
REGULACIÓN DEL INICIO DE LA ESPORULACIÓN E HISTIDINA CINASAS: UN ANÁLISIS COMPARATIVO ENTRE *Bacillus subtilis* Y EL GRUPO *Bacillus cereus*

LAURA M. CASTAÑEDA-SANDOVAL, MAYRA DE LA TORRE, SERGIO CASAS-FLORES y MARÍA A. ISLAS-OSUNA

RESUMEN

La esporulación, que es una respuesta de quorum sensing, es un proceso de diferenciación celular mediado por moléculas de señalización, señales fisiológicas y ambientales. Se sabe que *Bacillus subtilis* detecta las señales metabólicas y ambientales y éstas son integradas a un sistema de transferencia secuencial de fosfatos. Las señales son detectadas por histidina cinasas que se autofosforilan y fosforilan, a su vez, a proteínas que actúan como reguladores de respuesta y activan la expresión de genes específicos de esporulación. Dada la importancia de *B. cereus* desde el punto de vista epidemiológico, el potencial para bioterrorismo de *B. anthracis* y la importancia en biotecnología agrícola de *B. thuringiensis*, la investigación sobre los mecanis-

mos moleculares de señalización y la regulación del inicio de la esporulación en estas bacterias del grupo *B. cereus* reviste especial interés. En esta revisión se discute la literatura sobre este tema, haciendo hincapié en las histidina cinasas y en el análisis comparativo de los genomas de *B. subtilis* y del grupo de *B. cereus*, en cuanto a las secuencias de posibles histidina cinasas y reguladores de respuesta. Cabe destacar que en los genomas del grupo *B. cereus* hay mayor número de histidina cinasas (10 a 14) y de reguladores de respuesta (7 a 11) putativos que en *B. subtilis* (6 histidina cinasas y 6 reguladores de respuesta), lo cual sugiere una mayor capacidad para responder a estímulos ambientales y metabólicos en estas bacterias.

El género *Bacillus* comprende una diversidad de bacterias Gram positivas aerobias, entre las cuales se hallan *B. subtilis*, el microorganismo modelo de estudio para bacilos esporulados, y las bacterias del grupo *B. cereus*. En estos bacilos el proceso de diferenciación celular, que culmina con la liberación de esporas, es una respuesta a condiciones ambientales hostiles, tales como bajos niveles de nutrientes, incluyendo oxígeno o un pH desfavorable (McKillip, 2000).

El grupo *B. cereus* está formado por seis especies: *B. cereus*, *B. anthracis*, *B. thuringiensis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides* y *B. weihenstephanensis* (Cherif *et al.*, 2003). *B. cereus* produce toxinas responsables de intoxicaciones alimentarias, *B. anthracis* es el agente causal del ántrax (Brunsing *et al.*, 2005) y *B. thuringiensis* es utilizado como bioinsecticida para el control biológico de plagas tales como insectos, ácaros y nemátodos (Schnepf *et al.*, 1998), debido a que produce distintas toxinas. Las toxinas

de *B. thuringiensis* más utilizadas en agricultura son las proteínas Cry, especialmente las de la familia Cry1A, que son tóxicas para lepidópteros y son sintetizadas durante la esporulación (Crickmore *et al.*, 1998).

La esporulación es un proceso de diferenciación celular muy conservado entre las bacterias, e involucra la regulación de la expresión temporal y espacial de varios genes a través de la utilización de factores de transcripción sigma (σ) de la ARN polimerasa. En *B. subtilis* los factores σ^F

PALABRAS CLAVE / *Bacillus subtilis* / *Bacillus thuringiensis* / Cry / Esporulación / Histidina Cinasa / Transducción de Señales /

Recibido: 10/09/2008. Aceptado: 07/05/2009.

Laura M. Castañeda-Sandoval. Maestría en Biotecnología, Universidad de Antioquia (UDEA), Colombia. Estudiante de Doctorado en Ciencias, Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD), México. Profesora, UDEA, Medellín, Colombia.

Mayra De La Torre. Doctora en Microbiología, Instituto Politécnico Nacional, México. Investigadora, CIAD, Sonora, México.

Sergio Casas-Flores. Doctor en Ciencias, Universidad de Guanajuato, México. Investigador, Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica, A.C., San Luis Potosí, México.

María A. Islas-Osuna. Doctora en Biología Molecular y Celular, Universidad de Arizona, EEUU Investigadora, CIAD, México. Dirección: Carretera a Ejido La Victoria. PO Box 1735, Hermosillo, Sonora 83000 México. e-mail: islasosu@ciad.mx

y σ^G se expresan en la espora, mientras que los factores σ^E y σ^K se expresan en la célula madre (Hilbert y Piggot, 2004). De manera similar, en *B. thuringiensis* inmediatamente después de la división asimétrica, σ^F se activa en la preespora y posteriormente se activa σ^{35} (σ^E) en la célula madre; éste a su vez activa al promotor B1 para dar inicio a la transcripción de los genes que codifican para las proteínas Cry dependientes de la esporulación. Después de que finaliza el engolfamiento, proceso en el cual la preespora se recubre de dos membranas, se activan σ^G en la preespora y σ^{28} (σ^K) en la célula madre, y σ^{28} activa al promotor BtII para continuar con la transcripción de los genes Cry (Agaisse y Lereclus, 1995). La síntesis de la cubierta y la corteza, la maduración de la espora y la lisis de la célula madre son controladas por la expresión de genes específicos durante los últimos estadios. Cada paso depende de la finalización de cada uno de los estadios previos, excepto la formación del filamento axial (Piggot y Hilbert, 2004).

Las proteínas Cry forman un cristal que es ingerido junto con las esporas por el insecto. En el caso de larvas de lepidópteros, el cristal es solubilizado en el intestino medio bajo condiciones reductoras a un pH >9,5. Posteriormente, la proteína es procesada por las proteasas del intestino de la larva para dar lugar a la toxina activa, que se une a receptores específicos de la membrana de las células epiteliales y se introduce para crear canales iónicos o poros en la membrana celular (Bravo *et al.*, 2007). Como consecuencia, el intestino del insecto se inmoviliza, las células intestinales son lisadas y el pH en el intestino disminuye. Bajo estas condiciones las esporas de *B. thuringiensis* pueden germinar. A la fecha no se sabe si la muerte del insecto es debida a la septicemia causada por el bacilo (Jurat-Fuentes y Adang, 2006) o por bacterias entéricas (Broderick *et al.*, 2006).

Regulación del Inicio de la Esporulación

Puesto que la transcripción de los genes *cry* requiere los factores de transcripción σ de esporulación, su expresión depende de que se

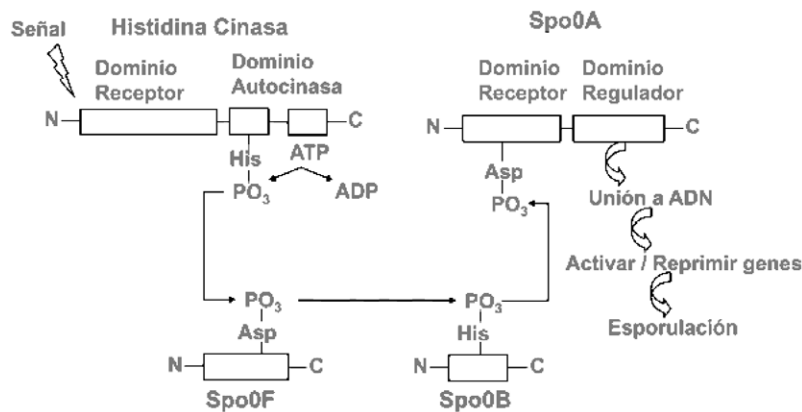


Figura 1. Sistema de transferencia de fosfatos en la esporulación de *B. subtilis*. (Modificado de Stephenson y Hoch, 2002).

inicie la esporulación y por ende está relacionada con la regulación del inicio de este proceso (Sierra-Martínez *et al.*, 2004). La esporulación, que es una respuesta de *quorum sensing*, es un proceso de diferenciación celular complejo mediado por moléculas de señalización, señales fisiológicas y ambientales (Liu *et al.*, 2003). El proceso de esporulación se ha estudiado principalmente en *B. subtilis* y se sabe que estas bacterias detectan las señales metabólicas y ambientales, y las integran en un sistema de transferencia secuencial de fosfatos, denominado en inglés *phosphorelay* (Hilbert y Piggot, 2004).

Esporulación y Sistemas de Transducción de Señales

En el *phosphorelay* las señales externas e internas son captadas por histidina cinasas (HCs), las cuáles se autofosforilan y fosforilan a su vez a proteínas que actúan como reguladores de respuesta (RR) y que posteriormente activan la expresión de genes específicos de esporulación (Phillips y Strauch, 2002; Fujita y Losick, 2003). El sistema está compuesto por HCs, aspartil fosfato fosfatasas pertenecientes a la familia de las Rap-fosfatasas, fosfotransferasas como Spo0B y reguladores de respuesta (RR) como Spo0F y Spo0A (Fujita y Losick, 2005).

En *B. subtilis* las HCs que intervienen en el *phosphorelay* son Kin A, B, C, D y E (Jiang *et al.*, 2000), siendo las tres primeras las de mayor importancia en el inicio de la esporulación (Kobayashi *et al.*, 1995; LeDeaux *et al.*, 1995). En respuesta a diversas señales aun no identificadas, las HCs son fosforiladas en un residuo conservado de histidina, luego transfieren el grupo fosfato a un residuo con-

servado de aspartato en el RR Spo0F. Este último carece de un dominio de unión a ADN, por lo cual es incapaz de activar la transcripción (Molle *et al.*, 2003). Spo0F a su vez transfiere el grupo fosfato a un residuo conservado de histidina en la fosfotransferasa Spo0B y ésta finalmente transfiere el grupo fosfato a un residuo conservado de aspartato localizado en el extremo amino terminal del RR Spo0A.

La fosforilación de Spo0A induce su unión al ADN en el genoma bacteriano, mediante el dominio de unión a ADN en el carboxilo terminal (Figura 1). Spo0A es el regulador por excelencia en la esporulación de *B. subtilis*, más de 121 genes están bajo el control del factor de transcripción Spo0A, un tercio de los cuales son activados y el resto son reprimidos (Stephenson y Hoch, 2002; Molle *et al.*, 2003).

Se ha observado que en cepas que tienen bloqueado el residuo de aspartato fosforilable en Spo0A, la esporulación es baja, a pesar de que se expresan genes asociados con altas concentraciones de Spo0A~P. Lo anterior sugiere que la fosforilación iniciada por las HCs y el proceso de transferencia de fosfatos son requeridos para que se inicie la expresión de genes específicos de esporulación (Fujita y Losick, 2005).

Spo0A~P puede activar o reprimir la expresión de varios genes, por ejemplo, cuando la concentración es baja reprime la transcripción del gen *abrB*, y por ende la síntesis del regulador transicional AbrB, que inhibe la transcripción de los genes de esporulación en *B. subtilis* durante las fases de crecimiento exponencial y de transición (Strauch *et al.*, 1990). Cuando la concentración de Spo0A ~P es alta se activan los promotores de los genes tempranos de esporulación *spoIIA*, *spoIIE* y *spoIIG*. Además de Spo0A~P, el establecimiento del estado de transición y la esporulación, requieren del factor σ^H (Piggot y Hilbert, 2004). Otro regulador es CodY, un represor de genes de la fase estacionaria y esporulación; éste se une directamente al GTP y así se activa para reprimir la expresión de los genes *phrA*, *phrE* y *kinB*. Cuando hay limitación de nutrientes en el medio los niveles de GTP disminuyen y CodY

pierde la habilidad de reprimir a dichos genes, permitiendo la expresión de los mismos (Sonenshein, 2000).

El nivel de fosforilación de Spo0A es controlado por fosfatasas de la familia aspartil fosfato fosfatasas. En *B. subtilis* las Rap fosfatasas A, B, y E liberan grupos fosfatos de Spo0F~P (Perego, 2001), mientras que las fosfatasas Spo0E (Ohlsen *et al.*, 1994), YisI y YnzD liberan el grupo fosfato de Spo0A~P (Perego, 2001; Stephenson y Perego, 2002; Figura 2). Aunque las fosfatasas Rap y Spo0E tienen la misma actividad biológica e interactúan con dominios de proteínas que exhiben el mismo plegamiento dentro de la célula, sus secuencias a nivel de aminoácidos son muy diferentes (Stephenson y Lewis, 2005).

Adyacentes a los genes que codifican para las Rap-fosfatasas, se encuentran los genes que codifican para los péptidos Phr, formando casetes de señalización *rap-phr*. En el genoma de *B. subtilis* se han encontrado 7 casetes de señalización *rap-phr* que regulan competencia genética, esporulación y otros genes involucrados en las respuestas de *quorum sensing*. La actividad de las Rap fosfatasas de la familia Phr es regulada por pentapéptidos señal obtenida del procesamiento de las proteínas Phr, cuyos genes en *B. subtilis* se encuentran adyacentes al gen de la Rap fosfatasa que regulan, formando un casete (Koetje *et al.*, 2003; Pottathil y Lazazzera, 2003). Las proteínas Phr tienen 38 a 44 aminoácidos y son traducidas a partir del mismo transcrito *rap* (Stephenson *et al.*, 2003); luego son procesadas intracelularmente y el péptido es exportado al exterior de la célula, para ser después reinternalizado al citoplasma por medio de la oligopéptido permeasa Opp y unirse a su Rap-fosfatasa específica, inactivándola (Perego, 1998). Al aumentar la densidad celular aumenta la concentración de los péptidos señal (PhrA, C y E) que inhiben a las fosfatasas RapA, RapB y RapE, respectivamente.

Como se mencionó previamente, para que la esporulación tenga inicio, además de una densidad celular alta, se requiere la limitación de nutrientes, que ocasiona una disminu-

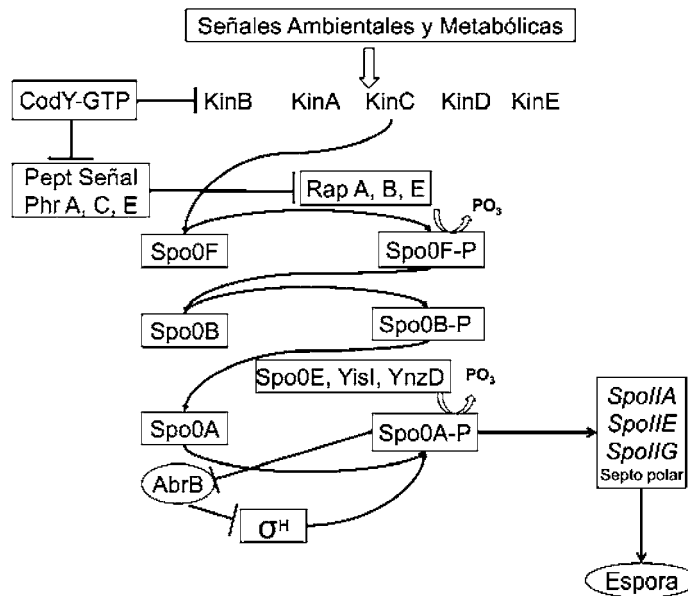


Figura 2. Modelo propuesto para el inicio de la esporulación en *B. subtilis*. (Modificado de Phillips y Strauch, 2002; Piggot y Hilbert, 2004; Stephenson y Lewis, 2005).

ción en la relación GTP:GDP. El CodY ha sido identificado como el sensor fundamental de los niveles de GTP:GDP (Serror y Sonenshein, 1996). CodY es una proteína de unión a GTP que monitorea la concentración intracelular de GTP y regula la transcripción de genes de la fase estacionaria temprana y de esporulación, lo que permite que la célula se adapte a limitaciones nutricionales. Cepas de *B. subtilis* carentes de este gen, esporulan bajo condiciones de exceso de nutrientes (Ratnayake-Lecamwasam *et al.*, 2001). Durante el crecimiento del bacilo en medios ricos, CodY reprime movilidad, competencia y los genes requeridos para la utilización de fuentes alternas de carbono y nitrógeno (Serror y Sonenshein, 1996).

También hay señales intracelulares, como lo son las alteraciones en el ADN o el bloqueo de la replicación, que impiden el inicio de la esporulación (Lemon *et al.*, 2000; Bejerano-Sagie *et al.*, 2006). Cuando se encuentra un daño en el ADN se expresan las proteínas Sda (Rowland *et al.*, 2004) y KipI (Wang *et al.*, 1997; Burkholder *et al.*, 2001). La primera proteína reprime la expresión del gen *dnaA* y ambas impiden la autofosforilación de la HC KinA, bloqueando al sistema de transferencia secuencial de fosfatos. Por lo tanto, solo las células sin alteraciones en los cromosomas continúan o progresan en el proceso de diferenciación celular y llegan a esporular adecuadamente (Stephenson y Lewis, 2005).

De esta manera, la regulación del inicio de la esporulación es muy compleja y depende de la integración e interacción de todos los eventos y señales mencionadas; una vez que el proceso inicia es irreversible y si no se completa, la célula no sobrevivirá. Aunque esta revisión se enfoca en aspectos relacionados con el inicio del proceso, las etapas posteriores también son importantes y dependen de que la célula haya almacenado suficiente energía para completar el proceso y así formar la espora madura. Es la espora la que permitirá a la bacteria resistir condiciones adversas y germinar cuando éstas sean propicias para lograr que la especie se conserve.

Histidina Cinasas, Sensores del Sistema de Transferencia Secuencial de Fosfatos

En las bacterias, los sistemas de dos componentes (SDC) son utilizados para monitorear e interpretar cambios en el ambiente y así responder adecuadamente regulando la expresión de genes. Los SDC clásicos están formados por una HC y un RR. La HC detecta las señales ambientales mediante su dominio sensor y promueve la autofosforilación dependiente de ATP del residuo de histidina. El fosfato es transferido posteriormente a un residuo de aspartato en el dominio receptor del RR (generalmente un factor de transcripción), lo que permite su activación y unión a regiones específicas en el ADN, para activar o reprimir la expresión de genes involucrados en respuestas adaptativas (Stephenson y Hoch, 2002; De Been *et al.*, 2006). En el caso de la esporulación en *B. subtilis*, los SDC son más complejos, ya que se tiene el sistema de transferencia secuencial de fosfatos descrito anteriormente, donde el RR no es un factor de transcripción (Stephenson y Hoch, 2002).

En *B. subtilis*, las cinasas KinA, KinB y KinC son reguladores positivos del inicio de la esporulación y se han relacionado con niveles altos de Spo0A~P, mientras que las cinasas KinD y KinE son reguladores negativos, están asociadas con bajos niveles de Spo0A~P y tienen que ver con el establecimiento de la fase de transición (Jiang *et al.*, 2000; Phillips y Strauch, 2002). Más recientemente se encontró que existen HCs que regulan

el inicio de la esporulación en *B. anthracis* y un RR que activa el factor σ^B en *B. cereus* (Anderson *et al.*, 2005). Sin embargo, poco se conoce acerca de los SDC implicados en la regulación de este proceso en *B. thuringiensis*.

En un estudio realizado en *B. subtilis* utilizando mutantes nulas, dobles, triples y cuádruples en HCs (KinA, KinB, KinC y KinD) se evaluó la expresión del gen *abrB* mediante fusiones transcripcionales del promotor del gen *abrB* al gen reportero *lacZ*. Hubo una mayor expresión en las cepas que carecían de las cuatro cinasas o que eran mutantes triples en KinA, KinB y KinC, por lo que los niveles de expresión de Spo0A fueron mínimos. La delección de los genes KinA y KinB, disminuyó hasta seis veces la esporulación en comparación con la cepa nativa (Jiang *et al.*, 2000).

Las cinasas KinC y KinD fosforilan preferiblemente a Spo0F, por lo que cuando las otras cinasas son deletadas, los niveles de Spo0A~P se mantienen bajos, pero son suficientes para reprimir la transcripción del gen *abrB*. Sin embargo, los niveles alcanzados de Spo0A~P no son suficientes para activar genes específicos de esporulación en ausencia de KinA y KinB (Jiang *et al.*, 2000). KinA es la principal cinasa que fosforila a Spo0F, por lo que la esporulación regulada por esta cinasa depende de la fosfotransferasa Spo0B y de la síntesis y fosforilación de Spo0A. Por otra parte, la sobreexpresión de los genes *kinA*, *kinB* y *kinC* indujo la esporulación de la bacteria, aún sin limitación de nutrientes (Fujita y Losick, 2005).

En las HCs de las bacterias, los dominios sensores localizados en el amino terminal presentan una alta variabilidad, mientras que los dominios transmisores, los de las interacciones proteína-proteína y proteína-ADN se conservan. Por ejemplo, en *B. subtilis* la región que rodea el sitio activo de KinA y KinB está muy conservada, mientras que en los dominios sensores hay una variación considerable, lo cual explica la respuesta de las HCs a señales tan diversas (Zhang y Dong, 2004). Algunos estudios en el género *Bacillus* han demostrado que existe alta homología entre las superficies de interacción del RR Spo0F y las HCs. Esto sugiere que la superficie con la que Spo0F interacciona con las HCs también debe ser muy conservada (Stephenson y Hoch, 2002).

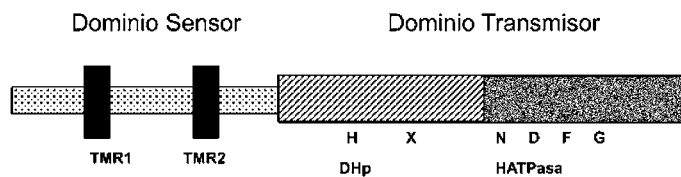


Figura 3. Dominios de una histidina cinasa. (Modificado de Mascher *et al.*, 2006).

Características Estructurales de las Histidina Cinasas

En general las HCs presentan tres dominios estructurales: un dominio receptor o sensor periplasmático, un número variable de dominios transmembranales (TMR) y un dominio transmisor citoplasmático. De acuerdo a sus dominios de monitoreo las HCs se han agrupado en HCs periplasmáticas, transmembranales y citoplasmáticas (Mascher *et al.*, 2006).

El primer grupo, que es el de las HCs clásicas, es el más grande y son cinasas sensoras unidas a la membrana. Los dominios sensores se encuentran en el periplasma mientras que el dominio cinasa se localiza en el citoplasma. Este tipo de HCs monitorea solutos y nutrientes. El dominio de monitoreo periplasmático, localizado en el amino terminal está delimitado por dos hélices transmembranales a cada lado (TMR1 y TMR2), seguido por el dominio transmisor citoplasmático localizado en el carboxilo terminal. Se ha observado que el segmento que conecta TMR2 al dominio citoplasmático en las HCs tiene una secuencia y longitud muy variables (40-180 residuos) e incluye un elemento estructural común llamado HAMP o lazo tipo P. Este elemento tiene una topología de dos hélices anfipáticas unidas por un lazo. Se cree que las hélices transmiten señales entre el dominio externo y el módulo citoplasmático interno (Marina *et al.*, 2005). El dominio transmisor se caracteriza por tener dos hélices α y actuar como un dominio de dimerización DHP (dimerización e histidina fosfotransferasa) o dominio HisKA. Este dominio presenta una secuencia con un residuo de histidina conservado para la autofosforilación (caja H) y finaliza con un dominio catalítico CA (HATPasa) conservado de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos donde se localizan las cajas N, D, F y G (Figura 3). El dominio DHP forma un dímero estable y es fosforilado en presencia de ATP por el dominio CA; estos dos últimos forman el núcleo de las HCs (Marina *et al.*, 2005).

El segundo grupo corresponde a las HCs con mecanismos de monitoreo asociados a las hélices transmembranales. Este es un grupo muy diverso, cuya característica principal es la presencia de 2 a 20 hélices transmembranales en la región amino terminal, conectadas

por lazos extracitoplasmáticos, implicados en la recepción de señales. Estas HCs carecen de dominios extracelulares, por lo que los estímulos detectados se localizan dentro de la membrana. Los estímulos monitoreados por este receptor son modificaciones en las propiedades mecánicas de la envoltura celular, alteraciones en los componentes de la membrana, gradientes electroquímicos y compuestos tóxicos que alteran la integridad de la membrana. La transferencia de la señal ocurre desde la membrana hasta el dominio cinasa citoplasmático (Zhulin *et al.*, 2003; Wecke *et al.*, 2006).

El tercer grupo son las HCs con dominios de monitoreo citoplasmático, que pueden estar ancladas a la membrana o ser proteínas solubles con dominios de monitoreo en el citoplasma. Debido a que los dominios sensores de estas HCs se encuentran dentro del citoplasma, los estímulos que detectan son intracelulares o se localizan en la membrana citoplasmática (Shi y Hulett, 1999; Marina *et al.*, 2005). Estas proteínas perciben solutos citoplasmáticos, proteínas de señalización implicadas en el metabolismo y el ciclo celular, y estímulos internos como oxígeno, hidrógeno o estímulos transmitidos por sensores transmembranales. Las HCs citoplasmáticas muestran un alto grado de diversidad en la organización de sus dominios, especialmente las proteínas HCs citoplasmáticas solubles (Mascher *et al.*, 2006).

Muchas de las HCs citoplasmáticas ancladas a membranas, se identifican por la presencia de dominios citoplasmáticos denominados GAF y PAS (Galperin, 2004) y contienen de 2 a 4 hélices transmembranales, sin lazos periplasmáticos. Los dominios sensores citoplasmáticos se localizan en las regiones amino o carboxilo terminal de estas hélices. Los dominios PAS se encuentran en medio de la región amino terminal y son módulos de señalización altamente conservados. Estos dominios monitorean cambios en el nivel energético de la célula, el potencial redox, oxígeno, luz y también median interacciones proteína-proteína. En bacterias estos dominios se encuentran ex-

clusivamente en las cinasas sensoras de los SDC (Taylor y Zhulin, 1999).

Un aspecto importante y único de las HCs es que son dímeros funcionales, es decir, se requieren dos monómeros para ejercer sus tres actividades enzimáticas (autocinasa, fosfotransferasa y fosfatasa), por lo que estos dominios pueden existir en diferentes estados conformacionales con respecto uno del otro. Debido a que la autofosforilación de las HCs se realiza a través de un mecanismo en *trans* entre dos moléculas en el dímero, el ATP unido al dominio CA de una molécula es utilizado para fosforilar un residuo de histidina del dominio DHp de la otra molécula. La interacción de la HC con su RR también se realiza a través de la interacción en *trans* (Inouye, 2003).

A la fecha, es poco lo que se conoce en cuanto al mecanismo de recepción de señales, debido a que se desconoce cuáles son las moléculas que actúan como estímulos primarios para activar el sistema de transferencia secuencial de fosfatos. Se ha encontrado que los estímulos ocasionan cambios conformacionales intramoleculares en los dominios sensores de las HCs. Estos cambios son propagados dentro de las hélices TMR, afectando la dimerización y/o la actividad de las HCs, lo que conduce a la activación del dominio transmisor citoplasmático (Wolanin *et al.*, 2002). También se cree que en los SDC hay otras proteínas involucradas, que transmiten una señal primaria a la HC, lo cual complica un poco la identificación de los estímulos primarios. Sin embargo, se especula que el mecanismo de transmisión de señales en general para todos los SDC podría ser similar (Mascher *et al.*, 2006).

Histidina Cinasas Asociadas con la Regulación de la Esporulación en *B. subtilis* y en el Grupo *B. cereus*

En el genoma de *B. subtilis* se encuentran codificados 14 dominios PAS, distribuidos en 9 proteínas y en las cinasas sensoras KinA, KinB, KinC, KinD y KinE. KinA es una proteína citoplasmática soluble cuya actividad puede ser afectada por la presencia de algunos ácidos grasos saturados (Strauch *et al.*, 1992). Esta cinasa es activa como dímero y está conformada por un dominio receptor de señales en el amino terminal y un dominio cinasa en el carboxilo terminal. Su dominio receptor contiene tres dominios PAS, PAS-A, PAS-B y PAS-C, los cuales presumiblemente regulan la

TABLA I
NÚMERO DE MARCOS DE LECTURA CON SIMILITUD A HISTIDINA CINASAS (HCs) Y REGULADORES DE RESPUESTA (RR), DISTRIBUIDOS EN OPERONES (HC-RR), EN MARCOS DE LECTURA FUSIONADOS (HC-RR), EN UNIDADES TRANSCRIPCIONALES INDEPENDIENTES (HC_{Independ} Y RR_{Independ}) PRESENTES EN LOS GENOMAS DE *B. subtilis* Y BACTERIAS DEL GRUPO *B. cereus**

Especie	HCs	RR	Operones HC-RR	Proteína de fusión HC-RR	HC _{Independ}	RR _{Independ}
<i>B. cereus</i> ATCC 14579	55	48	39	2	14	7
<i>B. cereus</i> ATCC 10987	54	49	40	2	12	7
<i>B. cereus</i> ZK	57	52	43	2	12	7
<i>B. thuringiensis</i> Konkukian	58	52	44	1	13	7
<i>B. anthracis</i> Ames (0581), Sterne	52	51	41	1	10	9
<i>B. anthracis</i> A2012	50	50	38	1	11	11
<i>B. subtilis</i> 168	35	35	29	0	6	6

* (Modificado de De Been *et al.*, 2006).

actividad de la cinasa en respuesta a las señales que inducen la esporulación en la bacteria. También se ha reportado que el dominio PAS-A de la cinasa KinA se une al ATP y cataliza el intercambio de fosfato entre el ATP y los nucleósidos difosfato, lo que indica que este dominio posee actividad catalítica. A una cepa de *B. subtilis* se le introdujo una mutación puntual en KinA cambiando la cisteína en la posición 75 por alanina. Esta mutación incrementó cinco veces la afinidad del dominio PAS-A al ATP y estimuló la esporulación dependiente de la cinasa KinA, indicando que ese dominio es esencial para su actividad catalítica. Los dominios PAS-B/ PAS-C están involucrados en la homodimerización con los dominios PAS-B/ PAS-C de la otra subunidad del dímero (Stephenson y Hoch, 2001). KinB está localizada en la membrana celular y su actividad depende de la proteína KbaA (Dartois *et al.*, 1996) y de la lipoproteína KapB ambas unidas a la membrana (Dartois *et al.*, 1997).

Por otro lado, las HCs y los RR en los SDC generalmente se encuentran formando operones. Sin embargo, hay HCs que se encuentran en el genoma en una región distinta a aquella en la que está su RR, por lo que se les ha denominado HC y RR independientes. El análisis comparativo de las secuencias de los SDC en *B. subtilis* y el grupo *B. cereus*, reveló que existen diferencias en cuanto al número y tipo según se muestra en la Tabla I. De este análisis se concluye que en las bacterias del grupo *B. cereus* existen más SDS que en *B. subtilis*. Cabe destacar que en esta última bacteria no se detectaron proteínas de fusión HC-RR.

Es importante mencionar que las proteínas ortólogas a Spo0F, Spo0B y Spo0A que participan

en el sistema de transferencia secuencial de fosfatos tienen secuencias muy conservadas entre todos los miembros del grupo *B. cereus* (Anderson *et al.*, 2005). Lo anterior, ha llevado a pensar que este grupo de bacterias esporuladas utilizan un sistema de transferencia de fosfatos para regular el inicio de la esporulación, similar al que utiliza *B. subtilis*. Sin embargo, dentro del grupo *B. cereus*, *B. thuringiensis* es el que posee el mayor número de HCs independientes, las cuales podrían estar involucradas en la regulación del inicio de la esporulación.

Conclusiones

En el genoma de las bacterias del grupo *B. cereus* existen secuencias que codifican para proteínas ortólogas a Spo0F, Spo0B y Spo0A y otras que corresponden a HCs-RR. Ello sugiere que en estos organismos existe un sistema de señalización acoplado a una cadena de transferencia secuencial de fosfatos similar al de *B. subtilis*. Sin embargo, en los genomas de las bacterias del grupo *B. cereus* hay un mayor número de HCs y RR putativas, e inclusive proteínas de fusión HCs-RR que no se encuentran en *B. subtilis*. Puesto que estas proteínas en conjunto son utilizadas para monitorear señales metabólicas y ambientales, transmitir esta información al interior de la célula y modular la expresión de genes específicos involucrados en respuestas adaptativas, la presencia de un mayor número de sensores sugiere una mayor capacidad para responder a estímulos ambientales y metabólicos. Dada la importancia de *B. cereus* desde el punto de vista epidemiológico, el potencial para bioterrorismo de *B. anthracis* y la importancia en biotecnología agrícola de *B. thuringiensis*, re-

viste especial interés en la investigación de los mecanismos moleculares de señalización y la regulación del inicio de la esporulación en estas bacterias.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Ana María Calderón de la Barca, Karina García Orozco y Rogerio Sotelo Mundo por la revisión y edición del manuscrito; al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, México) por el financiamiento (proyectos 60767 y 60950) y por la beca otorgada a L.M.C.S. para sus estudios doctorales.

REFERENCIAS

- Agaisse H, Lereclus D (1995) How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? *J. Bacteriol.* 177: 6027-6032.
- Anderson I, Sorokin A, Kapatral V, Reznik G, Bhattacharya A, Mikhailova N, Burd H, Joukov V, Kaznadzey D, Walunas T, D'Souza M, Larsen N, Pusch G, Liolios K, Grechkin Y, Lapidus A, Goltsman E, Chu L, Fonstein M, Ehrlich SD, Overbeek R, Kyrpidis N, Ivanova N (2005) Comparative genome analysis of *Bacillus cereus* group genomes with *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 250: 175-184.
- Bejerano-Sagie M, Oppenheimer-Shaanan Y, Berlatzky I, Rouvinski A, Meyerovich M, Ben-Yehuda S (2006) A checkpoint protein that scans the chromosome for damage at the start of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Cell* 125: 679-690.
- Bravo A, Gill SS, Soberón M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* 49: 423-435.
- Broderick NA, Raffa KF, Handelsman J (2006) Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 15196-15199.
- Bruning RL, La Clair C, Tang S, Chiang C, Hancock LE, Perego M, Hoch JA (2005) Characterization of sporulation histidine kinases of *Bacillus anthracis*. *J. Bacteriol.* 187: 6972-6981.
- Burkholder WF, Kurtser I, Grossman AD (2001) replication initiation proteins regulate a developmental checkpoint in *Bacillus subtilis*. *Cell* 104: 269-279.
- Cherif A, Brusetti L, Borin S, Rizzi A, Boudabous A, Khyami-Horani H, Daffonchio D (2003) Genetic relationship in the '*Bacillus cereus* group' by Rep-Pcr fingerprinting and sequencing of a *Bacillus anthracis*-specific Rep-Pcr fragment. *J. Appl. Microbiol.* 94: 1108-1119.
- Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Dean DH (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807-813.
- Dartois V, Djavakhishvili T, Hoch JA (1996) Identification of a membrane protein involved in activation of the KinB pathway to sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 178: 1178-1186.
- Dartois V, Djavakhishvili T, Hoch JA (1997) KapB is a lipoprotein required for KinB signal transduction and activation of the phosphorelay to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 26: 1097-1108.
- De Been M, Francke C, Moezelaar R, Abbe T, Siezen RJ (2006) Comparative analysis of two-component signal transduction systems of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis*. *Microbiology* 152: 3035-3048.
- Fujita M, Losick R (2003) The master regulator for entry into sporulation in *Bacillus subtilis* becomes a cell-specific transcription factor after asymmetric division. *Genes Dev.* 17: 1166-1174.
- Fujita M, Losick R (2005) Evidence that entry into sporulation in *Bacillus subtilis* is governed by a gradual increase in the level and activity of the master regulator Spo0A. *Genes Dev.* 19: 2236-2244.
- Galperin MY (2004) Bacterial signal transduction network in a genomic perspective. *Env. Microbiol.* 6: 552-567.
- Hilbert DW, Piggot PJ (2004) Compartmentalization of gene expression during *Bacillus subtilis* spore formation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 234-262.
- Inouye M (2003) Histidine kinases: Introductory remarks. En Inouye M, Dutta R (Eds.) *Histidine Kinases in Signal Transduction*. Academic Press An imprint of Elsevier Science. San Diego, CA, EEUU. pp 1-9.
- Jiang M, Shao W, Perego M, Hoch JA (2000) Multiple histidine kinases regulate entry into stationary phase and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 38: 535-542.
- Jurat-Fuentes JL, Adang MJ (2006) Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *J. Invert. Pathol.* 92: 166-171.
- Kobayashi K, Shoji K, Shimizu T, Nakano K, Sato T, Kobayashi (1995) Analysis of a suppressor mutation *ssb* (*kinC*) of *sur0b20* (*Spo0A*) mutation in *Bacillus subtilis* reveals that *kinC* encodes a histidine protein kinase. *J. Bacteriol.* 177: 176-182.
- Koetje EJ, Hajdo-Milasinovic A, Kiewiet R, Bron S, Tjalsma H (2003) A plasmid-borne *Rap-Phr* system of *Bacillus subtilis* can mediate cell-density controlled production of extracellular proteases. *Microbiology* 149: 19-28.
- LeDeaux JR, Yu N, Grossman AD (1995) Different roles for KinA, KinB, and KinC in the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 177: 861-863.
- Lemon KP, Kurtser I, Wu J, Grossman AD (2000) Control of initiation of sporulation by replication initiation genes in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 182: 2989-2991.
- Liu J, Tan K, Stormo GD (2003) Computational identification of the Spo0A-phosphate regulon that is essential for the cellular differentiation and development in Gram-positive spore-forming bacteria. *Nucleic Acids Res.* 31: 6891-6903.
- Marina A, Waldburger CD, Hendrickson WA (2005) Structure of the entire cytoplasmic portion of a sensor histidine-kinase protein. *EMBO J.* 24: 4247-4259.
- Mascher T, Helmann JD, Uden G (2006) Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70: 910-938.
- McKillip JL (2000) Prevalence and expression of enterotoxins in *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp., a literature review. *Ant. v. Leeuw.* 77: 393-399.
- Molle V, Fujita M, Jensen ST, Eichenberger P, González-Pastor JE, Liu JS, Losick R (2003) The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 50: 1683-1701.
- Ohlsen KL, Grimsley JK, Hoch JA (1994) Deactivation of the sporulation transcription factor Spo0A by the Spo0E protein phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 1756-1760.
- Perego M (1998) Kinase-phosphatase competition regulates *Bacillus subtilis* development. *Trends Microbiol.* 6: 366-370.
- Perego M (2001) A new family of aspartyl phosphate phosphatases targeting the sporulation transcription factor Spo0A of *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 42: 133-143.
- Phillips ZE, Strauch MA (2002) *Bacillus subtilis* sporulation and stationary phase gene expression. *Cell Mol. Life Sci.* 59: 392-402.
- Piggot PJ, Hilbert DW (2004) Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 7: 579-586.
- Pottathil M, Lazazzera BA (2003) The extracellular Phr peptide-Rap phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*. *Front. Biosci.* 8: d32-45.
- Ratnayake-Lecamwasam M, Serror P, Wong KW, Sonenshein AL (2001) *Bacillus subtilis* CodY represses early-stationary-phase genes by sensing GTP levels. *Genes Dev.* 15: 1093-1103.
- Rowland SL, Burkholder WF, Cunningham KA, Maciejewski MW, Grossman AD, King GF (2004) Structure and mechanism of action of Sda, an inhibitor of the histidine kinases that regulate initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Cell* 13: 689-701.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
- Serror P, Sonenshein AL (1996) CodY is required for nutritional repression of *Bacillus subtilis* genetic competence. *J. Bacteriol.* 178: 5910-5915.
- Shi L, Hulett FM (1999) The cytoplasmic kinase domain of PhoR is sufficient for the low phosphate-inducible expression of *Pho* regulon genes in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 31: 211-222.
- Sierra-Martínez P, Ibarra JE, de la Torre M, Olmedo G (2004) Endospore degradation in an oligosporogenic, crystalliferous mutant of *Bacillus thuringiensis*. *Curr. Microbiol.* 48: 153-158.
- Sonenshein AL (2000) Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3: 561-566.
- Stephenson K, Hoch JA (2001) Pas-A domain of phosphorelay sensor kinase A: A catalytic ATP-binding domain involved in the initiation of development in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 15251-15256.

- Stephenson K, Hoch JA (2002) Evolution of signalling in the sporulation phosphorelay. *Mol. Microbiol.* 46: 297-304.
- Stephenson K, Lewis RJ (2005) Molecular insights into the initiation of sporulation in Gram-positive bacteria: new technologies for an old phenomenon. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 281-301.
- Stephenson SJ, Perego M (2002) Interaction surface of the Spo0A response regulator with the Spo0E phosphatase. *Mol. Microbiol.* 44: 1455-1467.
- Stephenson S, Müller C, Jiang M, Perego M (2003) Molecular analysis of Phr peptide processing in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 185: 4861-4871.
- Strauch M, Webb V, Spiegelman G, Hoch JA (1990) The Spo0A protein of *Bacillus subtilis* is a repressor of the *abrB* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1801-1805.
- Strauch MA, de Mendoza D, Hoch JA (1992) Cis-unsaturated fatty acids specifically inhibit a signal-transducing protein kinase required for initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 6: 2909-2917.
- Taylor BL, Zhulin IB (1999) PAS domains: Internal sensors of oxygen, Redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 479-506.
- Wang L, Grau R, Perego M, Hoch JA (1997) A novel histidine kinase inhibitor regulating development in *Bacillus subtilis*. *Genes Dev.* 11: 2569-2579.
- Wecke T, Veith B, Ehrenreich A, Mascher T (2006) Cell envelope stress response in *Bacillus licheniformis*: Integrating comparative genomics, transcriptional profiling, and regulon mining to decipher a complex regulatory network. *J. Bacteriol.* 188: 7500-7511.
- Wolanin PM, Thomason PA, Stock JB (2002) Histidine protein kinases: key signal transducers outside the animal kingdom. *Genome Biol.* 3: 3013. 1-8.
- Zhang LH, Dong H (2004) Quorum sensing and signal interference: Diverse implications. *Mol. Microbiol.* 53: 1563-1571.
- Zhulin IB, Nikolskaya AN, Galperin MY (2003) Common extracellular sensory domains in transmembrane receptors for diverse signal transduction pathways in bacteria and archaea. *J. Bacteriol.* 185: 285-294.

SPORULATION START AND HISTIDINE KINASE REGULATION: A COMPARATIVE ANALYSIS OF *Bacillus subtilis* THE GROUP OF *Bacillus cereus*

Laura M. Castañeda-Sandoval, Mayra de la Torre, Sergio Casas-Flores and María A. Islas-Osuna

SUMMARY

Sporulation is a quorum sensing response and a cellular differentiation process regulated by signalling molecules and physiological and environmental signals. The regulation of sporulation initiation has been extensively studied in *Bacillus subtilis* and occurs through phosphorelay. *B. subtilis* detects metabolic and environmental signals through histidine kinases that are autophosphorylated and then transfer the phosphate group to response regulators, activating the expression of sporulation genes. However, there are other important sporulated bacilli like those from the *B. cereus* group. *B. cereus* toxins are related to food-borne intoxication, *B. anthracis* may be used as biological weapon in bioterrorism, and

B. thuringiensis is an excellent biological control agent. Therefore, it is critical to understand the signalling processes that control sporulation initiation and the toxin synthesis. This review summarizes known literature about regulation of initiation of sporulation in the *B. cereus* group focusing in the role of histidine kinases and the putative open reading frames of these sensors in *B. subtilis* and *B. thuringiensis*. The genomes of the *B. cereus* group have 10 to 14 putative histidine kinases and 7 to 11 response regulators, compared to 6 histidine kinases and 6 response regulators in *B. subtilis*, implying that this last bacteria should have a lower capacity to respond to environmental and metabolic signals.

REGULAMENTAÇÃO DO INÍCIO DA ESPORULAÇÃO E HISTIDINA-CINASE: UMA ANÁLISE COMPARATIVA ENTRE *Bacillus subtilis* E O GRUPO *Bacillus cereus*

Laura M. Castañeda-Sandoval, Mayra de la Torre, Sergio Casas-Flores e María A. Islas-Osuna

RESUMO

A esporulação, que é uma resposta de quorum sensing, é um processo de diferenciação celular mediado por moléculas de sinalização, sinais fisiológicas e ambientais. Sabe-se que *Bacillus subtilis* detecta os sinais metabólicos e ambientais e estes são integrados a um sistema de transferência sequencial de fosfatos. Os sinais são detectados por histidina cinase que, por sua vez, se autofosforilam e fosforilam, em proteínas que atuam como reguladores de resposta e que ativam a expressão de genes específicos de esporulação. Devido à importância de *B. cereus* do ponto de vista epidemiológico, o potencial para bioterrorismo de *B. anthracis* e a importância em biotecnologia agrícola de *B. thuringiensis*, a investigação sobre os mecanismos moleculares

de sinalização e a regulamentação do início da esporulação em estas bactérias do grupo *B. cereus* revestem especial interesse. Nesta revisão se discute a literatura sobre este tema, colocando especial atenção nas histidina cinases, e na análise comparativa dos genomas de *B. subtilis* e do grupo de *B. cereus*, em relação às sequências de possíveis histidina cinases e reguladores de resposta. Cabe destacar que nos genomas do grupo *B. cereus* há maior número de histidina cinases (10 a 14) e de reguladores de resposta (7 a 11) putativos que em *B. subtilis* (6 histidina cinases e 6 reguladores de resposta), o que sugere uma maior capacidade para responder a estímulos ambientais e metabólicos nestas bactérias.