

Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada



**ANALISIS DE LA REGION DE REGULACION DEL
GENE *apreE* DE *Bacillus subtilis* MEDIANTE
FOOTPRINTING *in-vivo***

**TESIS
MAESTRIA EN CIENCIAS**

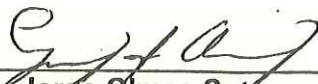
MARIA FLORENCIA COLOMBO PALLOTTA

ENSENADA, B. C., OCTUBRE DEL 2000.

TESIS DEFENDIDA POR

María Florencia Colombo Pallotta

Y APROBADA POR EL SIGUIENTE COMITÉ



Dr. Jorge Olmos Soto

Director del Comité



Dr. Alexei F. Licea Navarro

Miembro del Comité



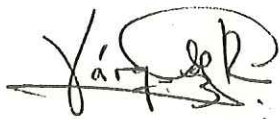
Dra. Ma. del Pilar Sánchez Saavedra

Miembro del Comité



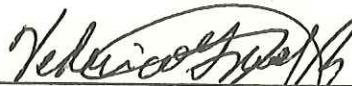
Dra. Ma. Lucila del C. Lares Reyes

Miembro del Comité



Dr. Facundo Márquez Rocha

*Jefe del Departamento de
Biotecnología Marina*



Dr. Federico Graef Ziehl

Director de Estudios de Posgrado

11 de octubre del 2000

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y DE
EDUCACIÓN SUPERIOR DE ENSENADA

DIVISIÓN DE OCEANOLOGÍA

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA MARINA

Análisis de la región de regulación del gene *aprE* de
Bacillus subtilis mediante footprinting *in-vivo*

Tesis de Maestría
presentada como requisito parcial para
la obtención del grado de

Maestro en Ciencias con
Especialidad en Biotecnología Marina

Presentada por:
María Florencia Colombo Pallotta

Ensenada, B.C., 11 de Octubre del 2000

RESUMEN de la Tesis de María Florencia Colombo Pallotta, presentada como requisito parcial para la obtención del grado de MAESTRO EN CIENCIAS con ESPECIALIDAD en BIOTECNOLOGÍA MARINA. Ensenada, Baja California, México. Octubre del 2000

ANÁLISIS DE LA REGIÓN DE REGULACIÓN DEL GENE *aprE* DE

Bacillus subtilis* MEDIANTE FOOTPRINTING *in-vivo

Resumen aprobado por :



Dr. Jorge Olmos Soto
Director de Tesis

El gene *aprE* de *Bacillus subtilis* codifica para la subtilisina, la proteasa extracelular más abundante. Su expresión está controlada por una compleja red de proteínas, las cuales se unen al DNA en la región de regulación del gene para activar o reprimir su expresión

Debido a la falta de información sobre los mecanismos de regulación de este gene en el presente trabajo se construyeron una serie de cepas con mutaciones que afectan a algunos de las proteínas reguladoras, con el fin de determinar su Actividad Específica y realizar la técnica de footprinting *in-vivo* para poder detectar cambios en la interacción DNA-proteína en la región de regulación del gene.

Los datos de Actividad Específica de las cepas *sinR⁻*, *hpr⁻* y *sinR/hpr⁻* indican que las proteínas SinR y Hpr son represores de la expresión del gene. Esta conclusión se sustenta con los datos obtenidos en la cepa *sinI⁻*, la cual presentó una actividad del 25% con respecto a la *w.t.*, mientras que la cepa que contenía al operón *sinRI* en alto número de copias presentó una represión casi total de la expresión del gene.

Con respecto a los footprintings de las cepas *sinI⁻* y *sinRI⁺⁺⁺* en una región que no fue secuenciada pero que corresponde al sitio de unión de Hpr3, Hpr4, AbrB o SinR se observa protección de T₀ a T₂. Esta región en T₃ se hipemetila lo que podría indicar que hay interacción entre las proteínas SinR y Hpr o que este es el sitio de unión *in-vivo* de SinR cercano al promotor. También es notoria la región de protección en el sitio de unión de Hpr2, lo que podría estar indicando la interacción de SinR con Hpr, al menos bajo estas condiciones. Asimismo, para el sitio de unión de Hpr1 se observa un patrón similar lo que le daría más fuerza a esta hipótesis.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, región de regulación de *aprE*, footprinting *in-vivo*.

Abstract of the Master in Science Thesis presented by María Florencia Colombo Pallotta, as a partial requirement to obtain the degree and specialization in Marine Biotechnology. Ensenada, Baja California, México, October 2000.

FOOTPRINTING *in-vivo* IN THE *aprE* REGULATORY REGION FROM *Bacillus subtilis*

Abstract approved by:



Dr. Jorge Olmos Soto
Director

Bacillus subtilis aprE gene codes for the extracellular protease known as subtilisin. Its expression is regulated by a complex network of activators and repressors by binding the DNA in the *aprE* regulatory region.

In order to understand the regulatory mechanisms, in this work, strains carrying mutations in some of the regulatory proteins were constructed. We measured Specific Activity and we performed footprinting *in-vivo* from this region.

The Specific Activity indicated that SinR and Hpr are repressors of the gene expression. The *sinI* strain had 25% of the normal activity and in the *sinRI*⁺⁺⁺ strain the repression was total. As SinR was overproduced in *sinI* and *sinRI*⁺⁺⁺ strains, we can speculate that SinR is the most important repressor in this regulatory network.

The footprinting *in-vivo* experiments showed that in the binding site of Hpr3, Hpr4, AbrB or SinR, there was a protection in T₀ - T₂, and in T₃ this site presented a hypermethylation. We suggest two hypotheses to explain this behavior. The first is that there is an interaction between SinR and Hpr. The other hypothesis is that this site was the proposed *in-vivo* to SinR near to the promoter. We found another protection sites in the Hpr2 and Hpr1 binding sites and this could be a good agreement with the first hypothesis.

key words: *Bacillus subtilis*, footprinting *in-vivo*, *aprE* regulatory region.

**Con todo el Amor que mi alma puede expresar:
Para Guada (q.e.p.d.)
y para Catalina Paz.**

AGRADECIMIENTOS

A mi Director de Tesis, Dr. Jorge Olmos Soto por brindarme su confianza, su conocimiento y su apoyo para la realización de este trabajo.

A mis sinodales Dr. Alexei Licea Navarro, Dra. María del Pilar Sánchez Saavedra y Dra. Lucila Lares Reyes, por sus sugerencias para mejorar la calidad del trabajo.

A la Secretaría de Relaciones Exteriores de México por la beca con la que esta tesis fue realizada.

Al CONACyT por el financiamiento del proyecto número 225080-5-4301PB con que se realizó este trabajo.

A mis compañeros de generación y del laboratorio, especialmente al M. en C. Fausto Arellano Carbajal.

A mis amigos de Ensenada: Andrea, Arturo, Carlos, Unai, Linda, Andrés, Pedro, Norman-D, Liliana, Pacho, Gladys y Juan.

A Margarita Ruda por haberme mostrado el camino de la Ciencia.

A mi Familia por el apoyo incondicional.

CONTENIDO

	Página
<u>I.- INTRODUCCIÓN.....</u>	1
<u>II.- ANTECEDENTES.....</u>	4
II.1 CICLO DE VIDA.....	4
II.2 CARACTERÍSTICAS DEL OPERÓN <i>sinRI</i>	6
II.3 CARACTERÍSTICAS DE LAS PROTEÍNAS SinR Y SinI.....	7
II.4 Hpr, OTRO REGULADOR DEL ESTADIO DE TRANSICIÓN.....	8
II.5 EL SISTEMA DE DOS COMPONENTES: DegU Y DegS.....	9
II.6 FOOTPRINTING <i>in-vitro</i> Y ANÁLISIS COMPUTACIONAL EN <i>aprE</i>	10
II.7 EFECTO DE SinR EN <i>aprE</i>	12
II.8 FOOTPRINTING <i>in-vivo</i>	14
II.9 <i>Bacillus subtilis</i> COMO HUÉSPED Y COMO MODELO.....	15
<u>III.- JUSTIFICACIÓN.....</u>	17
<u>IV.- OBJETIVOS.....</u>	18
<u>V.- METODOLOGÍA.....</u>	19
V.1 CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO.....	19
V.2 TRANSFORMACIÓN.....	20
V.3 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y TOMA DE MUESTRAS.....	21
V.4 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA.....	22
V.5 FOOTPRINTING <i>in-vivo</i>	22
V.6 SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN REGULADORA DE <i>aprE</i>	27
V.7 ELECTROFORESIS.....	29
<u>VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</u>	31
VI.1 CONSTRUCCIÓN DE CEPAS.....	31
VI.2 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO.....	32
VI.3 ACTIVIDAD ESPECÍFICA.....	33
VI.4 SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN REGULADORA DE <i>aprE</i>	35
VI.5 FOOTPRINTING <i>in-vivo</i>	37
<u>VII.- CONCLUSIONES PUNTUALES.....</u>	46
<u>VIII.- PERSPECTIVAS.....</u>	48
<u>BIBLIOGRAFÍA.....</u>	49

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 REGIÓN DE REGULACIÓN DE <i>aprE</i> . SE MUESTRA LA INTERACCIÓN DE ALGUNOS REGULADORES DEL ESTADÍO DE TRANSICIÓN.....	3
2 CURVA DE CRECIMIENTO TÍPICA DE <i>Bacillus subtilis</i> . SE MUESTRA EL ESTADÍO DE TRANSICIÓN Y LOS TIEMPOS IDEALIZADOS PARA LA PRODUCCIÓN DE DIFERENTES MARCADORES CELULARES.....	5
3 INTERACCIÓN DE SinR CON EL SITIO DE UNIÓN FUERTE (SBS-1) EN <i>aprE</i> DETERMINADO MEDIANTE FOOTPRINTING <i>in-vitro</i>	11
4 ESQUEMA DE LA TÉCNICA DE FOOTPRINTING <i>in-vivo</i>	14
5 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE LAS CEPAS CONSTRUIDAS.....	32
6 SECUENCIA DE LA REGIÓN DE REGULACIÓN DE <i>aprE</i> UTILIZANDO pSUB1 COMO MOLDE.....	36
7 FOOTPRINTING <i>in-vivo</i> . AUTORRADIOGRAFÍA 1.....	38
8 FOOTPRINTING <i>in-vivo</i> . AUTORRADIOGRAFÍA 2.....	40
9 FOOTPRINTING <i>in-vivo</i> . AUTORRADIOGRAFÍA 3.....	42

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
I	CEPAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO.....19
II	RESULTADO DE LAS TRANSFORMACIONES.....31
III	RESULTADOS DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA PARA T ₂ EN UNIDADES MILLER.....33
IV	ANÁLISIS DE LA FIGURA 7.....39
V	ANÁLISIS DE LA FIGURA 8.....41
VI	ANÁLISIS DE LA FIGURA 9.....43

I.- INTRODUCCIÓN

El género *Bacillus* está constituido por uno de los grupos más diversos de bacterias Gram-positivas, entre los que se encuentran microorganismos aerobios, aerobios facultativos y anaerobios. Tienen una morfología tipo barra y son formadores de endoesporas, las cuales resisten calor, luz ultravioleta, desecación y solventes orgánicos (Slepecky, 1992). El miembro más representativo de este género es *Bacillus subtilis*, una eubacteria ampliamente distribuida en suelo y en menor medida en aire, ríos y estuarios (Priest, 1993). Después de *Escherichia coli* es la especie bacteriana más estudiada y más fácil de manipular en términos genéticos-moleculares y actualmente se utiliza como microorganismo huésped para la producción de proteínas heterólogas utilizando, entre otras, la región de regulación del gene *aprE*.

El gene *aprE* codifica para la subtilisina, la proteasa extracelular más abundante (Gaur *et al.*, 1986). Su expresión está relacionada con el inicio de la esporulación y es controlada por varias proteínas denominadas reguladores del estadio de transición como DegU/DegS (Msadeck *et al.*, 1990; Olmos *et al.*, 1997), Hpr (Kallio *et al.*, 1991), AbrB (Strauch *et al.*, 1989; Olmos *et al.*, 1997) y SinR (Gaur *et al.*, 1991; Mandic-Mulec *et al.*, 1992; Bai *et al.*, 1993; Olmos *et al.*, 1997; Sánchez, 1999). Estos reguladores se unen a la región de regulación de este gene para activar o reprimir su expresión (Fig. 1).

Estudios de footprinting *in-vitro* en la cepa silvestre (*w.t.*) demostraron que SinR se une al DNA en la región que abarca desde la base -269 a la -219 con respecto al sitio de inicio de la transcripción de este gene. Este sitio tiene un eje de simetría con 2 invertidos repetidos de diferentes secuencias, denominados SBS-1A y SBS-1B. A su vez, mediante

gel de retardamiento encontraron otro sitio de pegado débil, el cual se encuentra cercano a la región del promotor, entre *Dde* I y *Ssp* I o dentro de *Ssp* I (Gaur *et al.*, 1991). Asimismo, en el trabajo de Sánchez (1999) mediante análisis computacional reportan que el sitio SBS1-B invertido se alinea entre las bases +9 a +31 con un 90% de similitud, lo que podría significar otro posible sitio de unión para SinR en *aprE*.

La proteína SinR controla rutas de desarrollo alternativas en *Bacillus subtilis*. Tiene un papel positivo en competencia y motilidad ya que su inactivación resulta en pérdida de dichas funciones (Smith, 1992) y un papel negativo en los procesos de esporulación y producción de exoproteasas (Gaur *et al.*, 1986; Gaur *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1991). Sin embargo, posteriormente en el trabajo de Olmos *et al.*, (1997) demuestran que en la mutante *sinR* la expresión de la fusión transcripcional *aprE-lacZ* se reduce en un 50% con respecto a la cepa *w.t.*. Estos autores concluyen que este descenso en la expresión de *aprE* podría deberse al hecho de que esta mutante presenta una reducción de aproximadamente 1 hora del tiempo de expresión de subtilisina. Asimismo, Olmos (1996, b) demuestra que al eliminar de la base -224 en adelante, la expresión de la fusión transcripcional *aprE::lacZ* también disminuye a la mitad. Por otro lado, Sánchez (1999) observa que a la cepa a la que se le removió de la base -224 en adelante presenta el mismo valor que el reportado en el trabajo de Olmos (1996, b) y para otra cepa con la misma remoción y con el gene de *sinR* interrumpido obtienen 2000 U.M., el mismo valor que para la cepa *w.t.*, lo que indica que bajo estas condiciones SinR es el represor más importante y que tiene otro sitio de unión en la vecindad del promotor.

Resultados preliminares de “footprinting *in-vivo*” desarrollados por Olmos (com. pers.) muestran que el sitio donde se une SinR en *aprE* se encuentra igualmente protegido

en la mutante *sinR*⁻ que en la mutante *hpr2*⁻ durante las primeras horas de la esporulación, lo que podría sugerir la interacción de SinR con Hpr u otra proteína en esta región.

Tomando en cuenta estos resultados preliminares y que a la fecha no se ha reportado el patrón de modificaciones que sufre dicha región según el estadio de desarrollo de la célula, en el presente trabajo se analizó la región de regulación del gene *aprE* mediante footprinting *in-vivo* en la cepa silvestre y en cepas con mutaciones específicas que afectan a algunos de los reguladores del estadio de transición con el fin de contribuir al estudio de la regulación del gene *aprE*.

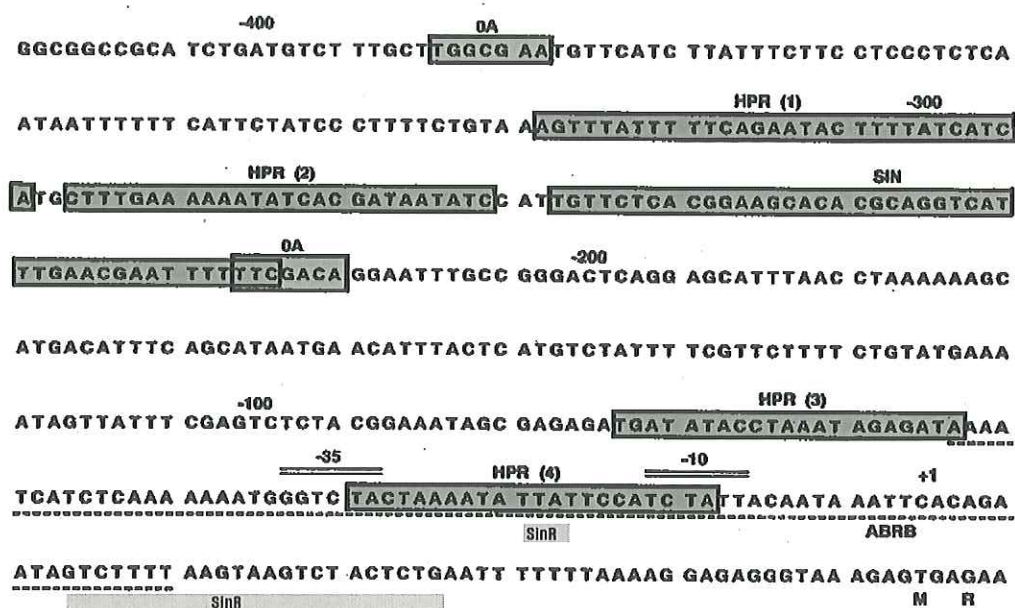


Fig. 1: Región de regulación de *aprE*. Se muestra la interacción de algunos reguladores del estadio de transición.

II.- ANTECEDENTES

II.1 CICLO DE VIDA

Bacillus subtilis, al igual que todas las bacterias formadoras de endoesporas, desarrollan un ciclo de vida que consiste de varias etapas fácilmente distinguibles: germinación, crecimiento, multiplicación y esporulación. La germinación es la conversión de la spora latente a una célula metabólicamente activa capaz de crecer. Bajo condiciones ambientales favorables esta célula va a multiplicarse dividiéndose simétricamente, mientras que bajo falta de nutrientes o alta densidad poblacional va a dividirse asimétricamente para producir la spora (Slepecky, 1992). Por lo tanto, una curva de crecimiento típica de *Bacillus subtilis* (Fig. 2) se caracteriza por presentar una fase de crecimiento exponencial que corresponde a un medio rico en nutrientes; un estadio de transición, donde la célula comienza a activar respuestas a estrés como consecuencia de un medio que comienza a ser limitante; y una fase de crecimiento estacionaria donde los nutrientes son un recurso limitado. Dentro de las respuestas a estrés se encuentran la producción y secreción de enzimas degradativas y antibióticos, el desarrollo de competencia, la síntesis de flagelo para movilidad, la inducción completa del ciclo de Krebs y el desarrollo completo de la spora (Strauch y Hoch, 1992). El estadio más temprano de la esporulación se define como T_0 , y es el momento en el que las células dejan el crecimiento exponencial y entran en fase estacionaria.

En *B. subtilis* se conoce que por lo menos cuatro proteínas (AbrB, Hpr, SinR y DegU) tienen efectos pleiotrópicos sobre la expresión de las características antes

mencionadas, y se les conoce como reguladores del estadio de transición, ya que actúan entre el final del crecimiento exponencial y el inicio de la fase estacionaria (Fig. 2)

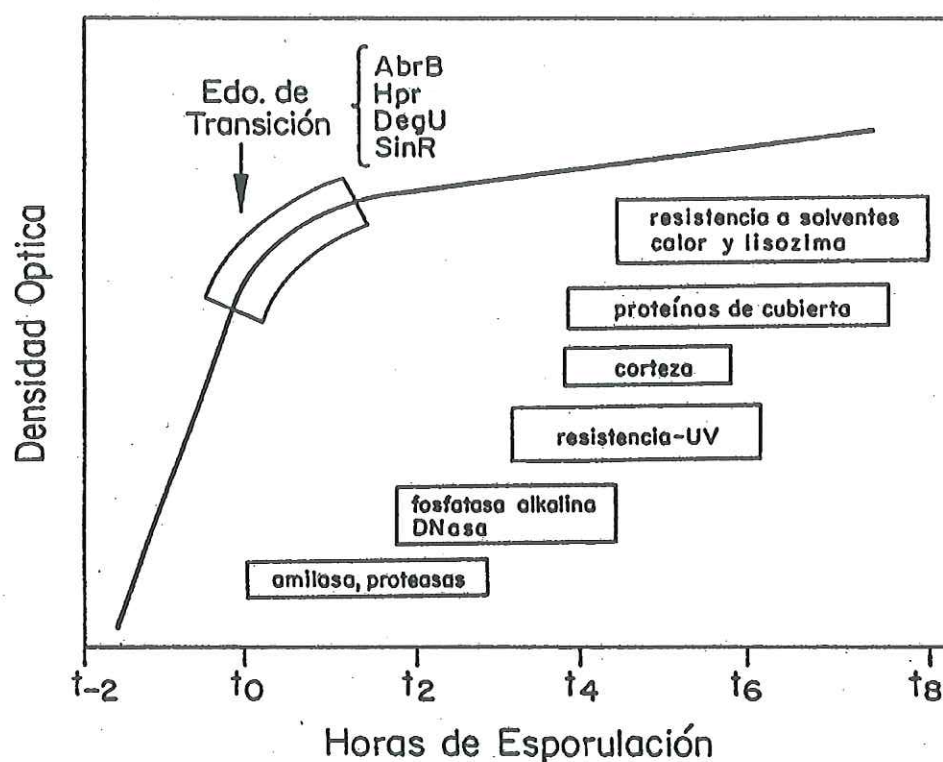


Fig. 2: Curva de crecimiento típica de *Bacillus subtilis*. Se muestra el estadio de transición y los tiempos idealizados para la producción de diferentes marcadores celulares.

Por otra parte, aunque ninguna de las mutaciones conocidas en estos reguladores afectan significativamente la formación de la espora, hay evidencias que indican que

algunos de los genes que codifican para estos reguladores están bajo el control de proteínas esenciales para el inicio de la esporulación y que algunos de estos reguladores afectan genes del proceso de esporulación. Esto sugiere que el control de la síntesis de enzimas degradativas como la subtilisina y otros procesos que se llevan a cabo durante el estadio de transición son dependientes de los mecanismos de regulación de la esporulación (Olmos, 1996).

La proteína Spo0A pertenece a la familia de reguladores bacterianos de dos componentes y su fosforilación es la clave en el control del inicio de la esporulación por ser represor del gene *abrB*, el cual codifica para la proteína AbrB cuya función es unirse al promotor y prevenir la expresión de los genes que son activados al inicio de la fase estacionaria, incluyendo algunos genes esenciales para la esporulación (Burbulys *et al.*, 1991).

II.2 CARACTERÍSTICAS DEL OPERÓN *sinRI*

La proteína SinR está codificada por el gene *sinR*, el cual fue aislado por primera vez de un fragmento de DNA cromosomal de *B. subtilis*, el cual clonado en un plásmido multicopia inhibía la esporulación y la producción de proteasas extracelulares (Gaur *et al.*, 1986). Junto con *sinI*, el gene que codifica para la proteína SinI, forma un operón dicistrónico, *sinRI*, el cual contiene 3 promotores. P1 y P2 regulan la transcripción de ambos genes, mientras que P3 regula sólo la transcripción de *sinR* (Gaur *et al.*, 1988).

Los niveles de expresión de *sinI* se incrementan al final de T_0 y requieren de las proteínas SpoOA~P y SpoOH. Por el contrario, *sinR* es expresado constitutivamente pero su producto sólo se detecta al inicio de la esporulación y su expresión es independiente de las proteínas SpoOA~P y SpoOH (Bai *et al.*, 1993).

II.3 CARACTERÍSTICAS DE LAS PROTEÍNAS SinR Y SinI

SinR es una proteína tetramérica de 111 aminoácidos con un peso molecular de 13 KDa. Además del motivo estructural Hélice-Vuelta-Hélice (H-T-H) en el extremo N-terminal reportado por Gaur *et al.* (1986), el análisis computacional de la estructura secundaria de SinR reveló que podría haber otro motivo H-T-H en el extremo C-terminal, el cual tiene todas las condiciones ideales, excepto que en la hélice de reconocimiento hay fenilalanina en lugar de isoleucina, valina o leucina, aunque este reemplazo podría tener una funcionalidad equivalente (Gaur *et al.*, 1991).

Ya que SinR existe como un tetrámero en solución debe haber por lo menos dos interfaces para asegurar que ocurran las interacciones proteína-proteína. Una de las interfaces es una cremallera de leucinas que hace a SinR un dímero, mientras que la naturaleza de la otra interface que permite la formación del tetrámero no se conoce (Gaur *et al.*, 1991).

SinI es una proteína de 54 aminoácidos con un peso molecular de 6 KDa, la cual se presenta en forma de monómeros y dímeros en rápido equilibrio reversible (Scott *et al.*, 1999).

La adición de SinI a SinR previene que esta última se una a la región reguladora de *aprE*, ya que la función de SinI es inactivar a SinR a través de interacciones proteína-proteína al final de T₂, por lo que se observa una mayor inhibición de la esporulación y de la producción de exoproteasas en una cepa que contiene sólo el gene *sinR* que el operón *sinRI*. Como consecuencia, una cepa con el gene *sinI* deletado se comporta como sobreexpresora de SinR (Bai *et al.*, 1993).

Mediante ultracentrifugación analítica y electroforesis se determinó que estas proteínas se unen formando un complejo 1:1 sin especies intermediarias estables (Scott *et al.*, 1999), mientras que mediante cristalografía por rayos X se determinó las dimensiones de los cristales (Lewis *et al.*, 1996).

II.4 Hpr, OTRO REGULADOR DEL ESTADIO DE TRANSICIÓN

El gene *hpr* codifica para la proteína Hpr (peso molecular 23.7 KDa) la cual es un regulador negativo de las proteasas alcalina (*aprE*) y neutra (*nprE*) (Perego y Hoch, 1988). Sin embargo, en la mutante *hpr⁻* la tasa de expresión de la subtilisina se incrementa pero continúa sujeta a controles temporales normales y se expresa sólo al final del crecimiento vegetativo, por lo que se dice que es un 'preventor' que puede interactuar con otros reguladores del estadio de transición. Estudios de footprinting *in-vitro* realizados con DNasa I indican que Hpr tiene 4 sitios de unión en el promotor de *aprE* mientras que tiene sólo 2 sitios en el de *nprE* y que también regula la expresión de *sinI* al unirse en 2 sitios de su promotor. Para el caso del promotor de *aprE* uno de los sitios de unión de Hpr (-297 a -267) se superpone con el sitio de unión de SinR (-219 a -269) pero en experimentos de

competencia se demostró que su unión a DNA ocurre de manera independiente y no hubo alteración visible en el alcance o naturaleza de sus respectivas regiones de unión (Kallio *et al.*, 1991).

Además de regular proteasas, Hpr parece controlar otras funciones del estadio de transición como la producción de fosfatasa alcalina y la movilidad, además de estar involucrado en la represión de glucosa en la esporulación. Cuando está presente en plásmido multicopia inhibe la esporulación (Kallio *et al.*, 1991).

II.5 EL SISTEMA DE DOS COMPONENTES: DegU y DegS

Las proteínas DegU y DegS pertenecen a la familia de reguladores procariotas denominados sistemas de dos componentes. DegS es una quinasa que se autofosforila en respuesta a señales ambientales específicas y luego le transmite el fosfato a DegU, la cual se une al DNA para regular su transcripción (Burbulys *et al.*, 1991). Se ha demostrado que tienen una función positiva en la expresión de enzimas degradativas y un papel negativo en los procesos de competencia y movilidad. La mutación DegU32 (Hy) es ampliamente utilizada en la industria biotecnológica por sobreproducir enzimas degradativas (Olmos, 1996, a).

Mediante experimentos de excisión (Henner *et al.*, 1988) se determinó que DegU se une a *aprE* en la región -164 a -141. Cabe señalar que mediante footprinting *in-vitro* no se ha podido reafirmar esta posición.

II.6 FOOTPRINTING *in-vitro* Y ANALISIS COMPUTACIONAL EN *aprE*

En el trabajo de Gaur *et al.* (1991), con el fin de establecer el sitio de unión *in-vitro* de SinR en *aprE* realizaron un gel de retardamiento donde observaron que el fragmento que contenía el sitio de unión localizado previamente *in-vivo* fue específicamente retardado en presencia de SinR. Sin embargo, observaron que también se une en algún lugar entre *Dde* I y *Ssp* I o que *Ssp* I está dentro del sitio de unión. Para determinar la ubicación exacta realizaron footprintings *in-vitro*, donde observaron que SinR protege de DNasa I una región de 46 pb, desde -220 a -265 cuando se marcó la hebra top y de -233 a -268 cuando se marcó la hebra bottom.

El análisis de la protección de metilación por DMS de los residuos de guanina luego de la unión de SinR reveló protección de los sitios -229, -240, -241, -250 y -262 para la hebra top, mientras que para la bottom hubo protección en los sitios -238, -247, -249, -257, y -259.

La prueba determinante para la predicción de dos sitios de unión dentro del sitio fuerte de unión de SinR (SBS-1) en *aprE*, fue realizando footprinting de exonucleasa III, ya que remueve progresivamente los nucleótidos desde el final 3' del DNA duplex y esta remoción se ve impedida cuando hay una proteína unida a DNA. Este análisis en la hebra top muestra dos puntos de paro correspondientes a las posiciones -219 y -240; mientras que para la hebra bottom se ve un solo paro en el -269. Este resultado implica que hay dos sitios de unión adyacentes para SinR en *aprE*, denominados SBS-1A y SBS-1B y que SBS-1B es más débil que SBS-1A por tener sólo 1 paro.

Por otro lado el hecho de que el sitio de unión sea más largo de lo común (generalmente son 20-25 pb), podría estar indicando que estos 46 pb pueden tener dos sitios de unión para SinR adyacentes y el nucleótido T podría estar separándolos en la posición -242, la cual se encuentra parcialmente protegida (Fig. 3).

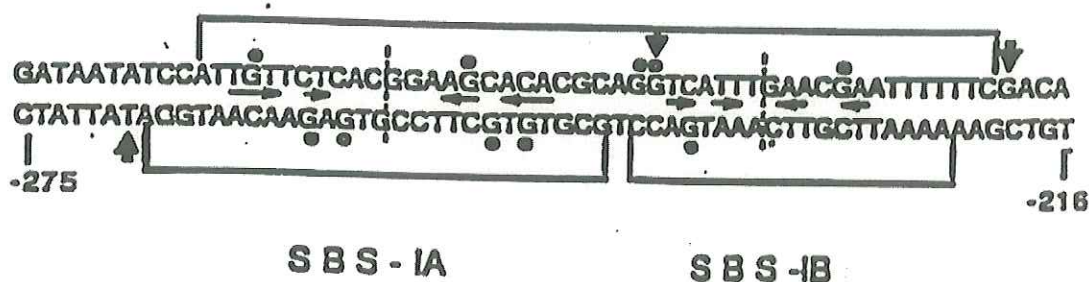


Fig. 3: Interacción de SinR con el sitio de unión fuerte (SBS-1) en *aprE* determinado *in-vitro*. Los círculos indican los residuos de guanina protegidos de la metilación por DMS; las flechas gruesas los puntos de paro por Exonucleasa III; las secuencias protegidas del corte con DNasa I están indicadas por corchetes, mientras que las flechas entre las hebras complementarias del DNA indican las bases con simetría diada y las líneas discontinuas verticales representan los centros de simetría diada.

A su vez, en el trabajo de Sánchez (1999), mediante análisis computacional reportan que el sitio SBS1-B invertido se alinea entre las bases +9 a +31 con un 90 % de

similitud, lo que podría significar otro posible sitio de unión para SinR en *aprE*, el cual podría o no ser el sitio cercano al promotor reportado por Gaur *et al.* (1991).

II.7 EFECTO DE SinR EN *aprE*

Aunque está reportado que la eliminación del sitio fuerte de SinR en *aprE* causa tres veces más expresión de subtilisina *in-vivo* (Gaur *et al.*, 1991), mientras que la inactivación del gene *sinR* provoca una sobreexpresión de *aprE* similar (Smith *et al.*, 1991), lo cual indica que a niveles fisiológicos SinR desempeña una función de represor en la regulación del gene de la subtilisina (Smith *et al.*, 1991), estas conclusiones no están sustentadas por datos experimentales ya que en estos trabajos no se reporta la Actividad Específica de la fusión transcripcional *aprE-lacZ* en las cepas *w.t.* y mutantes.

Por otro lado, si bien el fenotipo *sinR*⁻ ha sido asociado con altos niveles de producción de proteasas extracelulares (Gaur *et al.*, 1986) y hay evidencias que indican que SinR puede actuar como un represor de *aprE*, el trabajo reportado por Olmos *et al.* (1997) demuestra que la interrupción de *sinR* causa un descenso de aproximadamente el 50 % en la expresión de la fusión *aprE-lacZ* en los fondos genéticos analizados, lo cual también fue observado en el trabajo de Sánchez (1999). También observaron que la mutante *sinR*⁻ tiene tres veces más producción de proteasas extracelulares en comparación con la *w.t.*, lo cual concuerda con lo reportado por Gaur *et al.* (1986), y al comparar la producción total de proteasas extracelulares en dos cepas de *B. subtilis* en las cuales se quitaron los genes de las proteasas alcalina y neutra, Olmos *et al.* (1997) concluyen que la mutante *sinR*⁻ disminuye la expresión de *aprE*, mientras que incrementa el nivel de una o más proteasas

extracelulares no identificadas o que este descenso se debe a la reducción de aproximadamente 1 hora del tiempo de expresión de subtilisina. Estos resultados podrían indicar que dependiendo de la concentración y el estadio celular, SinR podría actuar como un represor o activador de la expresión de *aprE*. Este tipo de regulación se observa en proteínas reguladoras como AraC en la regulación de la arabinosa en *E. coli*.

Hasta la fecha no está claro por qué la unión de SinR a 200 pb arriba del -35 puede afectar la transcripción de este gene. Podría pensarse que SinR causa un lazo de represión entre la región -200 y +1, bloqueando el acceso de la polimerasa y/o reguladores positivos, ya que se ha visto que otros reguladores que son tetrámeros en solución como LacI y GalR pueden causar este tipo de estructuras en secuencias blanco del DNA (Gaur *et al.*, 1991); o que Hpr podría ejercer su función represora impidiendo el acceso de la polimerasa ya que se une a regiones necesarias para la reacción de inicio como son el -35 y el -10, mientras que los sitios adicionales podrían servir para aumentar esta capacidad mediante la formación de un lazo de represión que podría estar acercando a SinR a la vecindad del promotor (Kallio *et al.*, 1991), al sitio detectado por Gaur *et al.* (1991) mediante gel de retardamiento o al sitio identificado por Sánchez (1999) mediante análisis computacional.

II.8. FOOTPRINTING *in-vivo*.

La técnica de footprinting *in-vivo* se utiliza para el estudio de interacción DNA-proteína tanto en DNA genómico como plasmídico. El protocolo involucra tres pasos (Fig. 4): primero el cultivo es incubado con di-metil-sulfato (DMS), un reactivo que modifica el DNA en la posición N-7 de las guaninas. Luego el DNA es purificado y roto con piperidina en los sitios modificados. Por último, los sitios modificados se detectan mediante amplificación lineal utilizando un oligonucleótido sintético marcado con ^{32}P . El producto de PCR es visualizado en un gel de secuencia y autorradiografía.

En caso de que una proteína esté unida al DNA, el DMS no tiene acceso, por lo que la piperidina no corta al DNA en esa región. Como consecuencia en la autorradiografía se observa una región de protección.

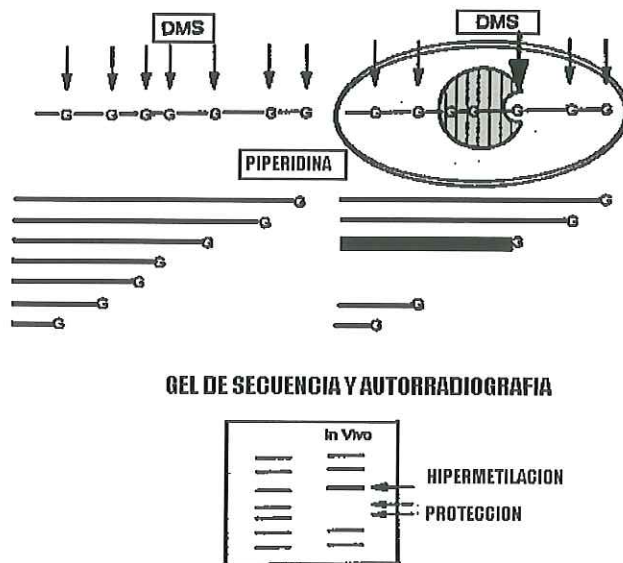


Fig. 4: Esquema de la técnica de footprinting *in-vivo*.

Aunque la técnica de footprinting puede ser desarrollada *in-vitro* sobreproduciendo la proteína que se quiere estudiar (para mayores detalles ver Gaur *et al.*, 1991, Kallio *et al.*, 1991), las condiciones *in-vivo* nos pueden dar una idea más cercana a la realidad porque se mantienen las condiciones fisiológicas. En este caso, el análisis de los datos es más complicado porque se pueden observar regiones protegidas o hipermetiladas pero no saber de qué proteína se trata ya que no hay sobreproducción de una en particular. Para poder establecer cuál proteína es la que interacciona *in-vivo* en una región del DNA se deben correr en el mismo gel la secuencia del DNA y las muestras de footprinting de la cepa *w.t.* y mutantes que carezcan o sobreexpresen una proteína en particular.

Finalmente, se recomienda utilizar la técnica *in-vitro* para saber si una proteína en particular puede interaccionar con la región de estudio. Una vez establecido esto, la técnica *in-vivo* proporciona datos que deben ser relacionados con la Actividad Específica de cada una de las cepa estudiadas.

II.9. *Bacillus subtilis* COMO HUÉSPED Y COMO MODELO

El género *Bacillus* incluye una variedad de especies industrialmente importantes las cuales son comunmente utilizadas como microorganismos huésped en las fermentaciones industriales. Estas cepas pueden ser cultivadas bajo condiciones extremas de pH y temperatura dependiendo de las características del producto que se quiera producir. A su vez, la mayoría no son patógenas y facilmente manipulables en términos genéticos, lo que convierte a este género en uno de los más importantes en la industria biotecnológica (Arbige *et al.*, 1993).

Los productos que se comercializan a partir de fermentaciones de *Bacillus* spp. incluyen:

- * enzimas como metalloproteasas, proteasas (incluyendo la subtilisina), α -amilasas y glucosa isomerasa, las cuales representan más de la mitad de las ventas anuales totales de enzimas producidas a nivel mundial (700 a 800 millones de dólares) (Arbige *et al.*, 1993).
- *antibióticos como lipopéptidos, dipéptidos y tripéptidos entre los que se encuentran mycobacillin, bacilysin, surfactin, gramicidin y bacitracin (Zuber *et al.*, 1993).
- *insecticidas, en su mayoría provenientes de *Bacillus anthracis* (Atkinson y Mavituna, 1991).
- *Otros productos como nucleótidos y nucleósidos, los cuales son utilizados como saborizantes de alimentos y aminoácidos (Arbige *et al.*, 1993).

El área de producción que mas rápidamente está creciendo es la expresión de proteínas heterólogas, entre las que se encuentran la proinsulina humana, la hormona humana de crecimiento, β -lactamasa, el factor de crecimiento epidermal humano, catecol 2,3 dioxigenasa y α_2 -interferón, entre otras (Arbige *et al.* 1993). Algunos de estos sistemas utilizan la región de regulación del gene *aprE*, por lo que el entendimiento de su regulación podrá proveer a la industria biotecnológica de cepas más eficientes para la producción de un gran número de compuestos.

III.- JUSTIFICACIÓN

En los últimos años se ha incrementado el uso de *Bacillus subtilis* como microorganismo huésped para el desarrollo de sistemas de producción de proteínas heterólogas ya que es considerado un microorganismo GRAS, su genoma está totalmente secuenciado, secreta al medio de cultivo grandes cantidades de proteínas y están estandarizadas las condiciones de fermentación. Algunos de estos sistemas utilizan la región de regulación del gene *aprE*. Sin embargo, sus mecanismos de regulación son poco conocidos o contradictorios según el autor que los reporta. Por tal motivo, el estudio de la regulación del gene *aprE* es de gran importancia en el área de producción e investigación básica. En particular, el poder detectar cambios en la interacción DNA-proteína y el patrón de modificaciones que sufre dicha región según el estadio de desarrollo de la célula, permitirá obtener un conocimiento más profundo y más relacionado del papel que desempeña cada uno de estos reguladores sobre la expresión del gene *aprE*.

A su vez *Bacillus subtilis* es la especie más estudiada dentro de este género y se utiliza como microorganismo modelo para entender los eventos asociados con el inicio de la esporulación, por lo que la información que se genere a partir de esta especie puede servir de referencia para otras especies o géneros relacionados menos estudiados.

IV.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- * Contribuir al estudio de los mecanismos de regulación del gene *aprE* determinando la actividad específica y el patrón de pegado *in-vivo* de las proteínas reguladoras al DNA en cepas silvestres y mutantes.

OBJETIVOS PARTICULARES

- * Construir las cepas *w.t.* (Sp^+), *sinR*⁻, *hpr*⁻, *sinR/hpr*⁻, *sinI* y *sinRI*⁺⁺⁺.
- * Determinar la Actividad Específica de las cepas *w.t.* (Cm^+) y (Sp^+), *sinR*⁻, *hpr*⁻, *sinR/hpr*⁻, *sinI* y *sinRI*⁺⁺⁺.
- * Estandarizar el método de footprinting *in-vivo* en una cepa *w.t.* de *Bacillus subtilis*.
- * Realizar footprinting *in-vivo* de cepas mutantes *sinI* y *sinR*⁺⁺⁺.
- * Secuenciar la región reguladora del gene *aprE* para utilizarla como control.

V.- METODOLOGÍA

V.1 CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO

En la tabla I se muestran las cepas utilizadas en este trabajo. Todas fueron mantenidas a 4 °C en medio Luria Bertani (LB) sólido (Sambrook *et al.*, 1989). Para las cinéticas de crecimiento se utilizó medio de esporulación Schaeffer (Schaeffer, 1965).

Tabla I: Cepas Utilizadas

CEPA	FUENTE	GENOTIPO
<i>w.t.</i> (Cm ^r)	C.I.C.E.S.E.*	β-gal his-gly Cm ^r
<i>w.t.</i> (Sp ^r)	Este Trabajo	β-gal his-gly Sp ^r
<i>sinR</i> ⁻	B.G.S.C. [#]	hisA1 leuA8 metB5 sinR::Phl
<i>hpr</i> ⁻	C.I.C.E.S.E.*	hpr2 his β-gal Cm ^r
<i>sinR/hpr</i> ⁻	Este Trabajo	hisA1 leuA8 metB5 sinR::Phl hpr2 β-gal Cm ^r
<i>sinI</i> ⁻	B.G.S.C. [#]	hisA1 leuA8 metB5 sinI::Km
<i>sinRI</i> ⁺⁺⁺	B.G.S.C. [#]	(pIS74) Cm hisA1 metB5 recE4

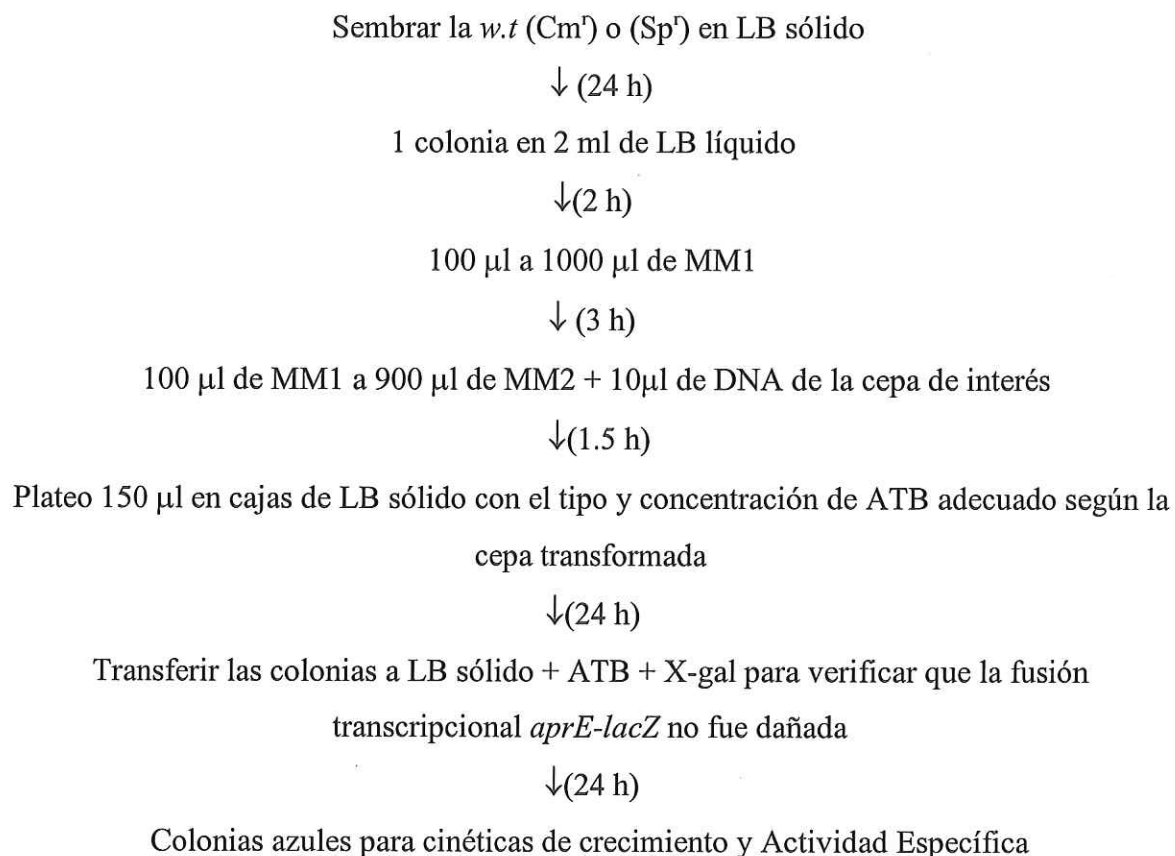
[#]B.G.S.C. (Bacillus Genetic Stock Center)

*C.I.C.E.S.E. (Laboratorio de Microbiología Molecular, Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada)

V.2 TRANSFORMACIÓN:

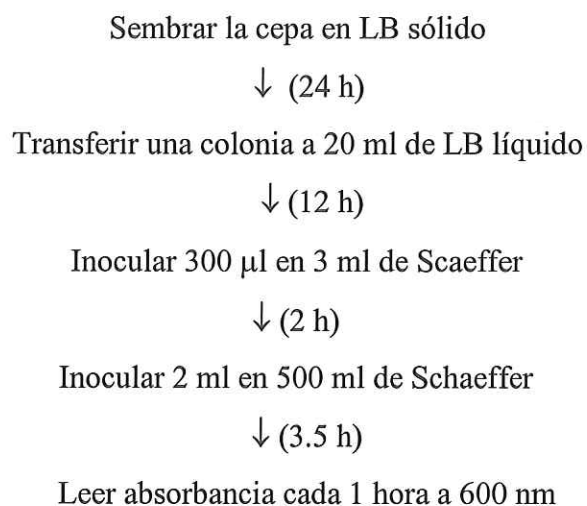
El proceso de transformación (Anagnostopulos y Spizizen, 1961) nos permite introducir distintos fondos genéticos en una cepa de referencia, en este caso la *w.t.* BB80 *his gly* β -gal, para lo cual previamente se debe purificar el DNA de la cepa de interés por el método fenol-cloroformo como se describe en *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausbel *et al.*, 1992).

El esquema del procedimiento es el siguiente:



V.3 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO Y TOMA DE MUESTRAS

Una vez transformadas las cepas se realizaron las cinéticas de crecimiento según el esquema:



Una vez que la cepa llegaba a T_0 (5.5 h después de inoculado el Fernback) se tomaban muestras de 1 ml para determinación de Actividad Específica, las cuales se centrifugaron y el paquete celular fue mantenido a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, y 20 ml para determinación de footprinting *in-vivo*. Se repitió para T_1 , T_2 , y T_3 .

V.4 DETERMINACIÓN DE ACTIVIDAD ESPECÍFICA

Los procedimientos seguidos para la determinación de β -galactosidasa (Método Miller) y Proteínas Totales (Método Lowry) se encuentran en Molecular Biological Methods for *Bacillus*.(Youngman *et al.*, 1990)

La actividad específica se determinó según la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Unidades de } \beta\text{-galactosidasa}}{\text{mg de Proteína}} = \text{Act. Esp (U.M.)} = \frac{\text{D.O.}_{420} \times \epsilon = 380 \times 1000 \times \text{dilución}}{\text{alícuota} \times 15 \times \text{mg proteína}}$$

V.5 DESARROLLO DE FOOTPRINTING *in-vivo*

Ya que uno de los objetivos más importantes de esta tesis fue estandarizar el método de footprinting *in-vivo* para *Bacillus subtilis* a continuación se describe el procedimiento de manera detallada.

- Tomar 20 ml de la primera muestra a las 5.5 h de haber inoculado el Fernback (T_0).
- Pasar a matraz de 250 ml que contenga 16 μ l de DMS. Incubar 4' a 37 °C y 300 rpm.
- Pasar rapidamente a un tubo con 10 ml de buffer I congelado (150 mM NaCl, 100 mM EDTA pH=8) y mezclar bien.
- Separar la muestra en dos tubos de 15 ml.
- Centrifugar 5' a 3500 rpm y 4 °C.
- Lavar con 10 ml buffer I frío.
- Centrifugar 5' a 3500 rpm y 4 °C.

- Tirar sobrenadante y congelar pellet en hielo seco.
- Repetir el procedimiento en T_1 , T_2 y T_3 .
- Resuspender cada una de las muestras con 217 μ l de la solución A: 150 mM NaCl, 15 mM EDTA, 60 mM Tris pH=7. Ya que de cada muestra hay dos tubos se concentran y luego se añade 25 μ l de lisozima (10 mg/ml) + 10 μ l RNAsas
- Incubar 10' a 37 °C
- Añadir 40 μ l de 12.5 % SDS. Incubar a 37 °C por 30'.
- Añadir 5 μ l de proteinasa K para obtener una concentración final de 50 μ g/ml, agitar suavemente, incubar a 37 °C toda la noche.
- Pasar la muestra a 2 tubos Eppendorf de 1.5 ml (aproximadamente 500 μ l por tubo).
- Lavar con 500 μ l de cloroformo, vortex y centrifugar 5' a 14.000 rpm. Repetir 2 veces.
- Agregar 250 μ l de fenol y dar vortex, agregar 250 μ l de cloroformo y dar vortex. Mezclar bien. Centrifugar 5' a 14000 rpm.
- Tomar la misma cantidad (400 ó 500 μ l) de todos los tubos para facilitar la adición del NaCl e isopropanol.(1/25 de ClNa 5M y 0.54 volúmenes de isopropanol). Mezclar bien.
- Centrifugar 7' a 14.000 rpm.
- Lavar 2 veces con etanol 70 % (tener cuidado de no perder el pellet).
- Secar en el SAVANT a 30 °C durante 10'.
- Resuspender en 100-150 μ l de T.E.(Depende de la D.O. de la muestra) sólo 1 juego de tubos, ya que el otro queda seco por ser mas estable.

- Verificar en gel de agarosa al 1.2 %.

ROMPIMIENTO CON PIPERIDINA

- 45 μ l de DNA + 5 μ l de piperidina se incuban a 90 °C por 30' (bien tapado)
- pasar a hielo 5'.
- centrifugar 5' a 14000 rpm.
- evaporar completamente el líquido en el SAVANT temp 45 °C aprox 1 hora
- añadir 40 μ l de agua y volver a secar. Este paso se repite 2 veces con el fin de sacar la piperidina.
- Guardar sin resuspender a -20 °C si no se va a utilizar inmediatamente o resuspender en 50 μ l de T.E.
- usar 10 μ l para PCR.

QUINADO DEL OLIGO CON ^{32}P

El marcado del oligo subtiC se realizó con γ - ^{32}P -ATP 3000 Ci/mmol (Nen Life Science, # catálogo BLU002H) ó 6000 Ci/mmol (Nen Life Science, # catálogo NEG002H)

El oligo debe estar a una concentración de 40 pmol, la cual se obtiene con base en la concentración original que viene detallada en el reporte de síntesis. En este caso es 1.99 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (294.23 pmol/ μl).

Luego se realiza el siguiente coctel en un tubo de tapa plana:

2 μ l de quinasa

3 μ l de γ - 32 P-ATP (cuando está nuevo. Si ya pasó la primera vida media se colocan 5 μ l)

1 μ l de primer 40 pmol

5 μ l de buffer de kinasas

39 μ l de H₂O

50 μ l $\rightarrow$ Se programa el termociclador 1 hora a 37 °C (si cumplió la primera vida media se deja 1.5 h.) Para inactivar se coloca 20 minutos a 65 °C.

PURIFICACIÓN DEL OLIGO QUINADO

Para separar la marca no incorporada se utilizan columnas MicroSpin G-25 (Amersham Pharmacia Biotech #catálogo 27-5325-01) de la siguiente forma:

1. Dar vortex a la columna para resuspender la resina.
2. Aflojar ¼ de vuelta la tapa y quitarle la parte de abajo.
3. Colocar la columna en un Eppendorf de 1.5 sin tapa y centrifugar 1 min a 3000 rpm (735 g) para preequilibrarlo.
4. Descartar el Eppendorf y colocar la columna en un tubo nuevo y lentamente aplicar el producto del quinado en el centro de la cama de resina cuidando de no disturbarla.
5. Centrifugar la columna 2 min a 3000 rpm.
6. Se recuperan 50 μ l de muestra purificada y se colocan en un tubo nuevo.
7. Descartar la columna con la marca no incorporada.

PCR PARA FOOTPRINTING

H ₂ O	73 µl
Buffer de PCR sin MnCl ₂	5 µl
MnCl ₂	3 µl
dNTPs	3 µl
DNA tratado con DMS y piperidina	10 µl
Oligo marcado con ³² P	3 µl
Taq polimerasa C.I.C.E.S.E.	<u>3 µl</u>
	100 µl

Generalmente se procesan al mismo tiempo 8 ó 12 muestras, y en estos casos se realiza un coctel de H₂O, buffer, MnCl₂ y dNTPs. Este coctel se agrega al tubo de PCR con el DNA correspondiente, se coloca en la máquina 10' a 95 °C y se pasa a hielo 5'. Posteriormente se agrega el oligo marcado y la Taq y comienzan los ciclos.

CONDICIONES DE PCR PARA FOOTPRINTING

1' a 95 °C

1' a 60 °C 30 ciclos

1' a 72 °C

10' a 72 °C

- Una vez terminada la reacción de PCR agregar 4 µl de NaCl 5M, 250 µl de Etanol 100 %, pasar a hilo seco 15', centrifugar 15' a 12.000 rpm. Descartar el sobrenadante pegando el tubo a un vaso y lavar con 100µl de etanol al 70 %.

- Invertir el tubo varias veces y nuevamente centrifugar 15'. Descartar el sobrenadante y secar en VACUFUGUE a 30 °C. Cuando se va a correr el gel resuspender en 10 µl de colorante de secuencia y calentar las muestras 10' a 80 °C.

V.6 SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN REGULADORA DE *aprE*

Para secuenciar la región reguladora de *aprE* se realiza un PCR de 100 µl con los oligos subtiC (hibrida en la región -388 a -410) y subtiE (hibrida en la región -83 a -106) utilizando como DNA molde 1 µl de pSub1. Este PCR se verifica en gel de agarosa al 1.2 % y se precipita de la siguiente manera:

1. Se lleva a 200 µl con H₂O filtrada estéril.
2. Se agregan 100 µl de fenol. Mezclar dando vortex. Luego 100 µl de cloroformo. Vortex.
3. Centrifugar 5' a 12000 rpm.
4. Se recuperan 200 µl de fase acuosa y se le agrega 8 µl de NaCl 5 M y 500 µl de Etanol absoluto.
5. Se deja 1 hora en hielo seco.
6. Se centrifuga 5' a 12000 rpm.
7. Decantar suavemente pegando el tubo a un vaso.
8. Lavar con 1 ml de etanol al 70 % frío.
9. Se centrifuga 5' a 12000 rpm. Decantar.
10. Secar 10' en fase alcohol en VACUFUGUE y resuspender en 20 µl de T.E.

11. Se verifica cargando 2 μ l en gel de agarosa al 1.2 % (pequeño).

Una vez que se tiene el producto de PCR purificado se utiliza para la secuenciación, la cual se realiza de la siguiente manera utilizando el ThermoSequenace Cycle Sequencing Kit (USB, #catálogo US78500):

- Colocar en 1 tubo para PCR 4 μ l ddATP. Repetir para ddGTP, ddCTP y ddTTP. Tapar y rotular correctamente los 4 tubos.

- En un tubo de 0.5 ml realizar el siguiente coctel:

3 μ l de DNA (producto de PCR purificado)

4.5 μ l de H₂O

2 μ l de buffer

6 μ l de primer marcado

2 μ l de DNA polimerasa Thermosequenace

17.5 μ l

- Retirar 4 μ l del coctel y agregárselo a al tubo de PCR con ddATP. Mezclar pipeteando.

Repetir para los otros 3 tubos.

- Colocar 50 μ l de aceite mineral en cada tubo y poner en el termociclador.

CONDICIONES DE PCR PARA SECUENCIA

10' a 95 °C

1' a 95 °C

1' a 55 °C

30 CICLOS

1' a 72 °C

10' a 72 °C

- Una vez concluido agregar 4 μ l de la solución STOP a cada tubo y centrifugar para separar el aceite mineral de la fase acuosa. Retirar 10 μ l cuidando de no tomar aceite y colocarlos en un tubo limpio.
- Se congelan máximo 1 semana.
- Cuando el gel está listo se calientan las muestras a 80 °C por 10' y se colocan 5 μ l en cada carril.

V.7 ELECTROFORESIS

Correr las muestras en un gel que contenga:

40 % Acrilamida/bisacrilamida (19:1)	9.45 ml
Urea ultrapura	36 g
10 x buffer TBE	7.5 ml
agua destilada	30.1 ml
10 % persulfato de amonio	600 μ l
TEMED	30 μ l

El buffer TBE 10x se prepara: 108 g de TRIS BASE, 55 g de ácido bórico y 9.3 g de EDTA. Se lleva a 1 L con agua DESTILADA y se autoclava. El pH debe ser 8.3. Para la electroforesis se utiliza el mismo buffer que para el gel pero se utiliza 1x (100 ml de buffer 10x se llevan a 1 L con agua DESTILADA).

El gel debe estar precalentado hasta que alcance por lo menos 45 °C. Una vez que está precalentado se cargan las muestras de footprinting y secuencia (orden G-A-T-C)

cuidando de haber limpiado los carriles con una jeringa con buffer y cargando las muestras con puntillas planas.

Es importante cuidar el voltaje para obtener siempre 45 watts (aproximadamente 2000 Volts).

Una vez que el primer colorante se ha salido completamente se desmonta la cámara, y con cuidado se separan los vidrios, cuidando que el gel no se rompa ni se "arrugue". En ese momento se levanta con ayuda de papel filtro especial y se envuelve con ega-pack.

En estas condiciones se coloca en el secador y se programa para 45' a 80 °C utilizando el segundo programa (ascenso rápido de temperatura). Verificar que haya vacío.

Una vez que el gel está seco se coloca en el cassette junto a una placa autográfica y se deja a -70 °C durante 14 h. Si se quiere obtener mayor resolución se puede dejar más tiempo.

La placa se revela en condiciones apropiadas de luz dejando 2' con revelador, 1' de lavado en agua, 2' en fijador y 1' final de lavado con agua.

VI.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

VI.1 CONSTRUCCIÓN DE CEPAS

En la tabla II se presentan los resultados obtenidos con respecto a la transformación de las cepas utilizadas en este trabajo.

Tabla II: Resultados de las transformaciones.

CEPA	CONCENTRACIÓN DE ATB	RESULTADO DE LA TRANSFORMACIÓN
<i>sinI</i> ⁻	KANAMICINA 5 mg/ml	30 COLONIAS POR CAJA
<i>sinRI</i> ⁺⁺⁺	CLORANFENICOL 5 mg/ml	10 COLONIAS POR CAJA
<i>w.t.</i> (Sp ^r)	ESPECTINOMICINA 100 µg/ml	50 COLONIAS POR CAJA
<i>sinR</i> ⁻	PHLEOMICINA 5 mg/ml	4 COLONIAS POR CAJA
<i>sinR/hpr</i> ⁻	PHLEOMICINA 5 mg/ml	10 COLONIAS POR CAJA

Posteriormente se traspasaron todas las colonias obtenidas a LB-Xgal para verificar que la fusión transcripcional *aprE-lacZ* no había sido dañada. Para el caso de la cepa *sinR*⁻ hubo 1 colonia blanca y para la doble mutante *sinR/hpr*⁻ se presentaron 3 colonias blancas las cuales se descartaron. Cabe destacar que la cepa *sinR*⁻ presentó siempre eficiencias de transformación muy bajas, por lo que se repitió varias veces obteniendo siempre el mismo resultado.

VI.2 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO

De cada una de las cepas analizadas en este trabajo se realizó por triplicado su cinética de crecimiento en medio Schaeffer utilizando la cepa *w.t.* como referencia. Para todas las cepas analizadas se llegó a T_0 a las 5.5 hs de inoculado el Fernback. A partir de ese momento y cada hora se tomaron las muestras como se describe en materiales y métodos.

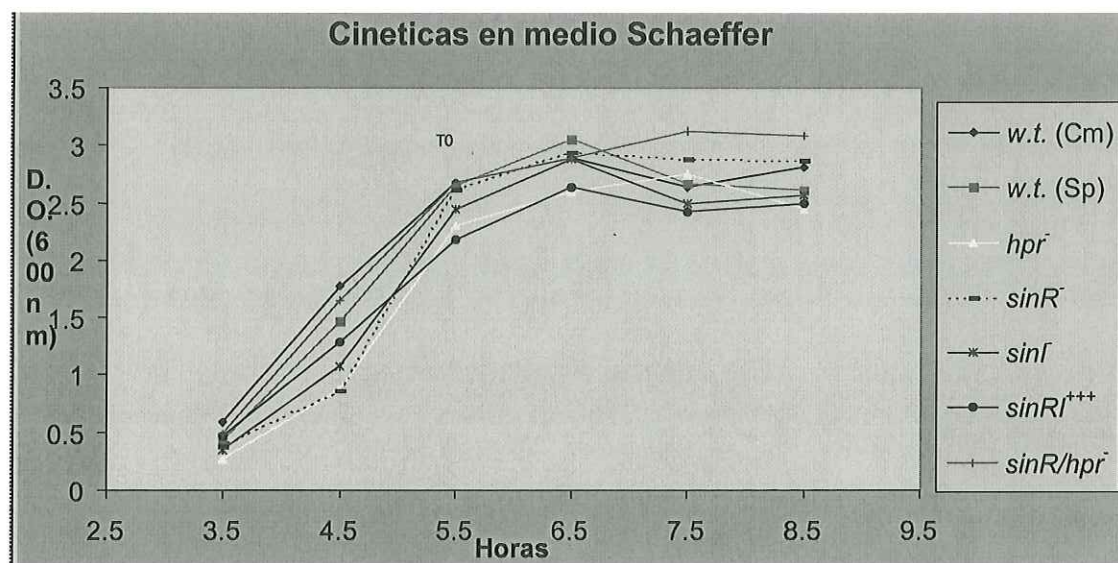


Figura 5: Cinéticas de crecimiento para todas las cepas analizadas.

Para todas las cepas se observa un comportamiento similar aunque es notoria la baja D.O. que alcanza la cepa *sinRI+++*, posiblemente debido a que tiene mayor carga metabólica por tener en alto número de copias un operón con un promotor fuerte, el que podría estar secuestrando RNA Polimerasa, la cual debería estar transcribiendo genes estructurales para producir proteínas para crecimiento.

VI.3 ACTIVIDAD ESPECÍFICA

En la tabla III se presentan los valores de Actividad Específica para cada una de las cepas analizadas en el tiempo T_2 . Cabe destacar que son valores promedio obtenidos de 3 curvas de crecimiento y que cada muestra fue analizada por duplicado. Debido a que los datos fueron altamente repetitivos no se realizó análisis estadístico.

Tabla III: Resultados de Actividad Específica para T_2 en Unidades Miller (U.M.)

Cepa	Actividad obtenida en T_2	Actividad reportada en T_2
<i>w.t.</i> (Cm^r)	2300 U.M.	2300 U.M. (Olmos <i>et al.</i> 1996 b)
<i>w.t.</i> (Sp^r)	4500 U.M.	-
<i>sinR</i> ⁻	7000 U.M.	3 veces más proteasa (Gaur <i>et al.</i> 1986)
<i>sinR</i> ⁻	Sin Actividad	1000 U.M. (Olmos <i>et al.</i> 1996 b)
<i>hpr</i> ⁻	12000 U.M.	12000 U.M. (Olmos <i>et al.</i> 1996 b)
<i>sinR/hpr</i> ⁻	15000 U.M.	6000 U.M. (Olmos <i>et al.</i> 1996 b)
<i>sinI</i> ⁻	470 U.M.	-
<i>sinRI</i> ⁺⁺⁺	200 U.M.	-

Para el caso de la cepa *w.t.* (Cm^r) se obtuvo el valor previamente reportado (Olmos, 1996 b). En la cepa *w.t.* (Sp^r) el valor de Actividad Específica se duplicó con respecto a la *w.t.* (Cm^r), posiblemente debido a cambios en la topología del DNA en el locus de *amy* ya que se comprobó que la fusión transcripcional *aprE-lacZ* no fue dañada. Cabe destacar que el valor de Actividad Específica de esta cepa nunca ha sido reportado.

Para el caso de la mutante *sinR*⁻ (BGSC) se presentó una actividad 3 veces superior a la *w.t.* (Cm^r), lo cual coincide con las conclusiones de Gaur *et al.* (1991), sin embargo, como se expuso anteriormente, en este trabajo no presentan datos experimentales. La cepa analizada por Olmos *et al.* (1997) en la que observan una disminución del 50% con respecto a la *w.t.* (Cm^r) no presentó actividad, posiblemente debido a que fue mantenida a 4 °C y no a -70 °C.

Sin embargo, los datos obtenidos para las mutantes *sinI*⁻ y *sinRI*⁺⁺⁺ reafirman la hipótesis de que SinR es un represor de la expresión de *aprE*, ya que la cepa que contiene al operón *sinRI* en plásmido multicopia presenta una represión casi total de la expresión del gene *aprE*, mientras que la cepa que tiene interrumpido el gene *sinI*, y que por lo tanto se comporta como sobreexpresora de SinR, también mostró una represión significativa dando aproximadamente el 25 % de la actividad de la cepa *w.t.* (Cm^r). Para el caso de estas cepas los valores de Actividad Específica nunca se han reportado, aunque en el trabajo de Bai *et al.* (1993) reportan una actividad similar para el caso de la cepa *sinI*⁻ pero sobre la expresión de la fusión transcripcional *spoIIA-lacZ*. A su vez, en el trabajo reportado por Olmos *et al.* (1996 b) demuestran que la cepa *spo0A9V* presenta una actividad específica de 394 U.M. en T₂, y concluyen que este valor se debe a que en la mutante *spo0A9V* el gene *sinI* está reprimido y por lo tanto SinR está sobreexpresado.

Finalmente se estudió el efecto de la mutación *hpr*⁻, la cual coincidió con lo reportado por Olmos (1996 b). Para verificar una vez más el comportamiento de la cepa *sinR*⁻ se construyó la doble mutante *sinR/hpr*⁻ ya que Olmos (1996 b) reportaba que en esta doble mutante se obtenía un valor del 50 % con respecto a la cepa parental *hpr*⁻. Como se

observa en la tabla III, en este trabajo la doble mutante presentó un valor más alto que la cepa parental *hpr⁻*, lo cual indicaría que bajo estas condiciones ambas proteínas se comportan como represoras de la expresión del gene estudiado y que su efecto es sinérgico ya que se obtiene un valor 7 veces mayor que el de la cepa *w.t.*.

VI.4 SECUENCIACIÓN DE LA REGIÓN REGULADORA DE *aprE*

En la figura 6 se presenta la secuencia del producto de PCR realizado con los oligos subti C y subti E utilizando como DNA molde el pSub1. A un lado están marcados los sitios de unión de algunos de los reguladores de estadio de transición.

Si bien la resolución de la secuencia no es de excelente calidad, ésta nos permitió situarnos en el DNA y poder localizar los sitios de interacción de las proteínas previamente reportados por otros autores y de esta manera utilizarlo como control para los footprintings.

Debido a que los oligos subti C y subti E amplifican la región que comprende entre el -410 y el -83, las bases que comprenden del -83 en adelante, y que corresponden a los sitios de unión de Hpr3, Hpr4 y AbrB, no se pudieron secuenciar, si bien en los footprintings aparecen porque éstos fueron realizados de manera lineal sólo con subti C. Asimismo, el sitio de unión de Spo0A que comprende desde el -389 a -383 no pudo ser identificado correctamente debido a que la secuencia en esta región se presentaba de manera poco clara.

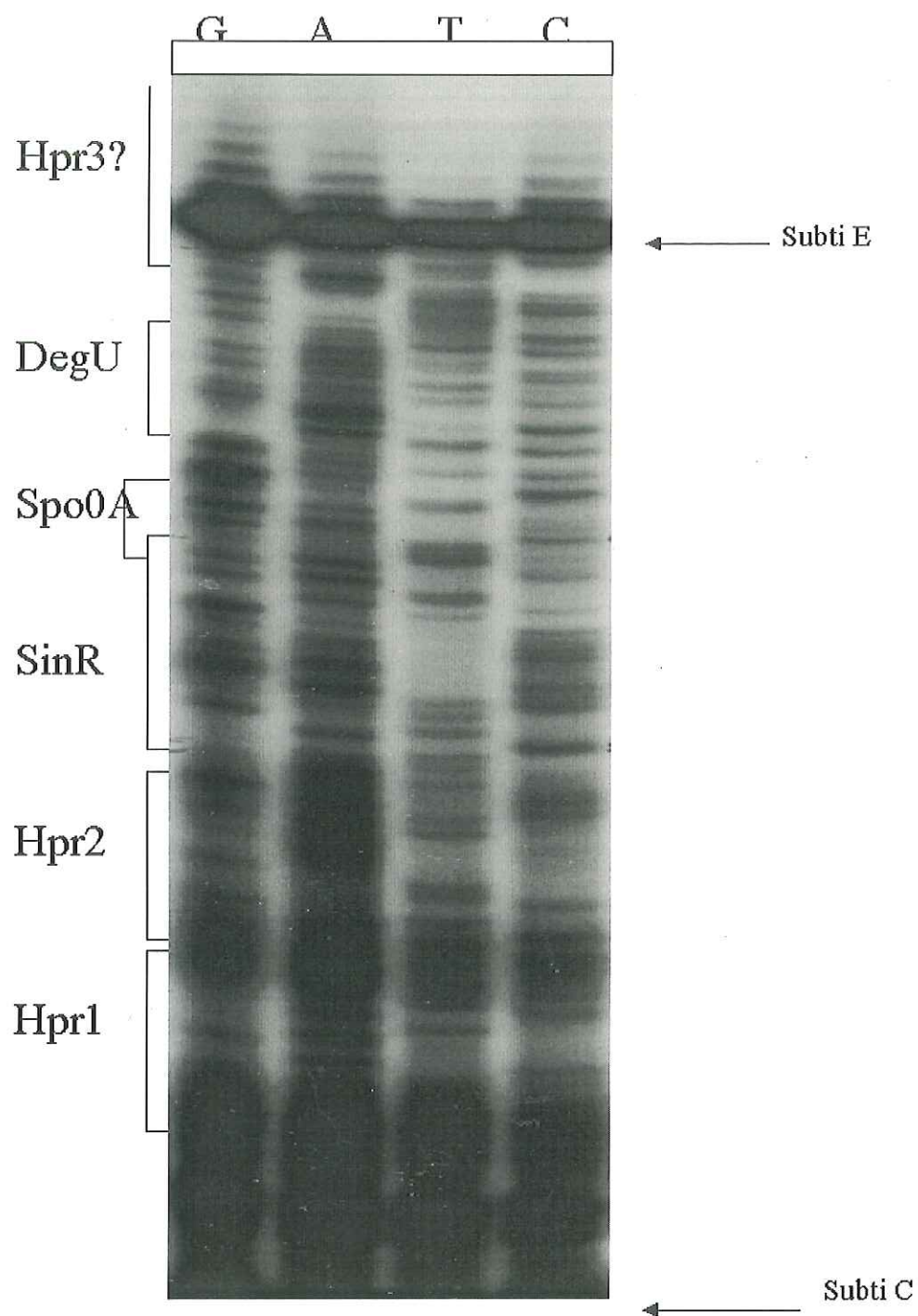


Fig 6: Secuencia de la región de regulación de *aprE*.

VI.5 FOOTPRINTING *in-vivo*.

A continuación se presentan las tablas IV, V y VI con el análisis de las figuras 7, 8 y 9 respectivamente. Por lo explicado anteriormente con respecto a la secuencia el sitio de unión de Spo0A en la región del -389 al -383 se la nombró como SITIO DE UNIÓN DE Spo0A? ya que no pudo ser determinado claramente. Asimismo, para la región que abarca desde el -83 en adelante se la nombró como SITIO DE UNIÓN DE Hpr3?, si bien en esta región está reportado que interaccionan Hpr3, Hpr4 y AbrB. Basándose en la literatura y como se explicó anteriormente también en esta región podría estar el sitio de unión de SinR cercano al promotor determinado por Gaur *et al.* (1991) mediante gel de retardamiento o el sitio determinado por Sánchez (1999) mediante análisis computacional.

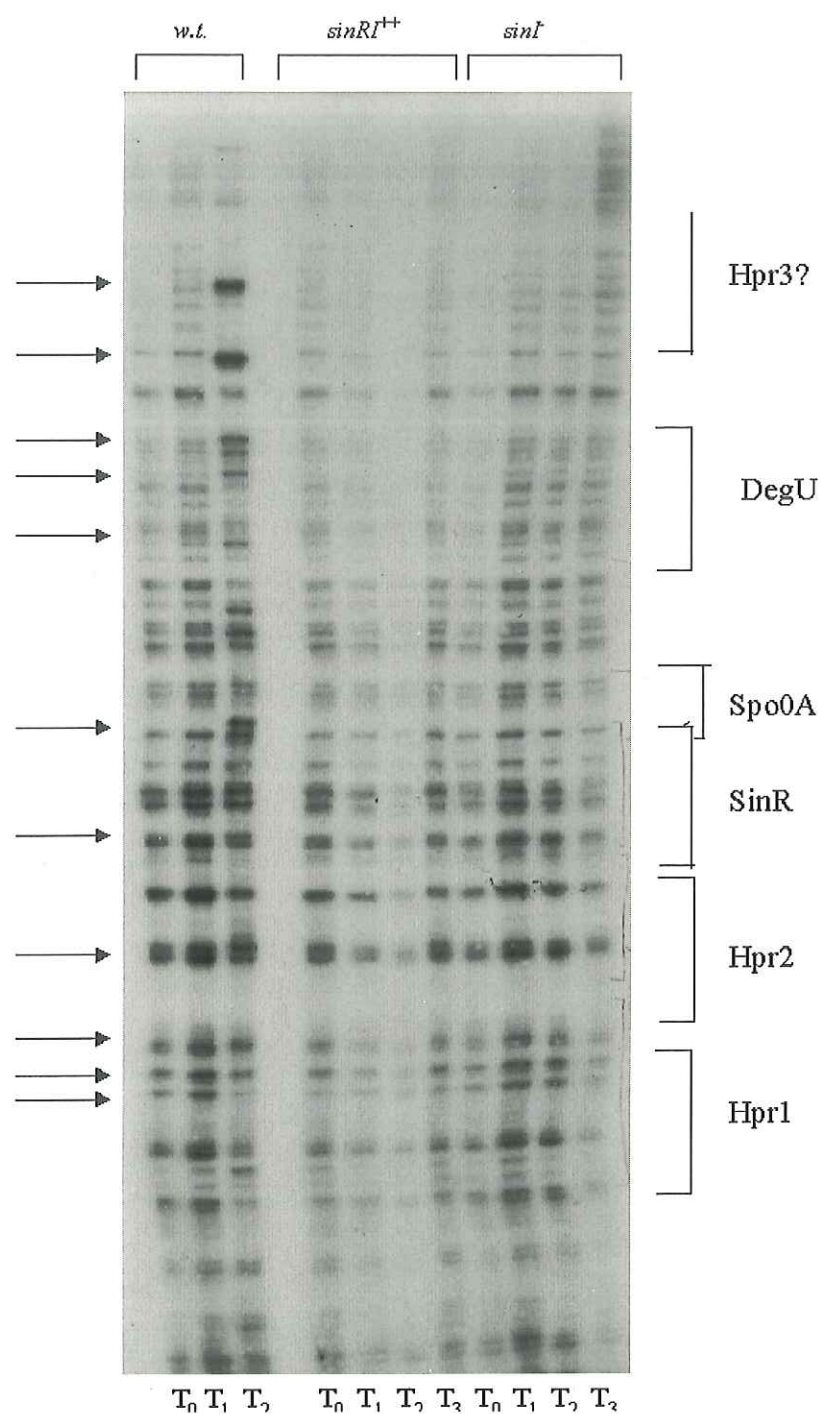


Fig 7: footprinting *in-vivo*. Autorradiografía 1.

Tabla IV: Análisis de la figura 7

	CEPA <i>w.t.</i>	CEPA <i>sinRI</i> ⁺⁺⁺	CEPA <i>sinI</i>
SITIO DE UNIÓN DE Hpr3?	Se observan 2 hipermetilaciones muy notables en T ₂ .	No se observan los mismos cambios que en la <i>w.t.</i> , pero en T ₃ se presenta un bandeo intenso.	No se observan los mismos cambios que en la <i>w.t.</i> , pero en T ₃ se presenta un bandeo muy intenso.
SITIO DE UNIÓN DE DegU	Se observan cambios de T ₁ a T ₂ como hipermetilaciones o protecciones.	Se presenta el mismo patrón que en T ₁ en la cepa <i>w.t.</i>	Se presenta el mismo patrón que en T ₁ en la cepa <i>w.t.</i>
SITIO DE UNIÓN DE Spo0A	Aparece una banda en T ₂ .	No hay cambios notables.	Se presenta el mismo patrón que en T ₁ en la cepa <i>w.t.</i>
SITIO DE UNIÓN DE SinR	Se presenta un leve cambio en T ₁ .	La resolución del gel no permite observar si hay cambios notables.	Aparece el mismo cambio que en la <i>w.t.</i> en T ₁ .
SITIO DE UNIÓN DE Hpr2	Se observa una banda muy marcada en T ₁ . En T ₂ se observa un leve cambio en la banda inferior.	La resolución del gel no permite observar si hay cambios notables.	Se observa la misma banda marcada que en la <i>w.t.</i> en T ₁ . Sin embargo la banda inferior de T ₂ no es tan notoria como en la <i>w.t.</i>
SITIO DE UNIÓN DE Hpr1	De T ₀ a T ₁ se observan 3 bandas hipermetiladas. Una de ellas en T ₂ desaparece.	Las metilaciones no son tan fuertes como en la <i>w.t.</i> . Aparentemente todas las bandas están presentes en las 4 muestras.	Se observan las tres mismas bandas metiladas que en la <i>w.t.</i> , pero todas continúan en T ₂ .
SITIO DE UNIÓN DE Spo0A?	No se resuelve esta región.	No se resuelve esta región.	No se resuelve esta región.

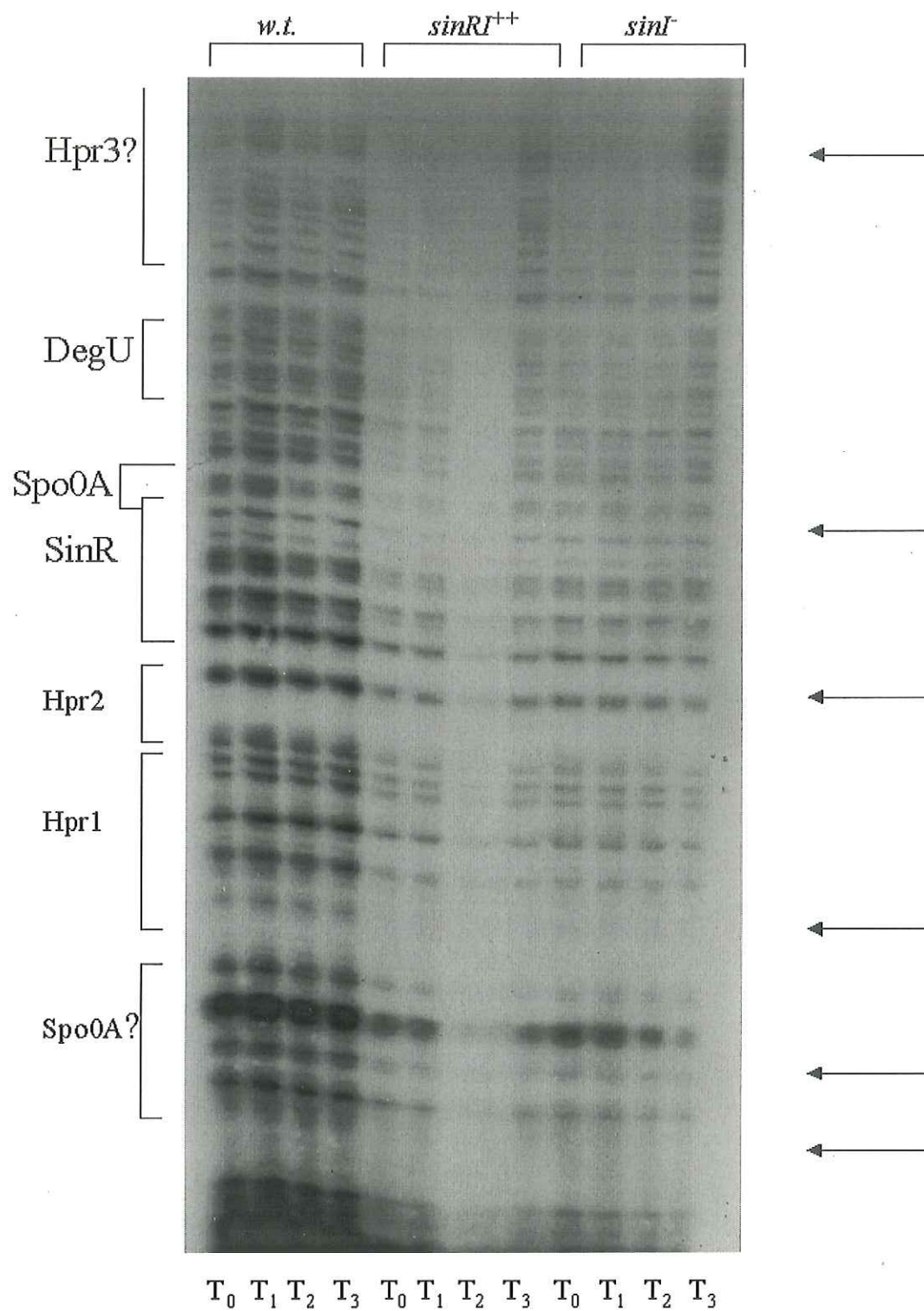


Fig 8: Footprinting *in-vivo*. Autorradiografia 2.

Tabla V: Análisis de la figura 8

	CEPA <i>w.t.</i>	CEPA <i>sinRI</i> ⁺⁺⁺	CEPA <i>sinI</i>
SITIO DE UNIÓN DE Hpr3?	El patrón de bandeo es constante para los 4 tiempos.	La calidad del gel sólo permite observar un bandeo muy intenso en T ₃ , el cual se presenta también en la figura 5.	Se observa un patrón similar al de la <i>w.t.</i> pero en T ₃ se observa un bandeo muy intenso, el cual se presenta también en la figura 5.
SITIO DE UNIÓN DE DegU	No hay cambios notables.	No hay cambios notables.	No hay cambios notables.
SITIO DE UNIÓN DE Spo0A	No se observa la hipermetilación que se presentaba en la figura 5.	No hay cambios notables.	No hay cambios notables.
SITIO DE UNIÓN DE SinR	No hay cambios notables. No se presenta el mismo patrón que en la figura 5	No hay cambios notables.	No hay cambios notables.
SITIO DE UNIÓN DE Hpr2	Se observa una banda muy marcada en T ₁ . En T ₂ no se observa cambio en la banda inferior.	No hay cambios notables.	No se observa la misma banda marcada que en la <i>w.t.</i> en T ₁ ni la banda inferior de T ₂ .
SITIO DE UNIÓN DE Hpr1	No se observan los cambios analizados en la figura 5. Se observa hipermetilación constante en todas las muestras.	La resolución del gel en esta sección no permite establecer relaciones claras con respecto a cambios en el patrón de bandeo, si bien se observa que falta la banda inferior.	Se observa que falta la banda inferior.
SITIO DE UNIÓN DE Spo0A?	Se observan bandas hipermetiladas en todas las muestras .	Faltan las bandas inferiores.	Faltan las bandas inferiores.

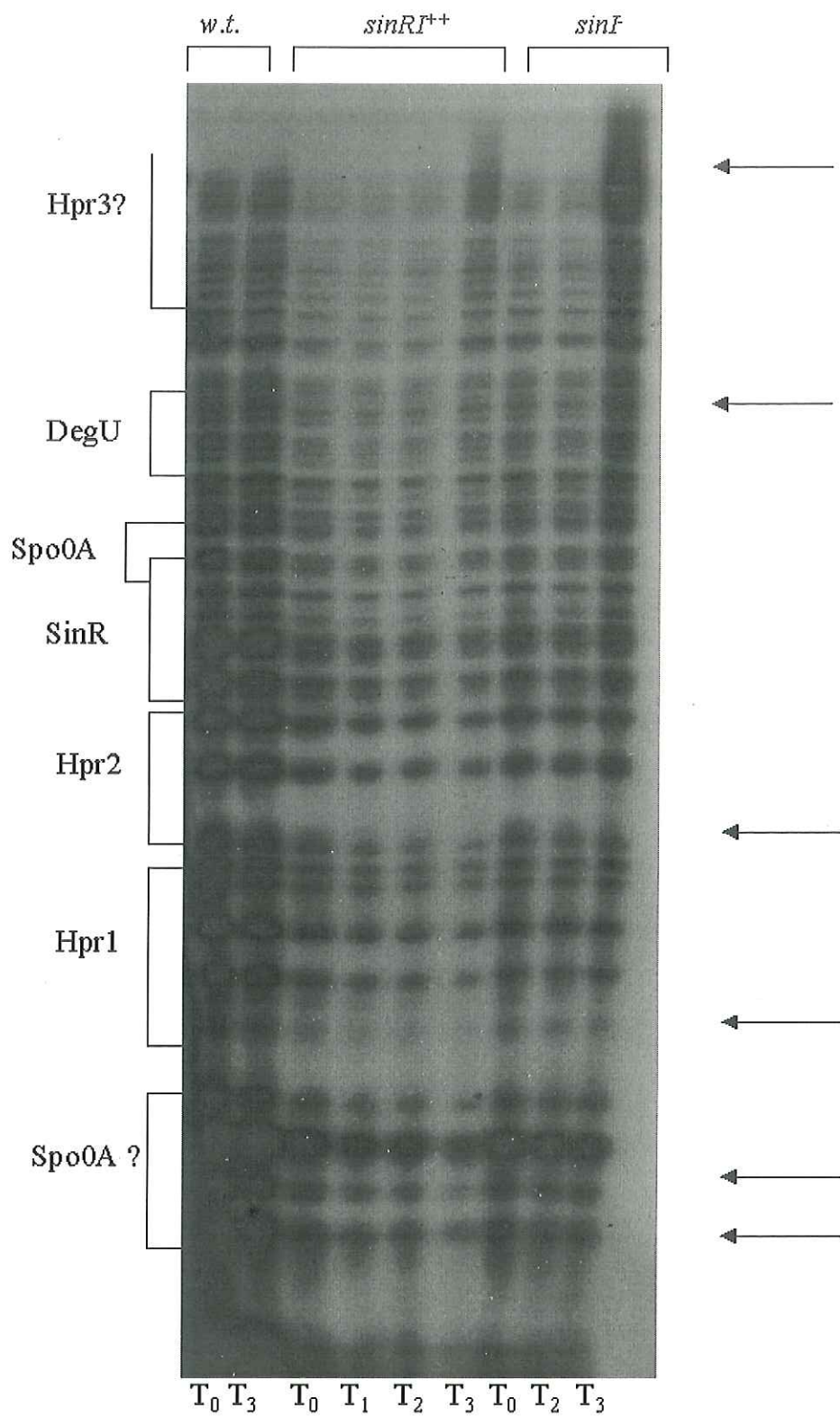


Fig 9: Footprinting *in-vivo*. Autorradiografia 3.

Tabla VI: Análisis de la figura 9

	CEPA <i>w.t.</i>	CEPA <i>sinRI</i> ⁺⁺⁺	CEPA <i>sinI</i>
SITIO DE UNIÓN DE Hpr3?	En T ₃ no se observa el bandeo presente en las otras dos cepas .	De T ₀ a T ₂ se observa protección de esta región mientras que en T ₃ esta región está hipermetilada, lo cual también se ve en las figuras 5 y 6.	De T ₀ a T ₂ se observa protección de esta región mientras que en T ₃ esta región está hipermetilada, lo cual también se ve en las figuras 5 y 6.
SITIO DE UNIÓN DE DegU	No hay cambios notables.	No hay cambios notables.	Se presenta el mismo patrón de bandeo pero más intenso.
SITIO DE UNIÓN DE Spo0A	No se observa la hipermetilación que se presentaba en la figura 5.	No hay cambios notables.	Se presenta el mismo patrón de bandeo pero más intenso.
SITIO DE UNIÓN DE SinR	No hay cambios notables. No se presenta el mismo patrón que en la figura 5.	No hay cambios notables.	No hay cambios notables.
SITIO DE UNIÓN DE Hpr2	Se observa el mismo patrón que en la figura 6.	La banda inferior en T ₁ , T ₂ y T ₃ se encuentra protegida con respecto a la <i>w.t.</i>	Se presenta un patrón similar al de la cepa <i>sinRI</i> ⁺⁺⁺ pero menos definido.
SITIO DE UNIÓN DE Hpr1	Se observa el mismo patrón que en la figura 6.	Si bien se presenta el mismo patrón las bandas inferiores se protegen.	Se presenta el mismo patrón que en la <i>w.t.</i> y las bandas inferiores están menos protegidas.
SITIO DE UNIÓN DE Spo0A?	Se observa el mismo patrón que en la figura 6.	Nuevamente hay bandas que desaparecen con respecto a la <i>w.t.</i> , aunque este cambio se aprecia mejor en la figura 6.	Nuevamente hay bandas que desaparecen con respecto a la <i>w.t.</i>

Como se observa en las figuras correspondientes a los footprintings y con base en otros geles que aquí no se presentan, los cambios más repetitivos presentes en la región de regulación de *aprE* fueron los encontrados en el SITIO DE UNIÓN DE Hpr3?. Para las cepas *sinRI*⁺⁺⁺ y *sinI*⁻ en los tiempos T_0 , T_1 y T_2 encontramos que esta región presenta bandas protegidas, lo que implica que hay interacción DNA-proteína, mientras que en T_3 estas bandas se encuentran hipermetiladas, lo que implica que una proteína que estaba pegada ya no interacciona en ese sitio. Debido a que estas cepas son sobreproductoras de SinR se podría especular que en la región SITIO DE UNIÓN DE Hpr3? SinR interacciona de manera directa o indirecta. En la cepa *w.t.* este cambio no se observa, lo que podría indicar que a niveles fisiológicos esta interacción no ocurre o que no es apreciable a causa del bajo nivel de proteína presente en la cepa *w.t.*.

Con base en lo mencionado y debido a que esta región no fue secuenciada, se podrían formular las siguientes hipótesis:

1) Si pensamos que éste es el sitio de unión de SinR cercano al promotor, podría pensarse que al menos bajo condiciones de sobreproducción, SinR se pega en esta región de T_0 a T_2 y se despega en T_3 . Ya que en la cepa carente de SinI este patrón se mantiene, podría especularse que SinR se puede despegar de la región de regulación de *aprE* sin la intervención de su antagonista, posiblemente debido a que esta proteína en T_3 se degrada, lo cual es lógico si pensamos que en T_3 la esporulación es un proceso irreversible.

2) En cambio, si pensamos que es el sitio de unión de Hpr3 o Hpr4, los cambios en el patrón de bandeo de esta región podrían indicar que hay interacción entre SinR y Hpr, al menos bajo condiciones de sobreproducción de SinR.

3) Para el caso de que éste fuera el sitio de unión de AbrB con los datos experimentales con que se cuenta no se podría formular una hipótesis clara.

La hipótesis 2 se complementa al considerar que en el SITIO DE UNIÓN DE Hpr2 se observa una protección muy marcada en la cepa *sinRI*⁺⁺⁺ en todos los tiempos, y que no es apreciable en la cepa *w.t.*, lo cual coincide con lo observado por Olmos en sus experimentos de footprinting *in-vivo* (Com. Pers). Cabe mencionar que esta protección no se ve de manera tan clara en la cepa *sinI*. Otra región de protección similar pero menos notoria se observa en el SITIO DE UNIÓN DE Hpr1 también para la cepa *sinRI*⁺⁺⁺, lo cual reafirmaría esta hipótesis.

VII.- CONCLUSIONES PUNTUALES

♣ Con base en los resultados obtenidos en las cepas analizadas, la proteína SinR tiene un papel represor en la expresión del gene *aprE*. Esta conclusión se sustenta con los datos aportados por las cepas *sinI* y *sinRI*⁺⁺⁺, las cuales nunca han sido reportadas. Asimismo, la doble mutante *sinR/hpr* presenta una actividad superior a la cepa parental *hpr*, lo cual indicaría que estas proteínas son represoras y su actividad es sinérgica.

♣ Con respecto a los footprintings se ha montado la metodología completa en el laboratorio de Microbiología Molecular del C.I.C.E.S.E., lo cual representa un avance tecnológico importante, ya que para nuestro conocimiento, en esta región de México es el único laboratorio que maneja este tipo de técnicas. Sin embargo es necesario obtener una mayor resolución en los geles para poder observar cambios puntuales con mayor grado de exactitud. Aunque se observan cambios en el patrón de bandeo que no se repiten en todos los geles, para el caso del SITIO DE UNIÓN DE Hpr3 se observa una región protegida y luego hipermetilada en las cepas mutantes *sinI* y *sinRI*⁺⁺⁺, lo cual indicaría que hay interacción entre las proteínas SinR y Hpr o que éste es el sitio de unión *in-vivo* de SinR cercano al promotor.

También es notoria la región de protección en el SITIO DE UNIÓN DE Hpr2, lo que podría estar indicando la interacción de SinR con Hpr, al menos bajo estas condiciones. Asimismo, para el SITIO DE UNIÓN DE Hpr1 se observa un patrón similar, lo que le daría más fuerza a esta hipótesis.

♣ El sitio de unión de SinR previamente determinado mediante footprinting *in-vitro* por Gaur *et al.* (1991) no presentó regiones con cambios notables cuando en el footprinting *in-vivo* de este trabajo, lo cual podría significar que SinR *in-vivo* no interaccione con esta región, si bien habría que determinar si hay diferencias con el patrón de bandeo en la cepa *sinR⁻* y obtener geles con mayor resolución.

♣ Tratando de encontrar una relación entre los valores de Actividad Específica que presentaron las cepas *sinI⁻* y *sinRI⁺⁺⁺*, con los cambios en la interacción DNA-proteína, podría pensarse que la disminución en la Actividad Específica es debido a los cambios en la interacción DNA-proteína en las regiones SITIO DE UNIÓN DE Hpr3?, SITIO DE UNIÓN DE Hpr2 y SITIO DE UNIÓN DE Hpr1. Sin embargo, habría que realizar footprinting de toda la región de regulación del gene en las cepas analizadas en este trabajo y en las cepas a las que se le midió la Actividad Específica, para obtener más datos relacionados y así poder determinar el papel que desempeña cada uno de esos reguladores en la expresión de la subtilisina.

VIII.- PERSPECTIVAS

- Construir la cepa mutante *sinR::Phl* en el laboratorio de Microbiología Molecular del C.I.C.E.S.E.. Medir su Actividad Específica y determinar cuál es el papel que desempeña esta proteína sobre la expresión del gene *aprE*.
- Repetir las cinéticas de crecimiento para tomar nuevas muestras para realizar footprinting *in-vivo* en las cepas analizadas en el presente trabajo.
- Realizar footprinting *in-vivo* de las mutantes construidas en este trabajo que no fueron analizadas mediante esta técnica.
- Utilizar otros oligos para poder abarcar toda la región de regulación del gene, inclusive las primeras 100 bases del gene estructural.
- Para corroborar la hipótesis 1 y saber si la proteína que interacciona en este sitio de manera directa o indirecta es SinR se debería realizar el fotprinting de estas cepas junto con la cepa *sinR*⁻ utilizando un oligo que hibride en una región más cercana al promotor para poder determinar de manera clara y precisa las interacciones que ocurren.
- Para corroborar la hipótesis 2 habría que dar seguimiento a la expresión de las proteínas sinR y SinI en las cepas estudiadas para determinar por un lado si el nivel de expresión de SinR disminuye en T₃ y por otro lado si es posible que SinR sin la intervención de su represor se desprege de la región de regulación de *aprE*.

BIBLIOGRAFÍA

Anagnostopulos, C., y J. Spizizen. 1961. "Requirements for transformation in *Bacillus subtilis*". J. Bacteriol. 81: 741-746 p.

Arbige, M.V., B.A. Bulthuis, J. Schultz y D. Crabb. 1993. "Fermentation of *Bacillus*" En: Sonenshein A.L., J. A. Hoch y R. Losick (eds). *Bacillus subtilis* and other Gram- positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics. American Society for microbiology, Washington, D.C., 871-895 p.

Atkinson, B., y I. Mavituna. 1991. "Biochemical engineering and biotechnology handbook". Segunda edición. Macmillan Publishers Ltd, N.Y. 1271 pp

Ausbel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith y K. Struhl. 1992. *Short Protocols in Molecular Biology*. Wiley and Sons (Eds) N.Y. 931 pp.

Bai, U., I. Mandic-Muler, y I. Smith. 1993. "SinI modulates the activity of SinR, a developmental switch protein *Bacillus subtilis*, by protein-protein interactions". *Genes and Development* 7: 139-148 p.

Burbulys, D., K. A. Trach y J. Hoch. 1991. "Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay". *Cell* 64: 547-552 p.

Ferrari, E., A.S. Jarnagin y B.F. Schmidt. 1993. "Commercial production of extracellular enzymes" En: Sonenshein A.L., J. A. Hoch y R. Losick (eds). *Bacillus subtilis* and other Gram- positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics. American Society for microbiology, Washington, D.C., 917-937 p.

Gaur, N. K., E. Dubunau, y I. Smith. 1986. "Characterization of a cloned *Bacillus subtilis* gene that inhibits sporulation in multiple copies". J. Bacteriol. 168: 860-869 p.

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

Gaur, N. K., J. Oppenheim, y I. Smith. 1991. "The *Bacillus subtilis* sin gene, a regulator of alternative developmental processes, codes for a DNA- binding protein". J. Bacteriol. 173: 678-686 p.

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

Kallio, P., J. E. Fagelson, J. A. Hoch, y M. A. Strauch. 1991. "The transition state regulator *hpr* of *Bacillus subtilis* is a DNA- binding protein". J. Biol. Chemist 266: 13411-13417 p.

Lewis, R.J., J.A. Brannigan, I. Smith, y A. J. Wilkinson. 1996. "Crystallitation of the *Bacillus subtilis* sporulation inhibitor SinR, complexed with its antagonist, SinI". FEBS Letters 378: 98-100 p.

Mandic-Muler, I., N. Gaur, U. Bai, y I. Smith. 1992. "Sin, a stage- specific repressor of cellular differentiation". J. Bacteriol. 174: 3561-3569 p.

Mandic-Muler, I., L. Doukhan, y I. Smith. 1995. "The *Bacillus subtilis* SinR protein is a repressor of the key sporulation gene spoOA". J. Bacteriol. 177: 4619-4627 p.

Msadeck, T., F. Kunst, D. Henner, A. Klier, G. Rapoport y R. Dedoner. 1990. "Signal transduction pathway controlling synthesis of a class of degradative enzymes in

Bacillus subtilis: Expression of the regulatory genes and analysis of mutations in *degS* and *degU*". J. Bacteriol 172: 824-834 p.

Olmos, J. 1996 (a). "Estudios sobre la regulación del gene *aprE* que codifica para la subtilisina en *Bacillus subtilis*". Tesis de Doctorado, Instituto de Biotecnología, UNAM, México. 56 pp.

Olmos, J.; V. Bolaños; S. Causey, E. Ferrari; F. Bolivar y F. Valle. 1996 (b). "A functional Spo0A is required for maximal *aprE* expression in *Bacillus subtilis*". FEBS Letters 381: 29-31 p.

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.

Perego, M. y J.A. Hoch. 1988. "Sequence analysis and regulation of the *hpr* locus, a regulatory gene for protease production and sporulation in *Bacillus subtilis*". J. Bacteriol. 170, 2560-2567 p.

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

Sambrook, J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. "Molecular Cloning, a laboratory manual". C. Nolan (Eds). Cold Spring Harbor Laboratory Press. N.Y. 879 pp.

Sánchez, A. 1999. "Mutagénesis del sitio de unión de la proteína SinR en la región reguladora del gen *aprE*". Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada. México. 51 pp.

Schaeffer, P., J. Millet y J.P. Aubert. 1965. "Catabolic repression of bacterial sporulation". Proc. Natl. Acad. Sci., 54 (3) : 704-711p.

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". J. Mol. Biol 12; 293 (5): 997-1004 p.

Slepecky, R. A. 1992. "What is a Bacillus?". En: Doi H.R. Mc Gloughlin M (eds). Biology of Bacilli: Applications to industry. Butterworth-Heinemann, Boston., 1-21pp.

Smith, I., I. Mandic-Muler, y N. Gaur. 1991. "The rol of negative control in sporulation". Res. Microbiol. 142: 831-839 p.

Smith, I. 1992. "Regulatory proteins that control late-grow development". En: Sonenshein A.L., J. A. Hoch and R. Losick (eds). *Bacillus subtilis* and other Gram- positive bacteria: Bioquemistry, physiology and molecular genetics. American Society for microbiology, Washington, D.C., 785-800 p.

Strauch, M.A., M. Perego, D. Burbulys y J.A. Hoch. 1989. "The transition state transcription regulator AbrB of *Bacillus subtilis* is autorregulated during vegetative growth". Molecular Microbiology 3:1203-1209 p

Strauch, M.A. y J.A. Hoch. 1992. "Control of postexponential gene expresion by transition state regulators". En Biology of Bacilli: Applications to Industry, ed. R.H. Doi y M. McGloughlin.. Butterworth- Heinemann. Boston 105-121 pp.

Youngman, P. 1990. "Molecular Biological Methods for *Bacillus*". C.R. Harwood y S.M. Cutting (Eds.) Wiley and Sons NY. 581 pp

Zubber, P., M.M. Nakano y M.A. Marahiel. 1993. "Peptide Antibiotics" En: Sonenshein A.L., J. A. Hoch y R. Losick (eds). *Bacillus subtilis* and other Gram- positive bacteria: Biochemistry, physiology and molecular genetics. American Society for microbiology, Washington, D.C., 897-916 p.