXI.1 Resultados de las transformaciones en el sistema de DHB basado en LexA.

Las cepas SU101 y SU202 presentan una coloración roja en medio Maconckey y Azul en medio Luria-Bertani (LB). En base a un estudio cualitativo se decidió utilizar el medio Maconckey en lugar del medio LB , ya que este medio muestra mejor diferencia entre colonias rojas o blanca, presentando mejor definición con Lactosa que con Maltosa (Fig. 28).

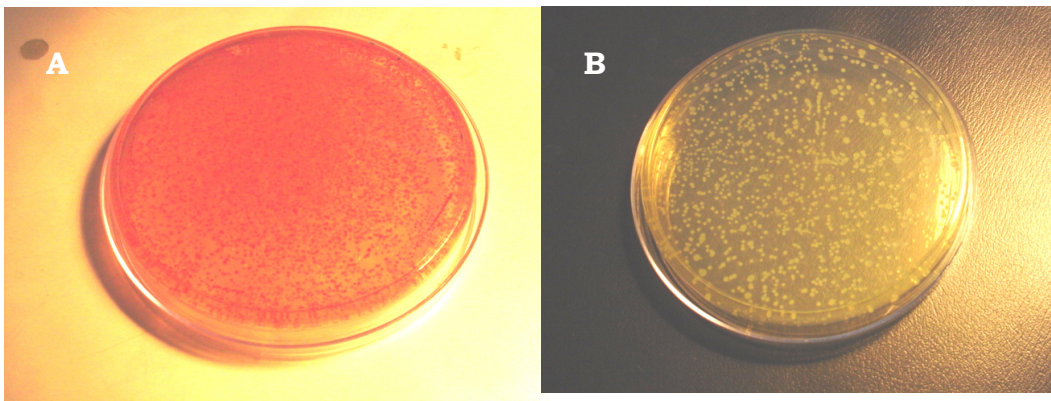


Figura 28. Colonias transformantes del sistema DHB LexA. A) Sin interacción, colonias rojas; B) Interacción, colonias blancas.

XXI.1.1 Cepa SU101

Al transformar la cepa SU101 con los plásmidos pSR658(*sinR*), pSR658(*sinI*) y pSR658(*hpr*) obtuvimos colonias blancas en su totalidad que sugieren que las proteínas SinR, Hpr y SinI presentan homodimerización. En los tres casos las colonias presentaron resistencia a ampicilina y amplificación por PCR de los genes correspondientes, es decir, amplificación de los genes *sinR*, *sinI* y *hpr* para las cepas SU101-SinR, SU101-SinI y SU101-Hpr respectivamente. En todos los casos se utilizaron controles que nos permitieron asegurar que el resultado de las interacciones eran reales.

XXI.1.2 Cepa SU202

El siguiente paso fue utilizar la cepa SU202, la segunda cepa del sistema DHB basado en LexA. La cepa SU202 tiene una construcción que consta del gene reportero *lacZ* unido a un operador híbrido (silvestre-mutante), el cual solo puede ser reprimido cuando la cepa se cotransforma con los plásmidos pSr658(X) y pSR659(Y) conteniendo los genes de dos proteínas (X y Y), que al interactuar permitan la represión de *lacZ*. La cepa SU202 presenta una coloración roja en Maconckey y azul en LB/X-Gal y permite analizar interacciones heterodiméricas. Inicialmente se transforma la cepa SU202 con el plásmido anzuelo pSR658 conteniendo el gene que codifique para la proteína anzuelo, este plásmido le confiere a la cepa una resistencia a Tetraciclina (10 ug/ml). En este trabajo construimos tres

cepas distintas, una utilizando a SinR como anzuelo, la segunda utilizando a SinI como anzuelo y la tercera empleando a Hpr como proteína anzuelo. Posteriormente se elaboraron células competentes (anexo # 13) a partir de las tres cepas anzuelo. Una vez obtenidas las células competentes se procedió a cotransformar primero la cepa SU202-SinR con los plásmidos pSR659(*sinR*), pSR659(*sinI*) y pSR659(*hpr*). Este plásmido le confiere a la cepa resistencia a 100 mg/ml de ampicilina y en caso de ocurrir interacción entre las dos proteínas participantes se obtendrían transformantes blancas debido a la represión de *lacZ*. Mas del 90% de las transformantes presentaron la doble resistencia a antibióticos Tetraciclina (10 ug/ml) y ampicilina (100 ug/ml) y al realizar PCR de los plásmidos provenientes de estas colonias se obtuvo amplificación del doble fondo genético,

Comprobándose así la correcta construcción de los plásmidos. Debemos mencionar que en este trabajo utilizamos el sistema de DHB basado en LexA de manera que pudiéramos manejar a las tres proteínas de interés SinR, SinI y Hpr como proteínas anzuelo, sin embargo cuando se utilizó a SinR como proteína anzuelo, presento muy pocas cotransformantes blancas con apariencia seca (Tabla XVI), para la interacción SinR-Hpr obtuvimos un promedio de menos de 50 colonias por caja petri con un 90% de colonias blancas y para la interacción SinR-SinI de 0 a 3 colonias por caja petri, blancas en su totalidad. Cuando se utilizó como proteína anzuelo a SinI la coloración blanca tardo en aparecer de 2 a 3 días, lo que

sugiere que la interacción SinI-SinR talvez necesita de alguna señal de *B. subtilis* para acelerar la heterodimerización. En los casos donde Hpr fue la proteína anzuelo los resultados de las cotransformaciones fueron muy claros y precisos, ya que las colonias transformantes fueron blancas o rojas en su totalidad.

Tabla XVI. Interacción que presentaron las cepas.

Plasmido	Cepa su202-SinR	Cepa su202-SinI	Cepa su202-hpr
Hpr	☺ SinR-Hpr	☺ SinI-Hpr	☺ Hpr-Hpr
SinI	☹ SinR-SinI	☺ SinI-SinI	☺ Hpr-SinI
SinR	☹ SinR-SinR	☺ SinI-SinR	☺ Hpr-SinR



INTERACCION (~400 colonias por caja).



POCAS transformantes baja eficiencia (~10 colonias por caja).

En la mayoría de los casos las transformantes fueron de color blanco para las interacciones SinR-Hpr, SinR-SinI, SinR-SinR, SinI-SinI y Hpr-Hpr. Los resultados sugieren que hay heterodimerización entre la mayoría de las proteínas analizadas a excepción de la cepa SinI-Hpr donde se obtuvieron colonias rojas en su totalidad, siendo el único caso en el cual no hubo heterodimerización (Tabla XVII).

Tabla XVII. Cepas que presentaron interacción proteína-proteína, cabe mencionar que todas las cepas fueron seleccionadas por su resistencia a antibióticos y amplificación por PCR de los genes correspondientes.

Cepa SU101	plásmido	Resultado
	Vector pSR658 (<i>sinR</i>)	HOMODIMERIZACION
	Vector pSR658 (<i>sinI</i>)	HOMODIMERIZACION
	Vector pSR658 (<i>hpr</i>)	HOMODIMERIZACION
Cepa SU202	SinR- SinR	Control positivo
	SinR-SinI	HETERODIMERIZACION
	SinR-Hpr	HETERODIMERIZACION
	SinI-SinR	HETERODIMERIZACION
	SinI-SinI	Control positivo
	SinI-Hpr	NOcolonias rojas.
	Hpr- SinR	HETERODIMERIZACION
	Hpr-SinI	N0..... colonias rojas
	Hpr-Hpr	Control positivo

En un esfuerzo por integrar a todos los reguladores transcripcionales de *B. subtilis* que afectan la expresión de *aprE*, se decidió incluir a las proteínas reguladoras AbrB, DegU y Spo0A y utilizar este sistema DHB basado en LexA que estaba generando buenos y muy claros resultados, de manera que construimos los plásmidos pSR658 (*abrB*), pSR658 (*degU*) y pSR658 (*spo0A*). Para determinar si formaban homodímeros, utilizamos estos plásmidos en la cepa SU101 (Tabla XVIII), las tres proteínas

presentaron homodimerización y aunque estos experimentos no habían sido reportados con anterioridad, esperabamos que AbrB, DegU y Hpr formaran homodímeros, ya que parece ser un patrón que siguen los reguladores transcripcionales de *B. subtilis* de actuar en forma de dímeros. En otro experimento utilizamos como proteína anzuelo a SinR, SinI y Hpr para determinar si AbrB, DegU y/o Spo0A interaccionaba con alguna de ellas, pero en todos los casos resultó que no había interacción (Tabla XVIII).

Tabla XVIII. Tabla de las cepas que presentaron Interacción proteína-proteína, donde se introdujo a las proteínas reguladoras DegU, AbrB y Spo0A para complementar el sistema de regulación de *aprE*, y cabe mencionar que todas las cepas fueron seleccionadas por su resistencia a antibióticos y por amplificación por PCR de los genes correspondientes.

Cepa SU101	Plásmido	resultado
	Vector pSR658 (<i>abrB</i>)	HOMODIMERIZACION
	Vector pSR658 (<i>degU</i>)	HOMODIMERIZACION
	Vector pSR658 (<i>spo0A</i>)	HOMODIMERIZACION
Cepa SU202	SinR- AbrB	N0..... colonias rojas
	SinR-DegU	N0..... colonias rojas
	SinR-Spo0A	N0..... colonias rojas
	SinI-AbrB	N0..... colonias rojas
	SinI-DegU	N0..... colonias rojas
	SinI-Spo0A	NOcolonias rojas.
	Hpr- AbrB	N0..... colonias rojas
	Hpr-DegU	N0..... colonias rojas
	Hpr-Spo0A	N0..... colonias rojas

XXII. Conclusión

En todos los casos donde resultaban colonias blancas y rojas en el mismo ensayo, concluimos que las colonias blancas (95%) corresponden a nuestras construcciones y las colonias rojas (5%) pudieron tener origen a partir de una digestión incompleta de los plásmidos huésped. Además en los casos en que la proteína anzuelo fue SinR o SinI obtuvimos un 10% de colonias blancas con el centro rojo consideradas como falsos positivos para este sistema DHB LexA. Otra nota importante es que para utilizar de manera óptima el sistema DHB basado en LexA, se debe sembrar una cantidad de transformantes que generen aproximadamente 50 Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por caja petri, ya que una sobrepoblación (100 colonias o mas por caja) provocan una mala visualización y análisis de las colonias resultantes.

Los resultados del Análisis de Interacción proteína-proteína, permitieron conocer

- a) Que SinR, SinI, Hpr, AbrB, DegU y Spo0A forman homodímeros.**
- b) Que SinR interacciona con Hpr formando heterodímeros, al igual que SinR-SinI.**
- c) Que SinR, SinI y Hpr no interaccionan directamente con DegU, Spo0A o AbrB.**

d) Posiblemente el heterodímero SinR-Hpr, actúe como el switch que hemos estado buscando, pero se requieren más pruebas para poder asegurar dicha función dentro de *aprE*.

El utilizar a SinR como proteína anzuelo genera alteraciones en la cepa huésped, lo que no favorece la claridad en los resultados del sistema DHB LexA.

Cuando se utiliza como proteína anzuelo a Hpr o a SinI los resultados fueron muy claros.

XXIII. Conclusiones generales

Capítulo 1.- Construcción de mutantes por remoción y puntuales.

- En los resultados de la construcción de mutantes, observamos una disminución de la expresión de *aprE* en las cepas donde: se eliminaba el sitio de unión de SinR, cuando sustituimos las bases de contacto con SinR y al eliminar a la proteína reguladora SinR del organismo, todos estos resultados señalaron a SinR como un posible coactivador de *aprE*.
- En los casos donde cortamos solo la mitad del sitio de unión de SinR (cepa *aprE244*), se atribuyó la represión a SinR, ya que al eliminar a SinR, la actividad se restaura y al comparar la expresión de la cepa *aprE204* con la cepa *aprE244* se concluyó que SinR se unía en dos sitios distintos en *aprE*.
- SinR parece no necesitar sitios consenso muy estrictos, lo que se puede deber a que los dos motivos estructurales de SinR son distintos y le confieren a la proteína la capacidad de cambiar su mecanismo de acción dependiendo de las condiciones ambientales, para apagar o prender rutas alternativas en *B. subtilis*.

Capítulo 2. Efectos de la alteración del sitio de unión de la proteína Hpr en *aprE*.

- Se conoce que Hpr tiene cuatro sitios de unión en *aprE* (Kallio *et al.*, 1991), no obstante en este trabajo demostramos que Hpr parece no necesitar ninguno de esos sitios de unión. Hipótesis que surgió debido a

que ni la cepa BB80-204 ni BB80-244 con el fondo genético *hpr*, alteraron la expresión de la fusión *aprE-lacZ*. Estos resultados están de acuerdo con las observaciones hechas por Olmos *et al.*, (1996) y Henner *et al.*, (1988b).

Capítulo 3.- Nuevo sitio de unión para SinR.

- El gene *aprE* tiene dos sitios de unión para SinR, uno es el sitio doble SB1A, SB1B reportado por Gaur 1991 y otro es el sitio encontrado en este proyecto entre la base +9 y +32, lo que incrementa la posibilidad de que SinR funcione por medio de la formación de un doblez del DNA, reprimiendo la expresión y a la vez estabilizando el complejo transcripcional.
- SinR ejerce parte de su efecto aun estando presente la mitad de su sitio de unión sugiriendo que se une en forma dimérica en este sitio y no en forma tetramérica como indica la literatura antes de Cervin, 1998.
- SinR está en equilibrio entre ser activador y represor. Cuando se encuentra solo SB1-B se favorece la forma de represor ya que la proteína SinR se une a los dos sitios en *aprE* creando un doblez con el DNA involucrado, sin liberarse la represión para lo que parece ser indispensable SB1-A.
- Sabemos que en una mutación *sinR* nula la expresión de *aprE* disminuye un 50% y que las proteasas minoritarias aumentan (Olmos *et al.* 1997).

La proteasa minoritaria NprB, detectada por el programa Regulon DB, podría ser la causante del efecto que se le atribuye a *aprE*.

- Spo0A es uno de los reguladores más importantes del estado de transición y se sabe que es regulada por SinR (Mandic-Mulec *et al.* 1995), Sin embargo no había sido reportado que DegU, otro regulador importante de este estado, estuviera regulado por SinR.
- Los efectos producidos por una mutación nula de SinR y DegU32(Hy) son similares (Olmos *et al.* 1996), lo que sugiere un efecto represivo de SinR sobre la expresión de *degU*. Es decir, cuando SinR no está reprimiendo la expresión de *degU* se presenta una producción excesiva de esta proteína que genera efectos similares que un mutante DegU32 (Hy).

Capítulo 4.- Sistema de DHB basado en LexA.

- Los resultados del análisis de Interacción proteína-proteína, permitieron conocer que:
 - a) SinR, SinI, Hpr, AbrB, DegU y Spo0A forman homodímeros.
 - b) SinR interacciona con Hpr formando heterodímeros al igual que con SinI.
 - c) SinR, SinI y Hpr no interaccionan directamente con DegU, Spo0A o AbrB.

Modelo de regulación de *aprE* sugerido basándose en los resultados experimentales. El sitio donde se encuentra SinR2, es el sitio de +9 a + 32 pb por el que sugerimos que SinR tiene alta afinidad en forma de dímero.

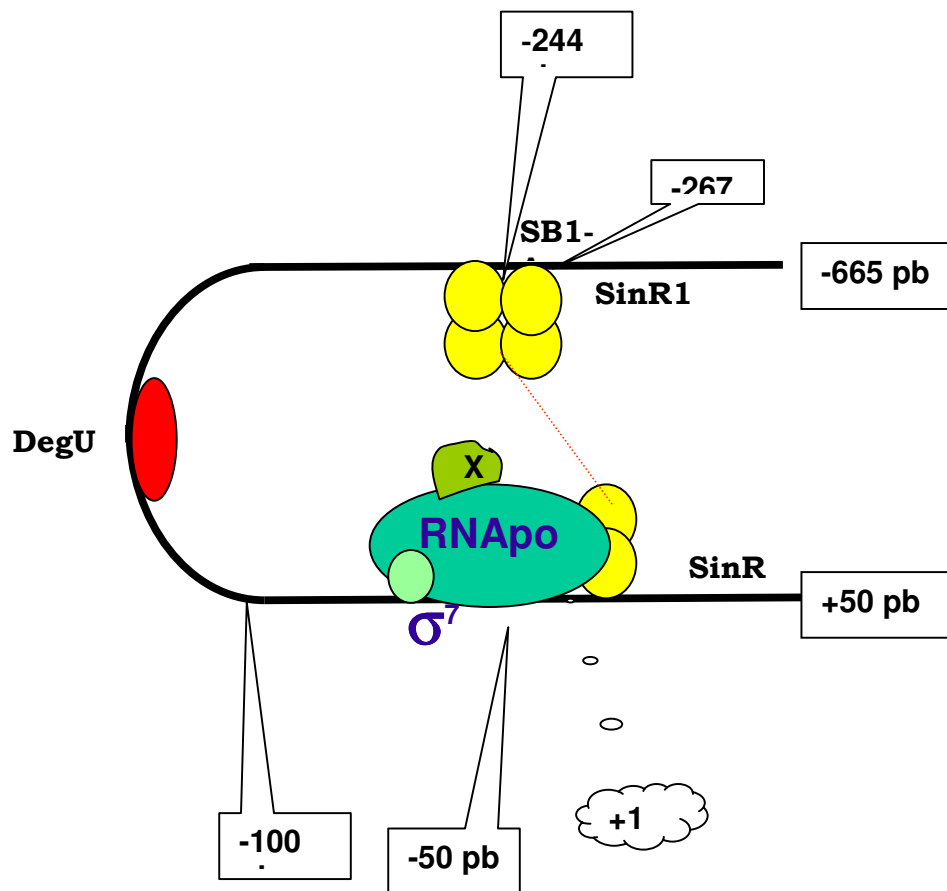


Figura 29. En esta figura presentamos nuestra propuesta de modelo de regulación, tratando de descifrar el mecanismo de acción de SinR, basándonos en los efectos que esta ejerce sobre *aprE*. La línea negra gruesa representa al DNA fragmento de +50 a -665 pb correspondiente a la región reguladora de *aprE*. Se muestran los pares de bases (pb), la RNA polimerasa, el factor sigma 70, la proteína DegU y una proteína "X" que sugerimos apoya al complejo transcripcional para la adecuada transcripción del gene. Se muestra la proteína reguladora SinR (1) en el sitio reportado en la literatura; (2) el nuevo sitio sugerido en este trabajo como sitio de alta afinidad para un dímero de SinR. Por

último se esquematiza con líneas punteadas la propuesta de que SinR a pesar de estar en sitios distales podría estar induciendo un doblamiento y estabilizando

XXIV. Perspectivas

- Se deben realizar estudios para descifrar el papel que juegan los distintos motivos estructurales, que parecen ser los causantes de que SinR sea un represor o un coactivador.
- Determinar si el sitio SB1-A es requerido para SinR u otra proteína.
- Se debe de seguir utilizando el sistema de DHB basado en LexA para analizar interacción proteína-proteína entre otras proteínas reguladoras de *B. subtilis* y utilizar una biblioteca genómica para observar con que otras proteínas interacciona SinR.
- Utilizar las herramientas Bioinformáticas actuales para explotar la información de la literatura acerca de este y muchos otros modelos de regulación que aun no han sido completamente esclarecidos.
- Verificar por experimentos *in-vivo*, si es cierto que SinR regula a los genes detectados con el RegulonDB.

BIBLIOGRAFÍA

1. Albert, B. 1989. How cells are studied cap. 4. In: Molecular Biology of the cell. Robertson M. (eds). Garland Publishing, inc. New York, N.Y. EUA. pág. (1218-1228).
2. Anagnostopoulos, C. y J. Spizizen. 1961. Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 81(741):1630-1633 p.
3. Ausubel, F.M., R. Brent., R.E. Kingston., D.D. Moore., J.G. Seidman., J.A. Smith y K. Struhl. 1992. Current Protocols in Molecular Biology. Greene Publishing & Wiley-Interscience, New York 12(8):1724-1728 p.
4. Bai, U., I. Mandic-Mulec y I. Smith. 1993. SinI modulates the activity of SinR, a developmental switch protein of *Bacillus subtilis*, by protein-protein interaction. Gen & Dev. 7:139-148 p.
5. Cervin, M.A., R.J. Lewis, J.A. Brannigan y G.B. Spiegelman. 1998. The regulator of *B. subtilis* SinR inhibits the *spollG* promoter's transcription in vitro without displacing to the RNA polimerasa. Nucleic Acids Research. 26:12-16 p.
6. Cutting, S.M. y P.B. Vander Horn. 1990. Genetic Analysis in: Molecular Biological Methods for *Bacillus*. (Ed) Colin R. Harwood. Department of Microbiology. Harvard University, USA. 5:27-74 p.
7. Dayle. A.D. y R.P. Silver. 2000. Evidence for Multimerization of Neu Proteins Involved in Polysialic Acid Synthesis in *Escherichia coli* K1 Using Improved LexA-Based Vectors. J. Bacteriol, 182(18) :5267-5270 p.
8. Dmitrova, M., G. Younes-Cauet., P. Oertel-Buchheit., D. Porte, M. Schnarr y M. Granger-Schnarr. 1998. A New LexA-based genetic system for monitoring and analyzing protein heterodimerization in *Escherichia coli*. Mol Gen Genet 257:205-212 p.
9. Falconi, M., V. McGovern., C. Gualerzi., D. Hillyard y N.P. Higgins. 1992. Mutations altering chromosomal H-NS induce mini-Mu transposition. New Biol. 3(6):615-25 p.
10. Ferrari, E., D.J. Henner, M. Perego y J.A. Hoch. 1988. Transcription of *Bacillus subtilis* subtilisin and expression of subtilisin in sporulation mutants. J Bacteriol. Jan;170(1):289-95 p.
11. Ferrari, E., S.M. Howard S.M. y J.A. Hoch. 1986. Effect of stage 0 mutations on subtilisin expression. J. Bacteriol. 166(4):173-179 p.
12. Ferrari, E., S.M. Howard y J.A. Hoch. 1985. Effect of sporulation mutations on subtilisin expression, assayed using a subtilisin- β -galactosidase gene fusion. In: JA Hoch y P Setlow (Eds), Molecular biology of microbial differentiation, Am. Soc. Microbiol., Washington, DC. 9(10):180-184 p.
13. Fields, S. y O. Song. 1989. A Novel System to detect protein-protein interactions. Nature, Jul 20; 340(6230):245-6 p.

14. Garente Leonard. 1993. Estrategias para identificar proteínas que interactúan. Depto. de Biología, Instituto de Tecnología de Massachusetts, Cambridge, MA 02139. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:1639-1641 p.
15. Gaur, N.K., J. Oppenheim y I. Smith. 1991. The *Bacillus subtilis sin* gene, a regulator of Alternate Developmental Processes, Codes for a DNA-Binding Protein. J. Bacteriol, 13:678-686 p.
16. Gaur, N.K., K. Cabane y I. Smith. 1988. Structure and Expression of the *Bacillus subtilis sin* Operón. J. Bacteriol. 3:1046-1053 p.
17. Gaur, N.K., E. Dubnau y I. Smith. 1986. Characterization of a cloned *Bacillus subtilis* Gene That Inhibits Sporulation in Multiple Copies. J. Bacteriol. 168:860-869 p.
18. Goldstein, J.I. 1981. Scanning electron microscopy and X-Ray Microanalysis. 2da ed. Plenum Press, New York, USA. 673 pp.
19. Harper, J.W., G.R. Adami., N. Wei., K. Keyomarsi y S.J. Elledge. 1993. The p21 Cdk-Interacting Protein Cip1 Is a Potent Inhibitor of G1 Cyclin-Dependent Kinases. Cell. 75:805-816 p.
20. Higgins, M.L. y P.J. Piggot. 1992. Septal membrane fusion- a pivotal event in bacterial spore formation ?. Mol. Microbiol. 18:2565-2571 p.
21. Henner, D.J., E. Ferrari., M. Perego y J.A. Hoch. 1988. Location of the Targets of the *hpr-97*, *sacU32(Hy)*, and *sacQ36(Hy)* Mutations in Upstream Regions of the Subtilisin Promoter. J. Bacteriol. 170:296-300 p.
22. Hobot, J.A. y R. Newman. 1989. Electron Microscopy for Bacterial cells. In: Molecular Biological Methods for *Bacillus*. CR Harwood (eds). Wiley & Sons. New York, NY U.S.A. 581 pp.
23. Huo, L., K.J. Martín y R. Schleif. 1998. Alternative DNA loops regulates you the arabinose operon in *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci OR S AT Aug;85(15):5444-8 p.
24. Ishihama, A. 1988. Promoter selectivity of prokaryotic RNA polymerases. TIG. 4:282-286 p.
25. Jhonston, S.A. y J.E. Hooper. 1982. Isolation of the Yeast regulatory gene GAL4 and analysis of its dosage effects on the galactose/melibiose regulon. *in*: Molecular cell Biology 3rd edition. Harvey Lodish et al. (eds). Freeman and Company, N. Y. 1995. 445-447 pp.
26. Kallio, P.T., J.E. Fagelson., J.A. Hoch y M.A. Strauch. 1991. The transition state regulator Hpr of *B. subtilis* is a DNA-binding protein. J. Biol. Chem. 266(20):13411-13417 p.
27. Karimova, G., Ullman, A. y D. Ladant. 2000. A bacterial two-hybrid sistem that exploits a cAMP signaling cascade in *Escherichia coli*. Methods Enzimol. 328:59-73 p
28. Karimova, G., A. Ullman y D. Ladant. 2001. Protein-protein interaction between *Bacillus stearotermiphilus* tyrosyl-tRNA synthetase subdomains revealed by a bacterial two-hybrid system. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. (in Press).

29. Karimova, G., J. Pidoux., A. Ullman y D. Ladant. 1998. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:5752-5756 p.
30. Kunst, F., M. Pascal., J. Lepesant-Kejzlarova., J.A. Lepesant, T.O. Billault y R. Dedonder. 1974. Purification and some properties of an endocellular sucrose from a constitutive mutant of *B. subtilis* Marburg 168. Eur. J. Biochem. 42(2):611-620 p.
31. Kunst, F., M. Debarboullie., T. Msadek., M. Young., C. Mael., D. Karamata., A. Klier., G. Rapoport y R. Dedonder. 1988. Deduced polypeptides encoded by the *B. subtilis* *sacU* locus share homology with two-component sensor-regulator systems. J. Bacteriol. 170(11):5093-5101 p.
32. Kunst, F. 1997. The complete genome sequence of the Gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. Nature. 390:249-256 p.
33. Ladant, D. y A. Ullman 1999. *Bordetella pertussis* adenylate cyclase: a toxin with multiple talents. Trends Microbiol. 7:172-176 p.
34. Lamb, P. y S.L. Mcknight. 1991. Diversity and specificity in transcriptional regulation: the benefits of the heterotypic dimerization. TIBS. 16:417:422 p.
35. Lee, D.H. y R.F. Schleif. 1989. In vivo DNA loops in *araCBAD*: size limits and helical repeat. Proc Natl Acad Sci. USA. Jan; 86(2):476-80 p.
36. Lejeune, P. y A. Danchin. 1990. Mutations in the *bgIY* gene increase the frequency of spontaneous deletions in *E. coli* K-12. Proc Natl Acad Sci. USA. Jan; 87(1):360-3 p.
37. Lewis, R.J., J.A. Brannigan, I. Smith y A.J. Wilkinson. 1996. Crystallization of the *B. subtilis* sporulation inhibitor SinR, complexed with its antagonist, SinI. FEBS Letters 378:98-100 p.
38. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough., A.L. Farr y R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275 p.
39. Mandic-Mulec I, L. Doukhan y I. Smith. 1995. The *Bacillus subtilis* SinR Protein Is a Repressor of the Key Sporulation Gene *spoOA*. J. Bacteriol., 19:4619-4627 p.
40. Mandic-Mulec I, N.K. Gaur., U. Bai y I. Smith. 1992. Sin, a Stage-Specific Repressor of Cellular Differentiation. J. Bacteriol. 3:3561-3569 p.
41. Martzen, M.R., S.M. Mc Craith., S.L. Spinelli, F.M. Torres., S. Fields, E.J. Graghack y E.M. Phizicky. 1999. A biochemical genomics approach for identifying genes by the activity of their products. Science. 1999 Nov 5; 286(5442):1153-5 p.
42. Midgley, C.A. y D.P. Lane. 1993. Búsqueda de interacciones proteína-proteína. Nucleic Acids Res. 1993 Jul 11;21(14):3167-74 p.
43. Msadek, T., F. Kunst., D. Henner., A. Klier., G. Rapoport y R. Dedonder. 1990. Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in *B. subtilis* expression of the regulatory genes

and analysis of mutations in *degS* and *degU*. J. Bacteriol. 172(2):824-834 p.

44. Miller, J.H. 1992. A short course in bacterial genetics. Cold Spring harbor laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 6(4):123-129 p.
45. Olmos, J., A. Sanchez y R. De Anda. 1998. Regulation of the *aprE* (Subtilisin) gene in *abrB* mutant of *Bacillus subtilis*. Asian Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology. 6(22):97-103 p.
46. Olmos, J., R. De Anda., E. Ferrari., F. Bolivar y F Valle. 1997. Effects of the *sinR* and *degU32* (Hy) mutations on the regulation of the *aprE* gene in *Bacillus subtilis*. Mol. Gen. Genet. 253:562-567 p.
47. Olmos, J., V. Bolaños., S. Causey., E. Ferrari., F. Bolivar y F. Valle. 1996. A functional SpoOA is required for maximal *aprE* expression in *Bacillus subtilis*. FEBS Letters 381:29-31 p.
48. Owens-Hughes. 1992. The cromatin-associated protein H-NS interacts with curved DNA to influence DNS topology and gene expression. Cell. 71:255-265 p.
49. Pasher, D.C., V.K. Eckenrope., W.W. Ward., F.G. Prendergast y M.J. Cormier. 1992. Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. Gene. 111:229-233 p.
50. Pruss, G.J. y K. Drlica. 1989. DNA supercoiling and prokaryotic transcription Cell. 56:521-523 p.
51. Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press., Cold Spring Harbor, New York. 556 pp.
52. Schaeffer, P., J. Millet y J.P. Aubert. 1965. Catabolic repression of bacterial sporulation. Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A. 54(3):704-11 p.
53. Schena, M., D. Salón., R.W. Davis y P.O. Brown. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science. Oct 20;270(5235):467-70 p.
54. Scott, D.J., S. Leejeerajumnean., J.A. Brannigan., J.R. Lewis., A.J. Wilkinson y J.G. Hoggett. 1999. Quaternary re-arrangement Analysed by spectral enhancement: The interaction of a sporulation Repressor with its antagonist. Journal of Molecular Microbiology 12:293(5):997-1004 p.
55. Sekigushi, J., B. Ezaki., K. Kodama Y T. Akamatsu. 1988. Molecular cloning of a gene affecting the autolysin level and flagellation in *B. subtilis*. J. Gen. Microbiol. 134:1611-1621 p.
56. Smith, I., I. Mandic-Mulec y N.K. Gaur. 1991. The Role of negative control in sporulation. Res. Microbiol., 142:831-839 p.
57. Stanley Fields y Ok-kyu Song. 1989. Nuevo sistema genetico para detectar las interacciones proteína-proteína. NATURE. 340:245-246 p.
58. Strauch, M.A., M. Perego., D. Burbulys y J.A. Hoch. 1989. The transition state transcription regulator *AbrB* of *Bacillus subtilis* is autoregulated during vegetative growth. Mol. Microbiol. 3:1203-1209 p.
59. Strauch, M.A. y J.A. Hoch. 1995. Control of Postexponential Gene Expression by Transition State Regulators. In HR Doi, M McGloughlin

- (eds) *Biology of Bacilli: applications to industry*. Butterworth-Heineman, Boston. 105-121 p.
60. Ullman, A. y A. Danchin. 1983. Role of cyclic AMP in Bacteria. In P. Greengard and G.A. Robinson (Ed.), *Advances in cyclic nucleotide Research*. Raven Press, New York. 1-44 p.
 61. Uetz, P. y R.E. Hughes. 2000. Systematic and large-scale two-hybrid screens. *Curr Opin Microbiol.* Jun;3(3):303-8 p.
 62. Valle, F. y E. Ferrari. 1989. Subtilisin: a redundantly temporally regulated gene. In: I Smith, AR Slepecky, P Setlow (eds) *Regulation of prokaryotic development*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.131-146 p.
 63. Vidal, M. y P. Legrain. 1999. Sistema de dos-híbridos hacia adelante y reverso en la levadura. *Nucl. Ac. Res.* 27(4)919-929 p.

ANEXOS

ANEXO No. 1

Columnas de cromatografía, utilizando jeringas de Insulina, para purificar ADN.

1. Se utilizaron jeringas para insulina (capacidad 1 ml).
2. Fijar estas jeringas se en un soporte universal, con pinzas para soporte.
3. En un vaso agregar 1 gramo de Sephadex 50 y agregar 40 ml de agua destilada, estéril y filtrada, para activar la resina.
4. Después de activar la resina (esto puede llevar de 2 a 12 horas).
5. Proceder a empacar la columna, agregando pequeñas cantidades de la resina activada con una pipeta Pasteur.
6. Se debe lograr un relleno homogéneo, lento para evitar la formación de burbujas.
7. Nunca se debe dejar secar la resina, siempre mantenerla con agua.
8. Una vez empacada la columna se debe de estandarizar un volumen de desplazamiento.
9. En este trabajo el volumen de desplazamiento fue de 700 ul, es decir, al agregar 700 ul de agua, desplazaran 700 ul contenidos en la columna.
10. Al agregar el primer volumen con la muestra, nuestra muestra quedara en la columna y saldrá un volumen igual pero de agua.
11. Al agregar un segundo, tercer o cuarto volumen, la muestra de interés saldrá, logrando salir primero las moléculas de mayor tamaño. Ver figura.

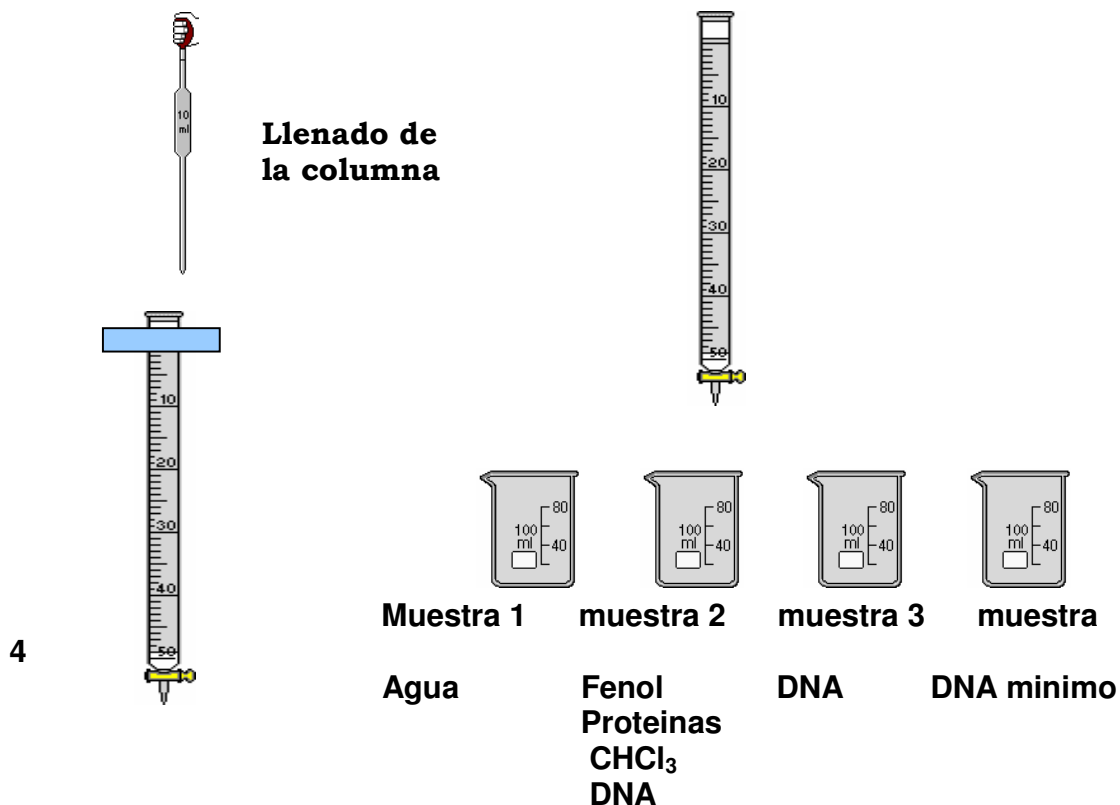


FIGURA 30. COLUMNAS CON SEPHADEX 50.

ANEXO No. 2

DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD DE β -GALACTOSIDASA (METODO DE MILLER)

Preparar las siguientes soluciones:

- LISOZIMA 10 mg/ml. Disolver 10 mg de lisozima en 1 ml de agua destilada y mantenerla en hielo. Preparar la solución el día del ensayo.
- ONPG 4.5 mg/ml. Disolver 45 mg de ONPG (O-nitrofenil- β -D-galactósido) en 10 ml de agua destilada. Preparar la solución el día del ensayo. Mantener en hielo.

- Na_2CO_3 1.2 M. Disolver 12.72 g de Na_2CO_3 en 100 ml de agua destilada.
- TRITON X-100 al 10%. Solución 10% v/v de tritón en agua destilada.

Concentración	Sol. Patrón		ml de sol. patrón para:	
	M	50 ml	25 ml	Final
AMORTIGUADOR Z				
$\text{Na}_2\text{HPO}_4^*$	0.5	6.0 ml	3.0 ml	0.06 M
$\text{NaH}_2\text{PO}_4^*$	0.5	4.0 ml	2.0 ml	0.04 M
Kcl *	1.0	0.5 ml	0.25 ml	0.01 M
MgSO_4^*	1.0	50 μl	25 μl	0.001 M
β -Mercaptoetanol	14.33	175 μl	87.5 μl	0.05 M

* Preparar solución de 25 ml y esterilizar.

PROCEDIMIENTO:

1. Tomar una muestra de 1 ml de caldo de fermentación en un tubo ependorf de 1.5 ml. Centrifugar por 5 min a 12 000 rpm. Recuperar el paquete celular y congelar en hielo seco. Almacenar a -20°C .
2. Resuspender el paquete celular en 1 ml de amortiguador Z (en el caso de *Bacillus subtilis* las células pueden ser resuspendidas en agua destilada). Mantener en hielo.

3. Tomar 20 μl de muestra ó de la dilución correspondiente de la muestra y agregar 710 μl de amortiguador Z. Al mismo tiempo, preparar un blanco que contenga 730 μl de amortiguador Z y procesarlo junto con las muestras.
4. Agregar 10 μl de la solución de lisozima e incubar los tubos 5 min a 37°C.
5. Adicionar 10 μl de la solución de Tritón al 10%.
6. Agregar 100 μl de la solución de ONPG y cronometrar el tiempo de inicio de la reacción.
7. Transferir los tubos inmediatamente a un baño de agua a 28°C por exáctamente 15 min.
8. Adicionar 150 μl de la solución de Na_2CO_3 para detener la reaccióny agitar.
9. Leer la absorbancia a 420 nm contra el blanco.

Formula:

$$\frac{\text{Unidades de } \beta\text{-gal}}{\text{mg de proteína}} = A_E = \frac{\text{D.O.}_{420} \times E=380 \times 1000 \mu\text{l} \times \text{Dilución}}{\text{Alicuota } \mu\text{l} \times 15 \times \text{mg proteína.}}$$

ANEXO NO. 3

DIGESTIÓN CON ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Preparación de la reacción:

DNA _{PCR}	5.0 μl
Enzima 10 U/ μl	0.5 μl
Buffer	3.0 μl
H ₂ O dd	<u>21.5 μl</u>

30.0 μ l

NOTA: Dependiendo de la endonucleasa de restricción con la cual se desea trabajar, se utilizará el buffer de reacción, así como la determinación del tiempo y la temperatura óptima. Ejemplo: Enzima: *BstU1*

Secuencia de corte: 5' ... CG CG... 3'

3' ... GC GC ...5'

Temperatura: 60⁰C Tiempo: 2 hr

ANEXO No. 4.

LIGACION.

PROCEDIMIENTO:

1. Primeramente se deben obtener un vector o plásmido con sitios únicos de restricción para una o dos enzimas específicas y con secuencia bien caracterizada. También se debe de obtener el fragmento que se va a insertar digerido con las mismas enzimas de restricción elegidas para el vector. Tanto el vector como el fragmento a insertar deben estar con la máxima pureza posible, libre de sales, proteínas o solventes. (La pureza de estos es la clave para una buena ligación).

2. Una vez digeridos y purificados se utiliza la siguiente receta:

vector digerido 0.5 mg/ μ l..... 10 μ l

fragmento digerido 0.5 mg/ μ l..... 30 μ l

buffer para ligasa 10X..... 5 μ l
BSA (albumina suero bovino)....0.3 μ l
Agua dd filtrada.....cbp 50 μ l
Enzima ligasa 10U/ μ l..... 1.0 μ l

3. Antes de agregar la enzima dejar 5 minutos a 4°C (en hielo) y mezclar con delicadeza.
4. Si las enzimas de restricción utilizadas al digerir generan extremos cohesivos se coloca esta mezcla a 16°C por 8 horas o a 4°C por 12 horas.
5. Pasado el tiempo de reacción desactivar la enzima de la siguiente manera: incubar a 65°C por 10 minutos, transferir a 4°C por 5 minutos, dar vortex y centrifugar por 5 minutos.
6. Posteriormente Utilizar 10-20 μ l del producto para Transformar.

ANEXO No. 5

PREPARACIÓN DE REACTIVOS, ANTIBIOTICOS Y MEDIOS DE CULTIVO.

Ampicilina¹⁰⁰

Preparar un stock de 100 mg/ml, pesar 0.1 g de ampicilina y disolverla en 1 ml de H₂O dd, almacenar a -20⁰C. Adicionar 100 µl a 100 ml de medio sólido LB para obtener cajas de LB-ampicilina 100 µg/ml.

Buffer TBE 1X, pH 8:

Trizma base 43.2 g
Acido bórico 22.0 g
EDTA 3.68 g
H₂O dd c.b.p. 4 L

Almacenar a 4⁰C.

Buffer Tris-Cl/SDS, pH: 6.8

A 40 ml de H₂O dd adicionar: 6.05 g de Tris base (0.5 M Tris.Cl, final), 0.4 g SDS (0.4% final), ajustar el pH a 6.8 con HCl 1N. Adiconar H₂O dd hasta 100 ml. Filtrar la solución a traves de filtros de 0.45 µm y almacenar a 4⁰C.

Buffer tris-Cl/SDS, pH 8.8

A 300 ml de H₂O dd adicionar: 91 g de Tris base (1.5 M Tris.Cl, final), 2 g de SDS (0.4% SDS, final) ajustar a pH 8.8 con HCl 1N, adicionar H₂O dd hasta 500 ml. Filtrar la solución a traves de filtros de 0.45 µm y almacenar a 4⁰C.

Cloranfenicol ⁵⁰

Preparar un stock de 50 mg/ml, pesar 0.05 g de cloranfenicol y disolverlo en 1 ml de H₂O dd, almacenar a –20°C. Adicionar 50 µl a 50 ml de medio sólido LB para obtener cajas de LB-cloranfenicol 50 µg/ml.

IPTG

Stock de 10 mg/ml del sustrato isopropil-1-tio-β-D-galactosido (IPTG) disuelto en 1 ml de H₂O dd estéril, se almacena a –20°C. Se utiliza 10 µl por cada 20 µl de medio Luria-Bertani (LB).

Medios de cultivo

Luria-Bertani (LB-Xgal): El gene que codifica para la B-galactosidasa es positivamente controlado por el complejo AMPc/CAP. Las Bacterias que presenten interacción entre proteínas híbridas formarán colonias azules en medio LB (Miller *et al.*, 1992), en presencia de sustrato cromogénico X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolyl-B-D-galactopiranosido, 40 ug/ml). Se puede agregar IPTG 0.5 mM para incrementar la expresión de B-galactosidasa.

Los antibióticos se agregan en las mismas concentraciones que el medio Maconckey.

Utilizando este medio LB , la complementación funcional puede ser detectada en 20-72 hrs a 30-37°C. Se debe de evitar la sobrepoblación de colonias en la

caja (máximo 300-500 colonias por caja) para una fácil detección. En una incubación prolongada (4 o 5 días), las colonias negativas presentaran un color rojo tenue (en MacConkey Maltosa) o una mancha azul en el centro (LB-Xgal) pero estarán decoloradas en la periferia.

MacConkey: *E. coli* cya- no puede fermentar lactosa o maltosa (Ullman *et al.*, 1983) y forma colonias blancas (rosadas) en MacConkey con lactosa o maltosa. Si el fenotipo es Cya+ se presentan colonias rojas, resultado de la fermentación de azúcares que provoca la acidificación del medio y un cambio de color del colorante rojo de fenol (Miller *et al.*, 1992). La maltosa es el azúcar mas recomendado para este medio. Y se recomienda la marca Gifco del medio. (40 g de MacConkey en 1 Lt de agua estéril). Una solución madre de maltosa libre de glucosa (a 20% en agua) es esterilizada por filtración y se utiliza una cantidad que lleve a una concentración final de 1%. Los antibióticos ampicilina 100 ug/ml y Kanamicina 50 ug/ml se agregan al medio justo antes de vaciar el medio en cajas petri (Miller *et al.*, 1992). Se puede agregar IPTG 0.5mM para inducir la expresión completa de las proteínas híbridas.

Medio sintético: Ya que las células Cya+ son Lac+ (Mal+), son capaces de crecer en medio suplementado con lactosa (o maltosa) como únicas fuentes de carbono (Ullman *et al.*, 1983; Miller *et al.*, 1992). Lactosa es el azúcar mas apropiado para el medio M63.

Medio M63:

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g
- KH_2PO_4 13.6 g
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$0.5 mg
- Agar..... 15 g
- Agua cbp..... 1 Lt.

Ajustar pH a 7.0 con KOH). Después de esterilizar, adicionar 1ml de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1M, 15ml de lactosa 20%, 2ml de vitamina B1 (tiamina) 0.05%, y los antibióticos correspondientes (ampicilina 50ug/ml; kanamicina 25 ug/ml). El crecimiento de colonias Lac+ puede detectarse después de 4-8 días de incubación a 30-37°C. Se puede agregar IPTG y X-gal.

X-Gal

Stock de 20 mg/ml del sustrato 5-Br-4-Cl-3-indolil- β -D- galactosido (X-Gal) disuelto en 1 ml de N-N'-dimetilformamida, se almacena a -20°C . Se utilizan 40 μl del stock para 20 ml de medio Luria-Bertani (LB).

ANEXO No. 6

PURIFICACIÓN DE DNA CROMOSOMAL DE BACTERIAS.

CRECIMIENTO. Inocular 4 ml de medio Luria (LB) con la cepa de interés. Crecer en condiciones apropiadas para esa cepa (antibiótico, temperatura,

agitación, etc.), hasta que el cultivo llegue a fase estacionaria. Esto puede llevarse desde varias horas, hasta varios días, dependiendo de la velocidad de crecimiento de las células. En este caso se utilizará un cultivo líquido saturado de *Bacillus subtilis* (Nota: el medio de cultivo, las condiciones apropiadas y el tiempo en que tarda en llegar a fase estacionaria van a variar de acuerdo a la especie de bacteria que se trabaje).

Centrifugar 1.5 ml del cultivo en una microcentrifuga a 12,000 r.p.m. durante 3 min hasta que se forme un pellet compacto. Eliminar el sobrenadante.

LISIS, EXTRACCIÓN Y PRECIPITACIÓN DEL DNA

1. Resuspender el pellet en 567 μ l de buffer TE. Agregar 5 μ l de lisozima e incubar a 37⁰C, a los 10 min agregar 10 μ l de RNAasa, e incubar por 20 min. Adicionar 30 μ l de SDS y 3 μ l de proteinasa K para obtener una concentración final de 100 μ g/ml de proteinasa K y de 0.5% de SDS (después de agregar el SDS, ya no se aplica vortex solo mezclado). Incubar 1 h a 37⁰C. (Las concentraciones adicionales de lisozima pueden incrementarse, si no se observa lisis de las células en la concentración propuesta).NOTA: La solución debe tornarse translúcida.
2. Adicionar 100 μ l de NaCl 5M y mezclar.

NOTA: Este paso es muy importante, ya que se formará precipitado de ácido nucléico-CTAB si la concentración de sal disminuye por debajo de 0.5 M a temperatura ambiente. El propósito es remover residuos de la pared celular,

proteína desnaturalizada y polisacáridos acomplejados con el CTAB, mientras el DNA cromosomal se mantiene soluble en el sobrenadante.

3. Agregar 80 μ l de CTAB/NaCl. Mezclar e incubar 10 min a 65⁰C. (Tapar bién los tubos con papel parafilm y la tapa de seguridad).
4. Agregar 0.7 ml de cloroformo/alcohol isoamílico, agitar y centrifugar 5 min. NOTA: Esta extracción remueve los complejos proteína-CTAB/polisacáridos. Una interfase blanca debe ser visible después de la centrifugación.
5. Transferir el sobrenadante acuoso-viscoso a un tubo nuevo de 1.5 ml para microcentrifuga, dejando atrás la interfase (si es muy gruesa la interfase, repetir el paso 6). Agregar un volúmen igual de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico, agitar y centrifugar 5 min.
6. Transferir el sobrenadante (600 μ l) a un tubo nuevo. Agregar 0.6 volúmenes de isopropanol (360 μ l) para precipitar los ácidos nucleicos (No hay necesidad de agregar sal, ya que la concentración de NaCl es alta). Agitar el tubo y centrifugar 10 min. Decantar el sobrenadante con cuidado y pegando el tubo a la pared de un recipiente. Lavar con 1 ml de etanol al 70%. Centrifugar 5 min y decantar el sobrenadante suavemente. Secar en el Vacufuge TM, 10 min, en fase alcohol, temperatura de 30⁰C.

NOTA: Si no se forma ningún precipitado de DNA en el paso anterior, esto implica que el DNA se ha dividido en fragmentos relativamente pequeños y por lo tanto, hay que repetir todo el procedimiento.

Disolver el pellet en 100 μ l de buffer TE. Guardar a -20°C . Verificar en gel de agarosa al 1.2% utilizando 5 μ l de DNA resuspendido. Si presenta un exeso de RNA, adicionarle nuevamente RNAasa e incubar a 37°C por 20 min.

NOTA: Utilizar de 5 a 10 μ l para cada reacción de PCR y/o de Transformación.

ANEXO No. 7

PURIFICACIÓN DE DNA PLASMÍDICO.

1. Inocular 3 ml de LB con las células transformadas con el vector de interés (plásmido) y crecer hasta fase estacionaria ~ de 6-8 horas.
2. Transferir 1 ml del cultivo a tubos de microcentrifuga de 1.5 ml y centrifugar 0.5 min a 12,000 rpm.
3. Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet celular en 1 ml de buffer SET.
4. Centrifugar las células por 1 min, desechar sobrenadante y resuspender en 150 μ l de buffer SET. Agregar 5 μ l de lisozima e incubar a 37°C por 10 min.
5. Agregar 5 μ l de buffer de RNAasa y agitar. Adicionar 350 μ l de mezcla lítica y mezclar.
6. Incubar 10 min en baño de hielo.
7. Agregar 250 μ l de buffer de acetato de sodio e invertir el tubo varias veces. Incubar en hielo por 30 min. En este paso precipitará el SDS y el DNA cromosomal desnaturalizado.

8. Centrifugar la solución a temperatura ambiente durante 8 min y transferir 700 μ l del sobrenadante a un tubo de 1.5 ml limpio.
9. Adicionar un volúmen equivalente de isopropanol, invertir los tubos varias veces y centrifugar 5 min a temperatura ambiente. Eliminar el sobrenadante y colocar los tubos de manera invertida en una servi-toalla durante 5 min.
10. Lavar el pellet de DNA adicionando 1 ml de etanol al 70%. Centrifugar 5 min a temperatura ambiente. Desechar el etanol y colocar los tubos de nuevo sobre la servi-toalla durante 5 min. Secar los tubos en el Vacufuge™ durante 10 min a 30°C en fase alcohol.
11. Resuspender en 40 μ l de buffer TE.
12. Verificar en gel de agarosa al 1.2% utilizando 5 μ l de DNA resuspendido.

ANEXO No. 8

Purificación por filtración en Centricones.

Se utilizaron Centricones Millipore YM-100

1. Agregar la muestra, centrigue por 5 Minutos.
2. Descartar el volumen filtrado.



3. Colocar el vial de retencion e invierta el Centricon. Aplicar vortex ligero.
4. Centrifugar por 5 minutos y el DNA quedara en el vial de retención.
5. Almacenar o usar según su caso.

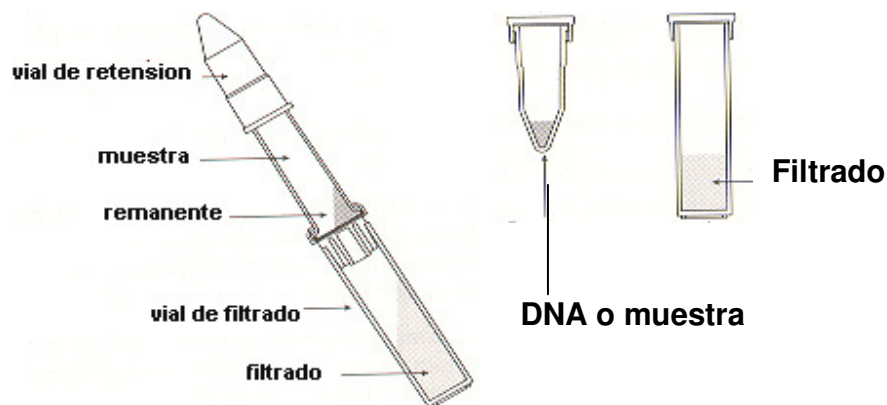


Figura 31. Centricón.

ANEXO No. 9

Purificación por la técnica de fenol cloroformo de gel de agarosa.

1. Cortar la banda de ADN con una navaja teniendo cuidado de no rallar la lampara de UV.
2. Colocar el fragmento cortado en un tubo eppendorf de 1.5 ml y colocar en hielo seco por 15 segundos, retirar el tubo del hielo seco y machacar con un pistilo. (repetir este paso mínimo 3 veces).

3. Agregar 100 ul de fenol y dar vortex, 100 ul de cloroformo y dar vortex.
4. Centrifugar por 5 minutos a 14,000 r.p.m. y transfiera la fase acuosa superior a otro tubo limpio.
5. Agregar 1/25 volúmenes de cloruro de sodio 5M y 2 ½ volúmenes de etanol absoluto. Agitar.
6. Precipitar el contenido en hielo seco por 1 hora.
7. Centrifugar 15 minutos y decantar sobrenadante.
8. Agregar 1 ml de etanol 70%, dar vortex y centrifuge por 5 minutos.
9. Decantar sobrenadante, secar el DNA que quedo en el tubo.
10. Resuspender en agua o en buffer bajo en sales hasta lograr la concentración adecuada.

ANEXO NO. 10

REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Reacción:

Se realizo en un termociclador GeneE (TEHNE, INC., 1996 New Yersey, USA), en un tubo eppendorf de 500 ul, especial para PCR (tapa plana), con la siguiente reacción:

DNA molde (300 µg/ml).....5 ul.

DNTPs (10mM).....1 ul.

Oligo 1(200ng/μl).....1 ul.
 Oligo 2 (200ng/μl).....1 ul.
 Amortiguador 10X para PCR.....5 ul.
 Enzima taq DNA Polimerasa (10U/μl).....0.25 ul.
 Agua, destilada, estéril.....36.75 ul.

TOTAL= 50.00 ul.

Tabla XIX. Programación del termociclador (PCR):

Programa del termociclador	Ciclos	Temperatura	tiempo
1	1	95°C	10 minutos
2	25	95°C	1 minuto
	25	55°C (Tm)	1 minuto
	25	72°C	2 minutos
3	1	72°C	10 minutos

T_m [Temperatura optima de hibridización de los oligos]. Esta temperatura es la única variante del programa para PCR del termociclador y se calcula basándose en los oligos que se vayan a emplear.

ANEXO NO. 11

TRANSFORMACION DE B. SUBTILIS.

PROCEDIMIENTO:

1. Estriar las colonias de interés en cajas petri con medio LB e incubar toda la noche a 37°C.
2. Al siguiente día por la mañana resuspender una asada de las células al siguiente caldo nutritivo:

Sales de Bacillus 10X.....250.0 μ l
Glucosa al 20%..... 62.5 μ l
MgSO4 1M..... 12.5 μ l
Casaaminoacidos al 20%..... 2.5 μ l
Triptofano 10mg/ml.....31.2 μ l
H2O destilada desionizada (dd).....2141.0 μ l

3. Agitar a 300 rpm y 37°C por 5 horas o hasta que se obtenga un movimiento flagelar muy fuerte verificando en el microscopio.

4. Hacer un segundo medio de dilución que contenga los siguientes ingredientes:

Sales de Bacillus 10X.....250.0 μ l
Glucosa al 20%..... 62.5 μ l
MgSO4 1M..... 12.5 μ l
Casaaminoacidos al 20%..... 1.25 μ l
Triptofano 10mg/ml..... 3.1 μ l
H2O destilada desionizada (dd).....2170.0 μ l

5. Hacer una dilución 1:10 del cultivo crecido 5 horas con el segundo medio de dilución (0.25 ml en 2.25 ml), mezclar. Adicionar a 2 tubos de ensaye 1ml de la dilución, y solo a un tubo (problema) adicionar 10 μ l del DNA con el cual se desea transformar Bacillus y al otro tubo (control) no se le adiciona nada.

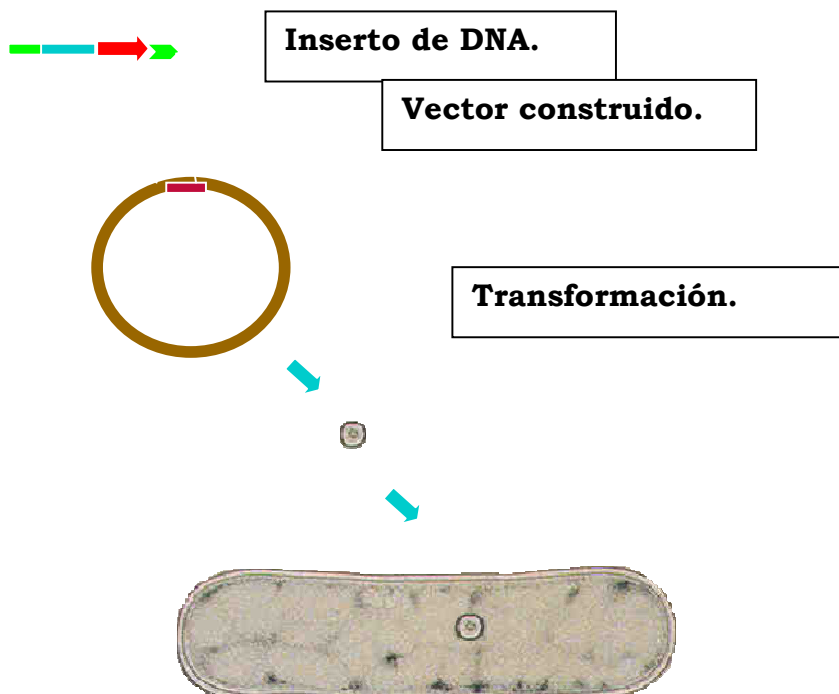
6. Colocar los tubos de nuevo en el agitador a 37°C e incubar por 1.5 horas.

7. Preparar cajas selectivas con la auxotrofia y/o resistencia (antibiótico) que se transfirió con el ADN con el cual se transformó. Platear 100 μ l del cultivo transformado e incubar a 37°C por 24 horas.

ANEXO No.12 TRANSFORMACIÓN DE *E.coli* DH5 α con pUC19

1. En un tubo para microcentrifuga de 0.5 ml estéril (en hielo) colocar 50 μ l de las células competentes de *E. coli* DH5 α y agregar 1 μ l de pUC19.
2. Incubar en baño de hielo por 1 h, con agitación ligera cada 15 min.
3. Colocar en el termoblock a 37 $^{\circ}$ C por 5 min -shock térmico-
4. Colocar en hielo por 1 min.
5. Transferir la reacción a un tubo de ensaye con 500 μ l de LB, incubar a 37 $^{\circ}$ C, 300 rpm, por 45 min.
6. Al terminar el tiempo, platear 200 μ l (con ~6 perlitas estériles) en cajas con LB-Ap⁵⁰, X-Gal e IPTG.

Transformación de *E. coli* DH5 α



Transformante.

Figura 32. Transformación de *E. coli*.

ANEXO No. 13

TRATAMIENTO PARA PREPARAR CELULAS COMPETENTES.

- 1. Inocular una colonia de la cepa DH5 α a 25 ml de medio LB e incubar por 12 horas.**
2. Vaciar en un matraz de 4 litros conteniendo 500 ml de LB y cultivar por 2 horas a 294 rpm y 37°C hasta llegar a una absorbancia de 0.6 unidades a una longitud de onda de 560nm.
3. Transferir a 4 recipientes para centrifuga de 50 ml estériles o lavados con ácido y centrifugar a 5K (5,000 rpm) durante 5 minutos.
4. Resuspender las células en 20 ml de cloruro de calcio (CaCl₂ 0.1M frio) dando 10 segundos de vortex, lo mas rápido posible.
5. Incubar en hielo 4 horas.
6. Centrifugar a 3,500 rpm durante 5 minutos y resuspender el pellet en 20 ml (5 ml por cada recipiente) de CaCl₂ 0.1M /glicerol 15% con agitación suave.
7. Incubar en hielo a 4°C en un cuarto frío por 12 horas.

8. Alicuotar 100 μ l en un tubo eppendorf manejando todo en hielo y almacenar a -70°C .