

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**ESCUELA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Caracterización de la dinámica de señalización de PhrA en *Bacillus subtilis* mediante  
la utilización de biosensores tipo FRET**

**Disertación previa a la obtención del título de Microbiólogo**

**PABLO LEONARDO NARANJO MENESES**

**Quito, 2018**

## CERTIFICACIÓN

Certifico que la Disertación de Microbiólogo del Sr. Pablo Leonardo Naranjo Meneses ha sido concluida de conformidad con las normas establecidas. Por lo tanto, puede ser presentada para la calificación correspondiente.

Mstr. Fernando René Santacruz Flores

Director de la Disertación

Quito, 21 de marzo de 2018

## **DEDICATORIA**

I'm ready! I'm ready! I'm ready!

**- Bob Esponja Pantalones Cuadrados**

Dedico este trabajo a todas las personas que me han apoyado a lo largo de mi carrera universitaria. Agradecido por todo a ellas, estoy listo para alcanzar y cumplir más metas académicas y personales.

## AGRADECIMIENTOS

A Jehová Dios por permitirme la vida para poder cumplir mis metas académicas.

A mis padres Adolfo y Zoila por su apoyo incondicional en todos los aspectos de mi vida.

A mi hermano y hermanas por todo el tiempo y los retos compartidos juntos.

A mis sobrinos Emily, Martin y los nuevos en camino.

A todos los docentes que me han impartido sus conocimientos y experiencias, con especial mención a Elena Granda, Jennifer Yáñez, Margarita Estrella y Santiago Burneo por su apoyo para viajar a Alemania a realizar la Disertación.

A Ilka Bischofs-Pfeifer por su guía y la oportunidad de realizar este trabajo de investigación en Heidelberg cumpliendo mi meta de formar parte del Instituto Max Planck.

A Heiko Babel por su supervisión inicial a mi llegada al laboratorio en Heidelberg.

Al equipo del laboratorio  $\mu$ CATs por su compañerismo y ayuda durante esos 6 meses de trabajo.

Al Mstr. Fernando Santacruz por su ayuda como director de la disertación.

A todos mis amigos y amigas que me han apoyado a lo largo de mi carrera universitaria.

A mis mascotas Osito, Teresita, Solsito, Azlan y Arthur por su ternura y compañía.

**LISTA DE ABREVIATURAS**

**AMP:** Ampicilina

**CFP:** Proteína fluorescente cian

**DO:** Densidad óptica

**ERY:** Eritromicina

**FRET:** Transferencia de energía de resonancia de Foster

**G:** Unidad de media de fuerza gravitacional

**Kin:** Quinasa

**LB:** Medio de lisogenia, o Luria Bertani

**LNC:** Lincomicina

**MLS:** Macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B

**Opp:** Oligopéptido permeasa

**PBS:** Solución tamponadora de fosfato

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**Phr:** Regulador de fosfatasa

**PMTs:** Tubos fotomultiplicadores

**Rap:** Receptor aspartil fosfatasa

**rpm:** Revoluciones por minuto

**SPE:** Espectinomicina

**Spo:** Esporulación

**YFP:** Proteína fluorescente amarilla

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CERTIFICACIÓN.....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	ix
LISTA DE TABLAS .....	xi
LISTA DE ANEXOS .....	xii
1 RESUMEN .....	1
2 ABSTRACT .....	2
3 INTRODUCCIÓN.....	3
3.1 OBJETIVOS .....	8
3.1.1 Objetivo general .....	8
3.1.2 Objetivos específicos .....	8
4 MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
4.1 Cepas.....	9
4.2 Medios de cultivo.....	9
4.3 Experimento FRET estándar.....	9
4.4 Ensayo de esporulación .....	11
4.5 Extracción y análisis de sobrenadantes.....	12
4.6 Diseño de modelo de señalización de PhrA.....	12
4.7 Determinación de parámetros del modelo .....	13
4.8 Extracción de ADN.....	16
4.9 Construcción de plásmidos .....	16
4.9.1 Diseño de cebadores.....	16
4.9.2 Generación de fragmentos por PCR.....	19

4.9.3	Digestión y ligación .....	20
4.9.4	Clonación .....	21
4.10	Generación de cepas de <i>Bacillus subtilis</i> .....	22
4.11	Estimulación de nuevas cepas .....	24
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	25
5.1	Especificidad y sensibilidad del biosensor tipo FRET .....	25
5.2	Función de PhrA en la esporulación .....	26
5.3	Determinación de PhrA en cultivos esporulantes .....	27
5.4	Modelo de señalización de PhrA .....	28
5.4.1	Dosificación-respuesta .....	28
5.4.2	Cinética de internalización .....	29
5.4.3	Competición con otros péptidos de señalización .....	30
5.4.4	Ajuste y estimación de parámetros .....	31
5.4.5	Cuantificación de PhrA en sobrenadantes .....	31
5.5	Construcción de cepas .....	32
5.6	Interacción RapA-Spo0F independiente de fosforilación.....	33
6	CONCLUSIONES.....	35
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36
8	FIGURAS .....	48
9	TABLAS.....	66
10	ANEXOS.....	75

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Rutas de señalización que controlan la esporulación.....	48
<b>Figura 2.</b> Esquema del biosensor tipo FRET utilizado para estudiar la señalización de PhrA en <i>B. subtilis</i> .....	49
<b>Figura 3.</b> Metodología de inducción, estimulación e inoculación para experimento FRET estándar.....	49
<b>Figura 4.</b> Configuración del microscopio <i>Olympus IX81</i> para experimentos FRET-fotoblanqueo .....	50
<b>Figura 5.</b> Resultados de experimentos FRET-fotoblanqueo .....	51
<b>Figura 6.</b> Metodología de esporulación y extracción de sobrenadantes.....	52
<b>Figura 7.</b> Estimulación del biosensor con sobrenadantes de cultivos esporulantes .....	52
<b>Figura 8.</b> Modelo de internalización y respuesta FRET.....	53
<b>Figura 9.</b> Metodología de estimulación e inoculación para la elaboración de cinética intracelular y extracelular .....	53
<b>Figura 10.</b> Descripción de los plásmidos integrativos pAX01 y pDR111 .....	54
<b>Figura 11.</b> Descripción del plásmido pMAD .....	54
<b>Figura 12.</b> Mecanismo de integración del plásmido pAX01.....	55
<b>Figura 13.</b> Sensibilidad y especificidad del biosensor tipo FRET .....	55
<b>Figura 14.</b> Capacidad de esporulación de tres cepas de <i>Bacillus</i> .....	56
<b>Figura 15.</b> Estimulación del biosensor con sobrenadantes de cultivos esporulantes de <i>Bacillus</i> .....	56
<b>Figura 16.</b> Cinética de producción de PhrA en cultivos esporulantes de <i>Bacillus</i> .....	57
<b>Figura 17.</b> Curva dosis-respuesta de PhrA .....	58
<b>Figura 18.</b> Cinética de internalización de PhrA.....	59
<b>Figura 19.</b> Competición de PhrA a nivel de internalización .....	60
<b>Figura 20.</b> Competición de PhrA a nivel de receptor de RapA .....	61
<b>Figura 21.</b> Cuantificación de PhrA detectado en sobrenadantes de cultivos esporulantes de <i>Bacillus</i> .....	62
<b>Figura 22.</b> Verificación de integración por recombinación homóloga de plásmidos integrativos .....	62
<b>Figura 23.</b> Verificación de delección limpia .....	63
<b>Figura 24.</b> Verificación de recombinación de sitio específico .....	64
<b>Figura 25.</b> Efecto de la sobreexpresión de quinasas KinA y KinB .....	64

<b>Figura 26.</b> Efecto de la ausencia de las quinasas KinA y KinB .....	65
<b>Figura 27.</b> Efecto en mutante resistente a la fosforilación .....	65

**LISTA DE TABLAS**

<b>Tabla 1.</b> Parámetros calculados experimentalmente.....	66
<b>Tabla 2.</b> Parámetros calculados en base al ajuste al modelo .....	66
<b>Tabla 3.</b> Cuantificación de PhrA extracelular en sobrenadantes de cultivos esporulantes de <i>Bacillus</i> .....	66
<b>Tabla 4.</b> Cebadores utilizados en este trabajo.....	68
<b>Tabla 5.</b> Condiciones específicas de PCR para cada par de cebadores .....	71
<b>Tabla 6.</b> Plásmidos utilizados en este trabajo .....	72
<b>Tabla 7.</b> Cepas utilizadas en este trabajo .....	73

**LISTA DE ANEXOS**

<b>Anexo 1.</b> Materiales y equipos .....	75
<b>Anexo 2.</b> Composición de los medios de cultivo .....	78
<b>Anexo 3.</b> Protocolo experimental de la plataforma <i>XCellence</i> .....	79
<b>Anexo 4.</b> <i>Script</i> para cálculo de la eficiencia FRET .....	80
<b>Anexo 5.</b> <i>Script</i> para ajuste de resultados en base al modelo.....	81
<b>Anexo 6.</b> Especificidad del biosensor .....	83
<b>Anexo 7.</b> Alineamiento de las secuencias de PhrA en el género <i>Bacillus</i> .....	83
<b>Anexo 8.</b> Cinética de producción de PhrA de <i>B. subtilis</i> W168 .....	84
<b>Anexo 9.</b> Cepa mutante OppA-deficiente .....	84
<b>Anexo 10.</b> Sobreexpresión de la peptidasa PepF .....	85
<b>Anexo 11.</b> <i>Script</i> para la cuantificación de PhrA en sobrenadantes de cultivos esporulantes .....	85
<b>Anexo 12.</b> Verificación de mutagénesis puntual dirigida (D54N).....	86
<b>Anexo 13.</b> Valores de eficiencia FRET utilizados para el ajuste .....	87
<b>Anexo 14.</b> Valores de eficiencia FRET utilizados para las figuras.....	91

## 1 RESUMEN

El género *Bacillus* comprende algunos microorganismos de importancia clínica e industrial que exhiben la capacidad de producir esporas en condiciones de estrés. El proceso de esporulación demanda un alto gasto energético por lo que es regulado cuidadosamente. En *B. subtilis*, este proceso está coordinado por la fosfotransferencia KinA-Spo0F-Spo0B-Spo0A y el sistema de percepción de cuórum RapA-PhrA. A pesar del amplio conocimiento de ambas rutas, aún existen características no descritas que pueden contribuir al desarrollo de nuevas técnicas de control de la esporulación. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar la señalización de PhrA mediante la utilización de biosensores tipo FRET. Para ello, se probó la sensibilidad y especificidad del biosensor mediante experimentos de FRET-fotoblanqueo. Se realizaron ensayos de esporulación con *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*, y se monitoreó la producción de PhrA con el biosensor. Más tarde, se elaboró un modelo de respuesta FRET con la finalidad de implementar el biosensor como una herramienta cuantitativa. Por último, se diseñaron varios mutantes de *B. subtilis* con alteración en el estado de fosforilación de Spo0F. El biosensor demostró sensibilidad a concentraciones nanomolares y alta especificidad a PhrA. La cepa *B. subtilis* PhrA-deficiente fue incapaz de esporular. La producción de PhrA en la cepa silvestre de *B. subtilis* cesó posterior a las tres horas de iniciado el proceso de esporulación. Interesantemente, *B. amyloliquefaciens* mantuvo la síntesis de PhrA después de la tercera hora y exhibió una eficiencia de esporulación del 100 %. La parametrización del modelo permitió cuantificar PhrA en los sobrenadantes de cultivos esporulantes. Todos los mutantes de las quinasas mostraron la misma eficiencia FRET que la cepa silvestre. En base a los resultados se pudo concluir que el biosensor presenta alta sensibilidad, especificidad y puede utilizarse como una herramienta cuantitativa. PhrA resulta esencial para iniciar el proceso de esporulación e influye en la eficiencia de este proceso. La velocidad de internalización de PhrA depende de la concentración de péptidos competidores, no obstante, no existe competición a nivel de receptor de RapA para PhrA. Por último, la interacción PhrA-RapA-Spo0F es independiente del estado de fosforilación de Spo0F.

**Palabras clave:** *Bacillus*, biosensor, esporulación, FRET, PhrA.

## 2 ABSTRACT

The genus *Bacillus* includes some microorganisms with clinical and industrial relevance mainly because of their ability to produce spores. The sporulation process is energy-expensive; therefore, it should be precisely regulated. In *B. subtilis*, this process is carried out by the phosphorelay KinA-Spo0F-Spo0B-Spo0A and the quorum sensing system RapA-PhrA. Despite the broad knowledge about these signaling pathways, it has been lacking some clues that could allow to develop new and better techniques for controlling the sporulation process. The aim of this work was to characterize the PhrA signaling pathway using FRET-based biosensors. Hence, the specificity and sensibility of the biosensor was tested by FRET-photobleaching experiments. Furthermore, some sporulation assays with *B. subtilis* and *B. amyloliquefaciens* were performed and the PhrA synthesis was followed with the biosensor. Moreover, a FRET-response model was developed to use the biosensor as a quantitative tool. Finally, some *B. subtilis* mutants were designed with disturbances in the phosphorylation state of Spo0F. The biosensor showed high sensibility to nanomolar concentrations and high specificity to PhrA. The PhrA-deficient strain could not sporulate. The production of PhrA stopped three hours after the sporulation process started. It was especially interesting that *B. amyloliquefaciens* keeps the PhrA synthesis after three hours and showed a sporulation efficiency of 100 %. The model parametrization allowed to quantify PhrA in supernatants from sporulating cultures. It is possible to conclude that the biosensor has high sensitivity, specificity and can be used as a quantitative tool. Moreover, PhrA is essential for starting the sporulation process and influences on the sporulation efficiency. The uptake rate of PhrA depends of the competitive peptides concentration however, there is not any competition at the PhrA receptor in RapA. Finally, the interaction between PhrA, RapA and Spo0F is independent of the phosphorylation state of Spo0F.

**Key words:** *Bacillus*, biosensor, FRET, PhrA, sporulation

### 3 INTRODUCCIÓN

*Bacillus* es un género bacteriano gram positivo perteneciente al filo *Firmicutes*. Este género consta en su mayoría de bacilos esporulantes de vida saprófita que habitan en ambientes terrestres y acuáticos. No obstante, también comprende algunos patógenos de humanos e insectos (Harwood, 2007; Tortora, Funke y Case, 2016). Precisamente, el grupo *B. cereus* incluye a estos patógenos, a saber, *B. anthracis*, *B. cereus*, y *B. thuringiensis*. El primero es el agente causal del ántrax (Bongiorni, Stoessel, Shoemaker y Perego, 2006; Spencer, 2003). *B. cereus* es una de las causas más comunes de envenenamiento provocado por alimentos que se manifiesta como un cuadro diarreico y emético. Por ello, el control de este patógeno resulta especialmente importante en la industria alimenticia (Griffiths y Schraft, 2017). Por otro lado, *B. thuringiensis* es un entomopatógeno que se utiliza como bioinsecticida (Ibrahim, Griko, Junker y Bulla, 2010).

En cuanto a los microorganismos no patógenos del género *Bacillus*, *B. amyloliquefaciens* y *B. subtilis* constituyen las especies de mayor importancia en el área agrícola puesto que pueden ser aplicados en el suelo como biofertilizantes y biocontroladores (Qiao et al., 2017). Esto a razón que ambas especies tienen la capacidad de promover el crecimiento vegetal mediante la producción de fitohormonas y aumentar la disponibilidad de nutrientes, e inhibir la colonización de fitopatógenos (Ashwini y Srividya, 2014; Talboys, Owen, Healey, Withers y Jones, 2014). La utilización de estos microorganismos en la agricultura, y el control de las especies patógenas del género *Bacillus*, depende de un conocimiento exacto del proceso de esporulación (Bongiorni et al., 2006; Díaz, García y Zapata, 2015; Ihekwaba, Mura y Barker, 2014).

*B. subtilis* es el organismo modelo ideal para la investigación del proceso de esporulación, además que es uno de los microorganismos mejor caracterizados (Aizawa, 2014; Willey, Sherwood y Woolverton, 2014). Su elección como organismo modelo se debe a que es fácil de manipular, presenta competitividad genética natural y crece relativamente rápido en condiciones *in vitro* (Kumar y Singh, 2013). Sin embargo, la característica de especial interés constituye su sofisticada red de rutas de señalización que controla los diversos comportamientos fisiológicos como la esporulación (Piggot, 2009; Vlamakis, Chai, Beaugard, Losick y Kolter, 2013; Wolf et al., 2015)

La esporulación es un proceso de diferenciación celular que surge como respuesta a condiciones de estrés ambiental como falta de nutrientes o elevada temperatura (Ihekwaba

et al., 2014). El resultado de este proceso es la formación de estructuras con multicapas de alta resistencia a radiación, calor y químicos denominadas endoesporas. Una vez que las condiciones de crecimiento son adecuadas, estas esporas pueden germinar y generar nuevas células vegetativas (Madigan, Martinko, Bender, Buckley y Stahl, 2015). La esporulación es un proceso irreversible y representa un coste energético alto para la célula por lo que debe ser regulado cuidadosamente (Ihekweba et al., 2014; Jabbari, Heap y King, 2011). Este proceso está controlado inicialmente por una red compuesta de un sistema de percepción de cuórum y un sistema de dos componentes (Narula, Fujita y Igoshin, 2016).

Los sistemas de dos componentes son mecanismos regulatorios encontrados mayormente en procariontes. Estos sistemas pueden funcionar por si solos o forman parte de una red de señalización celular compleja (Stock, Robinson y Goudreau, 2000). Una de las funciones de estos sistemas es la interpretación de señales no relacionadas con la densidad celular. De esta manera, la población microbiana desarrolla estados fisiológicos que faciliten su adaptación y supervivencia (Capra y Laub, 2012). Los sistemas básicos consisten en dos componentes: un “sensor” anclado a la membrana y un “regulador de respuesta” citoplasmático (Babel y Bischofs, 2016; Ng y Bassler, 2009).

El sensor es una histidina quinasa que detecta una señal física o bioquímica específica. Como resultado, el sensor se autofosforila en su residuo histidina (H) y transfiere el grupo fosfato hacia un residuo aspartato (D) del regulador de respuesta (Skerker et al., 2008; Zschiedrich, Keidel y Szurmant, 2016). Este fosfato genera un cambio bioquímico en el dominio respuesta del regulador que resulta en mayor afinidad para su molécula blanco (Mitrophanov y Groisman, 2008). La mayor parte de reguladores de respuesta corresponden a factores de transcripción que tienen la capacidad de coordinar la expresión genética, y por lo tanto, la respuesta celular (Gao, Mack y Stock, 2007). Sin embargo, existen sistemas más complejos que incluyen otros componentes y se los conoce como fosfotransferencia o sistemas de cuatro componentes (Fabret, Feher y Hoch, 1994).

La fosfotransferencia (*phosphorelay*, en inglés) consta de un fosfotransmisor y un regulador intermedio, en adición al sensor y el regulador de respuesta terminal. El regulador intermedio presenta un dominio receptor con aspartato, al igual que el regulador terminal, pero carece del dominio respuesta (Perraud, Weiss y Gross, 1999). Por otro lado, el fosfotransmisor es un módulo contenedor de histidina que no posee ninguna actividad enzimática (Mitrophanov y Groisman, 2008). En consecuencia, una vez el sensor detecta la

señal, el grupo fosfato es transferido secuencialmente en orden H-D-H-D hasta el regulador de respuesta terminal. Finalmente, este regulador en su estado fosforilado genera una respuesta fisiológica específica (Fabret et al., 1994).

La actividad del regulador de respuesta depende de su estado de fosforilación. Por lo tanto, todas las proteínas que modifiquen este estado modularán la respuesta final (Babel y Bischofs, 2016). Generalmente, estas proteínas moduladoras son fosfatasa que regulan la transferencia de fosfato mediante reacciones de desfosforilación (Hoch, 2000). Por otro lado, estas proteínas funcionan como conectores puesto que representan el punto de interacción de diferentes rutas de señalización dependientes e independientes de densidad celular (Mitrophanov y Groisman, 2008).

La percepción de cuórum (*quorum sensing*, en inglés) es un sistema de comunicación microbiano dependiente de la densidad celular que controla el comportamiento poblacional (Willey et al., 2014). Este sistema censa el número de células para coordinar estados fisiológicos específicos que facilitan la adaptación y supervivencia de la comunidad microbiana (Madigan et al., 2015). Entre los estados fisiológicos coordinados se encuentran el desarrollo de competitividad genética, la inducción de canibalismo, la síntesis de enzimas, metabolitos y factores de virulencia, la formación de biopelículas y la esporulación (González, Hobbs y Losick, 2003; Griffith y Grossman, 2008; Stefanic et al., 2012).

La percepción de cuórum consiste en la secreción de señales químicas difusibles hacia al espacio extracelular que actúan como factores autoinductores (Waters y Bassler, 2005). Estos factores se acumulan en el espacio extracelular conforme aumenta la densidad poblacional (Papenfort y Bassler, 2016). Al sobrepasar un umbral de concentración definido, las señales interactúan con su receptor generando una respuesta fisiológica específica (Comella y Grossman, 2005). Esta respuesta es el resultado de la activación de rutas de señalización que corriente abajo producen un efecto en la expresión o silenciamiento de un grupo particular de genes (Elsholz, Wacker y Losick, 2014; Ng y Bassler, 2009).

Los factores autoinductores en bacterias gram negativas corresponden a productos metabólicos denominados N-acil homoserin lactonas (Papenfort y Bassler, 2016). Por otro lado, en gram positivas los factores son oligopéptidos codificados por genes específicos que atraviesan un procesamiento post-transduccional (Waters y Bassler, 2005). Posterior a este procesamiento, el péptido es internalizado por una permeasa de pared celular para que pueda interactuar con su receptor en el espacio intracelular (Miller y Bassler, 2001).

En *B. subtilis*, la esporulación esta controlada por un sistema de fosfotransferencia acoplado a un sistema de percepción de cuórum. Por un lado, la fosfotransferencia empieza con las histidinas quinasas KinA–E que actúan como sensores de condiciones ambientales. De estas, KinA y KinB constituyen las principales quinasas de mayor actividad en la esporulación y responden ante señales de escasez de nutrientes (De Jong, Veening y Kuipers, 2010; Schultz, 2016). La detección de la señal provoca la autofosforilación de la quinasa que cede el fosfato hacia el regulador intermedio Spo0F, este a su vez lo transfiere al fosfotransmisor Spo0B, que finalmente lo entrega al regulador de respuesta Spo0A (Kiehler, Haggett y Fujita, 2017). Este último, Spo0A es un factor de transcripción que en su forma fosforilada regula la expresión de un grupo de genes necesarios para el inicio y la continuación del proceso de esporulación (**Figura 1**) (Narula et al., 2016; Piggot y Hilbert, 2004; Russell, Cabeen, Wiggins, Paulsson y Losick, 2017).

Los reguladores Spo0F y Spo0A sirven como puntos de control para la coordinación del proceso de esporulación. Específicamente, Spo0F constituye el punto de interacción con el sistema de percepción de cuórum Rap-Phr (Babel y Bischofs, 2016). Este sistema comprende varias fosfatasas (Rap, receptor aspartil fosfatasas) y péptidos reguladores de fosfatasas (Phr) (Pottathil y Lazizzera, 2003). Las fosfatasas RapA, RapB, RapE y RapH participan exclusivamente en la esporulación, no obstante, RapA constituye el principal participante de esta ruta. Estas fosfatasas modulan la actividad del regulador de respuesta Spo0A mediante la unión y defosforilación del regulador intermedio Spo0F (**Figura 1**) (Babel y Bischofs, 2016; Diaz et al., 2012).

Los péptidos Phr se sintetizan como prepéptidos inmaduros y son exportados al espacio extracelular mediante el sistema de secreción Sec. Una vez allí, dos proteasas extracelulares, Vpr y Epr, los procesan a pentapéptidos maduros (Bendori, Pollak, Hizi y Eldar, 2015; Bischofs, Hug, Liu, Wolf y Arkin, 2009; Boguslawski, Hill y Griffith, 2015). En esta forma, el complejo oligopéptido permeasa (Opp) es capaz de internalizar los péptidos cuando sobrepasan una concentración definida (Monnet, 2003; Perego, Higgins, Pearce, Gallagher y Hoch, 1991). Específicamente en la esporulación, PhrA y PhrE regulan la actividad de las fosfatasas Rap. El principal interviniente, PhrA (ARNQT) se une a RapA generando un cambio conformacional que resulta en la inactivación de su actividad fosfatasa (**Figura 1**) (Babel y Bischofs, 2016; Diaz et al., 2012).

A pesar del conocimiento del papel de PhrA en el inicio de la esporulación, poco se conoce sobre su cinética de internalización. En adición, la unión y afinidad de este péptido por su receptor en RapA y como influye en su interacción con Spo0F aún permanece incierta. En consecuencia, resulta necesario la aplicación de técnicas alternativas que permitan llenar estos vacíos de conocimiento. En este punto, la aplicación de la técnica FRET resulta atractiva para el estudio de interacciones entre proteínas en células vivas por su alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad (Sekar y Periasamy, 2003).

La transferencia de energía de resonancia de Förster (FRET, por sus siglas en inglés) es un fenómeno físico que consiste en la transferencia no radioactiva de energía desde un fluoróforo donador a un fluoróforo aceptor (Jares y Jovin, 2003). Esta transferencia requiere que el espectro de emisión del donador coincida con el espectro de excitación del aceptor. En adición, ambos fluoróforos deben estar ubicados a una distancia menor a 10 nm y con la orientación espacial correcta (Sekar y Periasamy, 2003; Van Munster, Kreemers, Adjobo y Gadella, 2005). La transferencia de energía ocurre con cierta eficiencia, o eficiencia FRET, que depende y es inversamente proporcional a la distancia de separación de las moléculas (Sun, Rombola, Jyothikumar y Periasamy, 2013). La sensibilidad a la distancia y orientación convierte a este fenómeno en una herramienta útil para estudiar interacciones intermoleculares, especialmente, cambios conformacionales resultantes de interacción entre proteínas (Merckx, Golynskiy, Lindenburg y Vinkenburg, 2013; Piston y Kremers, 2007).

Para el estudio de proteínas se utilizaba el marcaje con fluoróforos, no obstante, la evolución de las técnicas de ingeniería genética facilitan la síntesis de proteínas funcionales fusionadas con proteínas fluorescentes (Chan et al., 2001; Karpova et al., 2003; Rowland, Brown, Medintz y Delehanty, 2015). Los beneficios del uso de proteínas fluorescentes (FP, por sus siglas en inglés) comprenden: no se necesita de marcaje con compuestos exógenos, fijación y permeabilización, y el marcaje se realiza en un radio equitativo que permite cuantificar el fenómeno en estudio (Kremers, Gilbert, Cranfill, Davidson y Piston, 2011). Precisamente, en sistemas biológicos CFP (*Cyan*) y YFP (*Yellow*), como donador y aceptor, respectivamente, constituyen las proteínas fluorescentes más utilizadas por su fotoestabilidad (Sun et al., 2013).

FRET-fotoblanqueo de aceptor constituye una variante atractiva de la técnica FRET para la cuantificación de fenómenos puesto que reduce la influencia de errores técnicos en los resultados mediante una normalización de la eficiencia FRET (Karpova et al., 2003;

Piston y Kremers, 2007). La variante consiste en la degradación selectiva y completa del fluoróforo aceptor a través de la aplicación de un láser de alto pulso. La emisión del fluoróforo donador se incrementará como resultado de la ausencia de transferencia de energía al aceptor (Sekar y Periasamy, 2003; Van Munster et al., 2005). En este método, la eficiencia FRET corresponde a la diferencia en la emisión del donador antes y después del fotoblanqueo (Karpova et al., 2003; Sekar y Periasamy, 2003).

La principal desventaja de la variante FRET-fotoblanqueo consiste en que la muestra se puede utilizar en una única ocasión (Sun et al., 2013). No obstante, esta desventaja se compensa mediante otras ventajas que corresponden a la simplicidad y rapidez de la técnica, no es necesario registrar la fluorescencia del aceptor y es posible estudiar interacciones entre proteínas en células vivas (Jares y Jovin, 2003; Sekar y Periasamy, 2003). Estas células se denominan biosensores si contienen un sistema tipo FRET que permita detectar un determinado compuesto mediante cambios en la interacción entre proteínas (Ali, Najeeb, Asim, Farhan y Raza, 2017).

El presente trabajo tiene como propósito esclarecer el papel y comportamiento de PhrA mediante la utilización de biosensores tipo FRET. En adición, determinar la influencia de las quinasas en la interacción PhrA-RapA-Spo0F. Entender mejor el proceso de esporulación facilitará el desarrollo de nuevas técnicas de control de esporas en la industria alimenticia. A sí mismo, este conocimiento resultará útil en la mejora de las técnicas de esporulación de bioproductos agrícolas basados en microorganismos del género *Bacillus*.

### **3.1 OBJETIVOS**

#### **3.1.1 Objetivo general**

Caracterizar la dinámica de señalización de PhrA en *Bacillus subtilis* mediante la utilización de biosensores tipo FRET

#### **3.1.2 Objetivos específicos**

- Evaluar la sensibilidad y especificidad del biosensor tipo FRET diseñado para este estudio
- Demostrar la producción y conservación de PhrA en microorganismos del género *Bacillus*
- Determinar la cinética y características de la señalización de PhrA
- Identificar la influencia del estado de fosforilación de Spo0F en su capacidad de interactuar con RapA.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 Cepas

Todas las cepas de *Bacillus subtilis* utilizadas en este estudio formaron parte del banco de cepas del laboratorio  $\mu$ CATs (Complex Adaptive Traits) que pertenece al Instituto Max Planck para Microbiología Terrestre ubicado en la ciudad de Heidelberg, Alemania. En la **Tabla 7** se detallan cada una de las cepas.

### 4.2 Medios de cultivo

Se utilizaron caldo y agar LB para el crecimiento y mantenimiento de la cepas de acuerdo a la composición estándar (Cutting y Vander, 1990). Ambos medios de cultivo se suplementaron con espectinomicina (SPE, 100  $\mu$ g/mL), ampicilina (AMP, 100  $\mu$ g/mL), y/o eritromicina (ERY, 3  $\mu$ g/mL) en caso de ser necesario. El medio de crecimiento (GM) y de esporulación o resuspensión (SM) se prepararon para los ensayos de esporulación (Nicholson y Setlow, 1990). El medio mínimo S<sub>7.50</sub> se utilizó para los experimentos FRET (Vasanthan y Freese, 1980). Para la transformación en *B. subtilis* se prepararon los medios SpC y SpII (Cutting y Vander, 1990). La composición exacta y la procedencia de cada componente se detallan en el **Anexo 1** y el **Anexo 2**.

### 4.3 Experimento FRET estándar

El biosensor (BIB-625) se deriva de *B. subtilis* W168 y corresponde al genotipo:  $\Delta rapA phrA \Delta spo0F amyE::[spec^R P_{hyper-spank} spo0F-yfp cfp-rapA]$ . Es decir, posee deleciones limpias de los genes que codifican para RapA, PhrA y Spo0F. Además, mediante el plásmido PDR111 se integró en el loci *amyE* los genes que codifican para las proteínas de fusión Spo0F-YFP y CFP-RapA. Estos genes estaban controlados por el promotor *hyper-spank* inducible con IPTG (**Figura 2**). La cepa presentó resistencia al antimicrobiano espectinomicina como marcador de selección (Trauth y Bischofs, 2014).

A partir del cultivo madre del biosensor, se preparó cada semana una caja de agar LB suplementado con SPE. Se sembró una colonia individual en un tubo con 5 mL de caldo LB suplementado con SPE, y se incubó a 37 °C y 180 rpm por 6 horas. Posteriormente, se inoculó 5 mL de medio S<sub>7.50</sub> con un volumen apropiado del cultivo previo para alcanzar una DO<sub>600 nm</sub> ~ 0.003, y se incubó a 30 °C y 180 rpm por 14-16 horas. Más tarde, para la inducción del sistema FRET, se inoculó un matraz con 10 mL de medio S<sub>7.50</sub> suplementado con IPTG (100  $\mu$ M) con un volumen apropiado del cultivo anterior para alcanzar una DO<sub>600</sub>

$_{nm} \sim 0.04$ . El matraz se incubó a 37 °C y 180 rpm hasta una  $DO_{600\text{ nm}} \sim 1.60$ . En este punto, se utilizó el cultivo para la estimulación (**Figura 3**).

En tubos eppendorf de 2 mL, se colocaron 5  $\mu\text{L}$  de una concentración adecuada de estímulo, PhrA o PhrA mutado (Peptides y Elephants, Alemania). Posteriormente, se añadieron 495  $\mu\text{L}$  del cultivo y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 minutos. Siempre se preparó un tubo sin estímulo que se incubó por el mismo tiempo como control negativo del experimento. La concentración inicial del estímulo se diluyó 1:100 al momento de añadir el cultivo. Los tubos se centrifugaron a 17.000 G (17 kG) por 1 minuto y se descartó el sobrenadante. Para lavar las células, estas se resuspendieron en 500  $\mu\text{L}$  de PBS, se centrifugaron en las mismas condiciones y se descartó el sobrenadante. Por último, las células se resuspendieron en 7  $\mu\text{L}$  de PBS y con este volumen se inoculó la mitad de un disco de agarosa al 1%. Esto permitió formar una monocapa densa de células para medir la fluorescencia a nivel de población (**Figura 3**).

Se utilizó el microscopio invertido de fluorescencia *Olympus IX81* equipado con un lente objetivo de aire 60x *UPLFLN* de apertura numérica de 0.9 y dos tubos fotomultiplicadores *Photon Counting Head H7421-40* (Hamamatsu, Japón), uno para captar la fluorescencia de CFP y otro para YFP. Además, el microscopio contó con un láser diodo *Cobolt 06-01 Series* de 100mW (Cobolt, Suecia) de emisión a 515 nm acoplado mediante un filtro notch *Laser Beamsplitter F73-014 z514 DCRB* (AHF, Alemania). Se utilizó un sistema de iluminación MT20 (Olympus, Japón) para excitar los marcadores fluorescentes. Las microfotografías se tomaron con una cámara EM-CCD C9100-02 (Hamamatsu, Japón) (**Figura 4**).

El microscopio y la cámara se controlaron mediante el programa *XCellence rt2.0.1* (Olympus, Japón) que permitió configurar un protocolo específico para todos los experimentos y escoger los puntos de cada muestra para aplicar dicho protocolo (**Anexo 3**). La intensidad y otras opciones del láser se manejaron con el programa *Cobolt Monitor rt2.0.1.3* (Cobolt, Suecia). Ambos programas estuvieron instalados en una misma computadora. Los tubos fotomultiplicadores (PMTs) grabaron las emisiones de fluorescencia de CFP y YFP en otra computadora mediante un programa especial diseñado para experimentos FRET en la plataforma informática *LabVIEW™ r8.5* (National Instruments, Estados Unidos). Este programa generó un archivo sin extensión que contuvo tres columnas de información: tiempo, emisión absoluta de YFP y emisión absoluta de CFP.

Se eligieron y enfocaron dos puntos de cada muestra para proveer mayor robustez a los resultados finales, y obtener el promedio y desviación estándar de cada replica biológica. Con la finalidad de atenuar la degradación de CFP, el filtro de densidad neutro interno se configuró a 7.72 % y el filtro de densidad neutro externo igual a 2. Para mantener la estabilidad de la muestra, previo a la excitación de YFP y CFP se redujo la intensidad de iluminación para cada proteína fluorescente a 1.601 % y 3.951 %, respectivamente.

En cada punto, el microscopio auto-enfocó la muestra y tomó una microfotografía de campo claro. Más adelante, se iluminó para YFP (ex: 504/12 nm, em: 542/27 nm) durante 6 segundos para confirmar la presencia de la proteína fluorescente. Posteriormente, se iluminó para CFP (ex:427/10 nm, em: 475/23 nm) por 60 segundos. Se desenfocó la muestra (-16  $\mu\text{m}$ ) para aumentar la superficie de fotoblanqueo, y se procedió al fotoblanqueo con el láser a 515 nm al 100 % de potencia durante 20 segundos. La muestra, se reenfocó (+16  $\mu\text{m}$ ) y se iluminó nuevamente para CFP por 60 segundos. Se iluminó otra vez para YFP y se tomó una microfotografía de YFP (3 segundos de exposición) con 100 % de iluminación para monitorear la eficiencia y homogeneidad del fotoblanqueo (**Anexo 3**) (**Figura 5A, 5B**).

El archivo derivado del experimento se analizó mediante un guion (*script*, en inglés) diseñado específicamente para este tipo de resultados con la herramienta informática Matlab R2017b (MathWorks Inc, Estados Unidos) (**Anexo 4**). El guion básicamente permitió separar la medición de cada punto y realizar un ajuste lineal de la fluorescencia de CFP para interpolar los valores al punto de finalización del fotoblanqueo. La eficiencia FRET se calculó de acuerdo con la fórmula  $\text{FRET} = (\text{CFP}_{\text{post}} - \text{CFP}_{\text{pre}}) / \text{CFP}_{\text{post}}$ , donde  $\text{CFP}_{\text{post}}$  y  $\text{CFP}_{\text{pre}}$  es la intensidad de fluorescencia de CFP después y antes del fotoblanqueo, respectivamente (**Figura 5C**) (Chan et al., 2001).

#### 4.4 Ensayo de esporulación

Se prepararon por separado cultivos de *B. subtilis* WT168, *B. subtilis*  $\Delta\text{phrA}$  y *B. amyloliquefaciens* en tubos con 5 mL de caldo LB sin antibióticos. Se incubaron a 37 °C y 180 rpm durante 16 horas. Más tarde, se inocularon 20 mL de medio de crecimiento (GM) con un volumen apropiado de cada cultivo previo para alcanzar una  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$  de ~ 0.04. Todos los cultivos se incubaron a 37 °C y 220 rpm, y se monitorearon hasta alcanzar una  $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$  de ~ 0.6. Posteriormente, se centrifugaron a 3750 rpm y 25 °C por 10 minutos. Las células se resuspendieron en 20 mL de medio de esporulación (SM) y se incubaron a 37 °C y 220 rpm durante 24 horas (**Figura 6**) (Nicholson y Setlow, 1990).

Se tomó 5  $\mu\text{L}$  de cada cultivo y se inoculó en discos de agarosa (Invitrogen, Alemania) al 1 % en PBS. Se tomaron microfotografías de las esporas con un microscopio invertido de campo claro *Olympus IX71* (Olympus, Japón) equipado con un lente de inmersión de 100 X *UPlanSApo* de apertura numérica de 1.4 (Olympus, Japón). Las imágenes se procesaron en el programa ImageJ R1.51 (National Institutes of Health, Estados Unidos).

#### 4.5 Extracción y análisis de sobrenadantes

Se buscó detectar el péptido PhrA en sobrenadantes de cultivos esporulantes de las cepas *B. subtilis* WT168, *B. subtilis*  $\Delta\text{phrA}$  y *B. amyloliquefaciens*. Por ello se siguió el mismo procedimiento descrito en la Sección 4.4 con ligeras modificaciones. Se utilizó un volumen de 100 mL del medio GM y SM, en lugar de 20 mL. Posterior a la resuspensión en medio SM se incubó el cultivo a 37 °C y 220 rpm. Se tomaron muestras de 4 mL al tiempo 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 180, 210 y 240 minutos, y se midió la densidad óptica en cada punto para monitorear el crecimiento del cultivo. Cada muestra se centrifugó a 3750 rpm y 25 °C por 8 minutos, se extrajo el sobrenadante y se filtró con una membrana de 0.2  $\mu\text{m}$  de poliestersulfona (PES) (VWR, Alemania). Los sobrenadantes se guardaron a -20 °C hasta su análisis (**Figura 6**).

Se preparó un cultivo con el biosensor como se describió anteriormente. Cuando se alcanzó la  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de  $\sim 1.6$ , el cultivo se centrifugó a 3750 rpm y 25 °C por 8 minutos. Las células se resuspendieron en 1 mL del mismo sobrenadante. Se estimuló 50  $\mu\text{L}$  de esta suspensión con 1950  $\mu\text{L}$  del sobrenadante extraído y se incubó a temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, se siguió el mismo procedimiento de lavado, inoculación y análisis por microscopía ya especificado en la Sección 4.3 (**Figura 7**).

#### 4.6 Diseño de modelo de señalización de PhrA

Para el planteamiento del modelo se asumió que las células son idénticas y están homogéneamente distribuidas en el medio. Esto permitió centrarnos en una célula individual que presenta un volumen propio ( $V_i$ ) y se encuentra rodeado por el volumen del medio ( $V_e$ ). A un tiempo determinado ( $t$ ), existirá una concentración definida de péptidos en el espacio extracelular ( $C_e$ ) que serán internalizados de manera unidireccional hacia el citoplasma por el complejo Opp. En el interior celular habrá una cantidad de péptidos específica ( $C_i$ ) a dicho tiempo ( $t$ ). En consecuencia, las concentración intracelular y extracelular de péptidos cambiarán en proporción inversa al volumen (**Figura 8**).

Se modeló que la internalización de los péptidos ocurre con una cinética de Michaelis-Menten. Por ello, todos los péptidos presentes en el espacio extracelular ( $C_{e,t}$ ) serán internalizados con una velocidad máxima ( $v_{max}$ ) dependiendo del número total de células ( $N_c$ ). En adición, el complejo Opp presentará una afinidad específica por los péptidos ( $K_m$ ). Una vez en el interior celular, los péptidos ( $C_{i,t}$ ) serán degradados a cierta velocidad ( $\lambda$ ). En consecuencia, se plantearon las siguientes ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dC_{e,t}}{dt} = -v_{max} * N_c * \frac{C_{e,t}}{K_M + C_{e,t}} * \frac{1}{V_e}$$

$$\frac{dC_{i,t}}{dt} = v_{max} * \frac{C_{e,t}}{K_M + C_{e,t}} * \frac{1}{V_i} - \lambda * C_{i,t}$$

La concentración total de péptidos consiste en PhrA y otros péptidos competidores. Por lo tanto, las ecuaciones diferenciales para PhrA fueron:

$$\frac{dC_{e,a}}{dt} = -v_{max} * N_c * \frac{C_{e,a}}{K_M + C_{e,t}} * \frac{1}{V_e}$$

$$\frac{dC_{i,a}}{dt} = v_{max} * \frac{C_{e,a}}{K_M + C_{e,t}} * \frac{1}{V_i} - \lambda * C_{i,a}$$

Se asumió que la respuesta FRET depende de la concentración intracelular de PhrA por lo que esta cambia de acuerdo con la variación de la cantidad de PhrA en función del tiempo. La respuesta FRET se modeló mediante una curva hiperbólica de dosis-respuesta. Por consiguiente, se describió la dinámica de señal FRET de la siguiente manera:

$$FRET(t) = FRET_0 - \Delta FRET \frac{C_{i,a}(t)}{EC_{50} + C_{i,a}(t)}$$

En esta ecuación  $FRET_0$  y  $\Delta FRET$  corresponde a la eficiencia FRET de las células sin estímulo y bajo estímulo saturante, respectivamente. La dosis mínima efectiva ( $EC_{50}$ ) corresponde a la concentración intracelular de PhrA que produce la mitad de la respuesta máxima. Este valor fue equivalente a la afinidad del receptor de PhrA en RapA (**Figura 8**).

#### 4.7 Determinación de parámetros del modelo

Para determinar la dosis mínima efectiva ( $EC_{50}$ ) se realizó un experimento dosis-respuesta donde se utilizaron concentraciones crecientes de PhrA, a saber, 1 nM, 5 nM, 10 nM, 50 nM, 100 nM, 500 nM, 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 50  $\mu$ M, 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M, 1 mM y 10 mM. Se siguió la misma metodología de estimulación, lavado e inoculación descrita

previamente en la Sección 4.3. Las células sin estímulo constituyeron el control negativo del experimento.

Para definir la velocidad máxima y afinidad del complejo Opp se realizó una cinética intracelular y una cinética extracelular. En el caso de la primera, las células se estimularon con 5  $\mu\text{L}$  de PhrA 1  $\mu\text{M}$  con diferentes tiempos de incubación: 20, 10, 5, 2, 1, y 0 minutos. Se siguió la misma metodología de lavado e inoculación descrita previamente en la Sección 4.3. Las células sin estímulo y con estímulo de PhrA 1 mM correspondieron al control negativo y positivo del experimento, respectivamente (**Figura 9**).

En el caso de la segunda, se prepararon dos cultivos en paralelo del biosensor. El primer cultivo con  $\text{DO}_{600\text{ nm}}$  de  $\sim 1.6$  se centrifugó a 3.750 rpm y 25 °C por 8 minutos, y se resuspendió en 1 mL del mismo sobrenadante. De esta manera, se concentraron las células 10 veces (10X). Posteriormente, el segundo cultivo se estimuló de manera similar a la descrita en la cinética intracelular. Cada tubo se centrifugó a 17.000 g por 1 minuto y se extrajo 450  $\mu\text{L}$  de sobrenadante. Con este sobrenadante se estimularon 50  $\mu\text{L}$  de las células concentradas 10X durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se utilizó la misma metodología de lavado e inoculación descrita previamente en la Sección 4.3. Las células concentradas estimuladas con el sobrenadante de las células sin estímulo, con PhrA 1  $\mu\text{M}$  y con PhrA 1 mM constituyeron el control negativo, positivo 1 y positivo 2 del experimento, respectivamente (**Figura 9**).

Para determinar la competición a nivel de internalización de péptidos se realizaron dos experimentos. En el primero, 490  $\mu\text{L}$  del cultivo a  $\text{DO}_{600\text{ nm}} \sim 1,6$  se estimuló con 5  $\mu\text{L}$  de PhrA 1 mM en conjunto con 5  $\mu\text{L}$  de concentraciones crecientes de PhrA mutado: 1  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 1 mM, 2 mM, y 10 mM. En el segundo, 490  $\mu\text{L}$  del cultivo a  $\text{DO}_{600\text{ nm}} \sim 1,6$  se estimuló con 5  $\mu\text{L}$  de PhrA 1  $\mu\text{M}$  en conjunto con 5  $\mu\text{L}$  de concentraciones crecientes de PhrA mutado: 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1 mM, 2 mM, y 10 mM. Las células se estimularon por 5 minutos y se siguió la misma metodología de lavado e inoculación descrita previamente en la Sección 4.3. Las células sin estímulo, con estímulo de PhrA mutado 2 mM, y la concentración de PhrA utilizada en cada experimento, correspondieron al control negativo, positivo 1 y positivo 2, respectivamente.

Para definir la competición a nivel de receptor de RapA se realizó un experimento de estimulación secuencial. Se prepararon los cultivos y se estimularon las células con la metodología estándar descrita en la Sección 4.3. Posterior al lavado, las células se

resuspendieron en 495  $\mu\text{L}$  de medio  $S_{7,50}$  y se estimularon con 5  $\mu\text{L}$  de un péptido diferente durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se lavaron las células nuevamente, y se inocularon en los discos de agarosa de la manera descrita en la Sección 4.3.

El volumen intracelular ( $V_i$ ) se determinó mediante microfotografías tomadas con el lente de 100 X del microscopio invertido *Olympus IX71* (Olympus, Japón) mencionado en la Sección 4.4. El largo y diámetro de las células se extrajo de las microfotografías y el volumen se calculó tomando como base que la célula es cilíndrica con hemisferios en ambos polos mediante la siguiente ecuación:

$$V_i = (L - D) * \pi * \left(\frac{D}{2}\right)^2 + \left(\frac{4}{3}\right) * \pi * \left(\frac{D}{2}\right)^3$$

El número de células que corresponden a una  $\text{DO}_{600 \text{ nm}} \sim 1,6$  se determinó con una cámara Neubauer tipo C-Chip (Merck, Alemania). Se observó que las células mantienen un estado de respuesta por más de 20 minutos. Por ello, se asumió que no existe degradación de péptidos en el interior celular.

Con los resultados obtenidos de los experimentos descritos se realizó un ajuste usando Matlab R2017b (**Anexo 5**). Los promedios de cada valor experimental ( $n=53$ ) se ajustaron al modelo mediante la función *fsolve* y el algoritmo de “Levenberg-Marquardt” para regresión no lineal. Este ajuste también permitió determinar los parámetros del modelo en base a los resultados experimentales. A su vez, el intervalo de confianza de los parámetros se basó en la suma de los cuadrados residuales (SSR, por sus siglas en inglés). La región de confianza para los parámetros estimados ( $\hat{\theta}$ ) se definió por un conjunto de puntos  $\text{SSR}(\theta)$  que son menor o igual a una constante dada por la distribución de Fisher:

$$\frac{\text{SSR}(\theta) - \text{SSR}(\hat{\theta})}{\text{SSR}(\hat{\theta})} \leq \frac{p}{n - p} F_{p, n-p}^{\alpha}$$

En dicha ecuación  $p$  corresponde al número de parámetros,  $n$  al número de datos y  $F^{\alpha}$  al valor de la distribución de Fisher para el valor  $\alpha$  de nivel de confianza. El intervalo de confianza se calculó mediante la función *fmincon* de Matlab R2017b que minimizó o maximizó cada cada parámetro. La función tomó la desigualdad expresada como una restricción no lineal y la optimización de punto interior como algoritmo.

Para calcular el intervalo de confianza de las curvas ajustadas se realizó un proceso de *Bootstrapping*. Los datos experimentales generados para el modelo se muestrearon

aleatoriamente para generar 10,000 grupos de datos. Para cada grupo se realizó el procedimiento de ajuste como ya se describió anteriormente. Con cada grupo de parámetros resultantes se usaron para calcular nuevas curvas de ajuste. Se utilizaron los cuantiles 0.025 y 0.975 de las curvas como intervalo de confianza del 95 %.

#### **4.8 Extracción de ADN**

Se utilizó el kit *QIAprep® Spin Miniprep* (Qiagen, Alemania) para extraer los plásmidos y se siguió las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Todos los pasos de centrifugación se realizaron a 17.000 G. Para la elución del ADN, se incubó la columna con la solución PE por dos minutos en lugar de uno. El plásmido se guardó a 4 °C hasta su utilización.

Se utilizó el kit *NucleoSpin® Tissue* (Macherey-Nagel, Alemania) para extraer el ADN genómico siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Se utilizó una solución de lisis (20 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA, 1% Tritón X-100 a pH 8) suplementada con lisozima (20 mg/mL) en lugar de la solución T1. Posterior a la centrifugación las células se resuspendieron en 180 µL de esta solución de lisis y se incubó a 37 °C por 60 minutos. Posteriormente, se añadió 20 µL de proteinasa K (Macherey-Nagel, Alemania), en lugar de 25 µL, se mezcló con el vortex, y se incubó a 56 °C por 30 minutos. Para la elución del ADN, se incubó la columna con la solución PE por dos minutos en lugar de uno. El ADN genómico se guardó a 4 °C hasta su utilización.

Todo el material genético extraído se cuantificó en ng/µL mediante el equipo *NanoDrop 1000c* (ThermoFisher Scientific, Alemania) a una longitud de onda de 260 nm. En adición, la calidad del ADN se estimó con las relaciones 260/280 y 260/230 que sugieren contaminación con proteínas y compuestos orgánicos, respectivamente, mediante el mismo equipo.

#### **4.9 Construcción de plásmidos**

##### **4.9.1 Diseño de cebadores**

Los cebadores se diseñaron y evaluaron *in silico* con el programa informático *Serial Cloner R2.6.1* (SerialBasics, Francia) a partir de a las secuencias genéticas disponibles en la base de datos del *GenBank* (NCBI, Estados Unidos) y *SubtiWiki* (Michna, Zhu, Mäder y Stülke, 2016). Los cebadores utilizados en clonación consistieron básicamente en una secuencia de 5 nucleótidos, seguido del sitio de restricción y la secuencia homóloga a la

región de interés. Los nucleótidos añadidos al inicio mejoraron la eficiencia de la digestión enzimática (Feeney, Murphy y Lopilato, 2014). En la **Tabla 4** y se encuentran todos los cebadores utilizados en este estudio. Los plásmidos se describen en la **Tabla 6**.

El plásmido integrativo pAX01 se construyó para obtener un sistema de expresión genético adicional en *B. subtilis* controlado por un promotor inducible con xilosa. El plásmido integra el sistema de expresión en el gen *lacA* que codifica para una  $\beta$ -galactosidasa de expresión débil. pAX01 presenta dos casetes de resistencia a antimicrobianos, uno para ampicilina y otro para eritromicina, que sirven como marcadores de selección para clonación en *E. coli* e integración en *B. subtilis*, respectivamente (**Figura 10A**) (Härtl, Wehrl, Wiegert, Homuth y Schumann, 2001).

El plásmido pAX01 carece de sitio de unión del ribosoma (RBS, por sus siglas en inglés) por lo que se adicionó la secuencia de Shine-Dalgarno (5'-AAGAAG-3') para posibilitar la traducción del gen de interés (Härtl et al., 2001; Watson et al., 2014). El cebador *forward* contuvo la secuencia 5'-TAACA-3', el sitio de restricción para SpeI (5'-A↓CTAGT-3') y una secuencia homóloga de 18 a 20 nucleótidos, los 3 primeros corresponden al codón de inicio nativo. El cebador *reverse* consistió en la secuencia 5'-TGATA-3', el sitio de restricción para BamHI (5'-G↓GATCC-3') y una secuencia homóloga de 20 a 22 nucleótidos situada ~ 20 nucleótidos después del codón de terminación.

El plásmido integrativo pDR111 tiene como objetivo implementar un sistema de expresión genético controlado por un promotor inducible con lactosa o IPTG. El plásmido integra el sistema genético en el gen *amyE* que codifica para un  $\alpha$ -amilasa en *B. subtilis*. pDR111 presenta dos casetes de resistencia a antimicrobianos, uno para ampicilina y otro para espectinomomicina, que sirven como marcadores de selección para clonación en *E. coli* e integración en *B. subtilis*, respectivamente (**Figura 10B**) (Ben, Rudner y Losick, 2003).

Se dispuso del plásmido derivado de pDR111 que contenía el sistema FRET (EIB-284). Por ello, se diseñaron cebadores específicos para generar una mutación contrasentido (c.160G>A) que produjeron el cambio de aminoácido D54N. Ambos cebadores consistieron en una región homóloga de 30-40 nucleótidos que contuvieron la mutación de interés. Estos cebadores contuvieron una región de hibridación entre ellos de menos de 10 nucleótidos.

El plásmido pMAD se diseñó específicamente para borrar una parte del genoma, o intercambiarla por un marcador específico. El plásmido presenta el gen *bgaB* de *Bacillus stearothermophilus* que codifica para una  $\beta$ -galactosidasa termoestable. Su expresión está

controlada por el promotor *PclpB* de la chaperona constitutiva bacteriana ClpB. La enzima  $\beta$ -galactosidasa permitirá seleccionar los mutantes en base a la metabolización de X-Gal. pMAD presenta dos casetes de resistencia a antimicrobianos, uno para ampicilina y otro para macrólidos, lincosamidas y estreptogramina B (MLS), que sirven como marcadores de selección para clonación en *E. coli* e integración en *B. subtilis*, respectivamente. El plásmido contiene también un origen de replicación termosensible que mediante choques de alta temperatura (30 a 42 °C) facilita la integración y escisión del plásmido (**Figura 11A**) (Arnaud, Chastanet y Débarbouillé, 2004).

La delección del gen de interés consiste en la integración del plásmido por recombinación de sitio específico mediante un primer choque de temperatura. Este choque inhabilita la capacidad replicativa del plásmido por lo que este debe integrarse en el genoma. En este punto, las colonias transformadas presentarán resistencia a MLS y actividad  $\beta$ -galactosidasa. Más tarde, un segundo choque de temperatura provocará la escisión del plásmido mediante un segundo evento de recombinación (**Figura 11B**). Este plásmido contendrá la parte del genoma que se desea eliminar. Las colonias transformadas no presentan resistencia a antimicrobianos ni actividad  $\beta$ -galactosidasa (Arnaud et al., 2004).

Para la eliminación del gen de interés se diseñaron cebadores que amplifiquen la región corriente arriba y la región corriente abajo de dicho gen. Ambas regiones se unieron por una secuencia no reguladora (**Figura 11B**) (Arnaud et al., 2004). Para la región corriente arriba del gen de interés, el cebador *forward* consistió en la secuencia 5' - TACGC-3', el sitio de restricción para Sall (5'-G↓TCGAC-3') y una secuencia homóloga de 20-22 nucleótidos. El cebador *reverse* de la región corriente arriba contuvo una secuencia de 20 nucleótidos nueva sin la presencia de elementos reguladores y una secuencia homóloga de 20-23 nucleótidos. Para la región corriente abajo, el cebador *forward* contuvo la misma secuencia de 20 nucleótidos del anterior cebador que permitirá fusionar ambos fragmentos y una secuencia homóloga de 21 nucleótidos. El cebador *reverse* de la región corriente abajo consistió en la secuencia 5' - TAAGC-3', el sitio de restricción para BglII (5'-A↓GATCT-3') y una secuencia homóloga de 22 nucleótidos.

Los cebadores de verificación, cribado y secuenciación consistieron en una secuencia homóloga de 20-25 nucleótidos ubicada a 80-100 nucleótidos separada de la secuencia de interés (Bergkessel y Guthrie, 2013; Feeney et al., 2014).

#### 4.9.2 Generación de fragmentos por PCR

La temperatura de hibridación dependió del par de cebadores que se utilizaron y se calculó mediante la herramienta en línea *Tm Calculator* (ThermoFisher Scientific, Alemania). En la **Tabla 5** se detallan las condiciones de PCR para cada par de cebadores. El templado utilizado en la generación de fragmentos fue el ADN genómico de *B. subtilis* W168, a excepción de la mutagénesis de sitio dirigida en que se utilizó el plásmido pDR111 con el sistema FRET (EIB-284).

Cada reacción de PCR convencional se realizó en un volumen final de 20  $\mu$ L que contuvo 1 X de *Phire Reaction Buffer* (ThermoFisher Scientific, Alemania), 200  $\mu$ M de dNTPs (ThermoFisher Scientific, Alemania), 0.5  $\mu$ M del cebador *Forward*, 0.5  $\mu$ M del cebador *Reverse*, 100 ng de muestra de ADN y 0.4  $\mu$ L de *Phire Hot Start II DNA Polymerase* (ThermoFisher Scientific, Alemania). Las condiciones de amplificación fueron 3 minutos de denaturación inicial a 98 °C, seguido de 30 ciclos de denaturación por 5 segundos a 98 °C, hibridación por 10 segundos a determinada temperatura, y extensión a 72 °C por un tiempo específico, y extensión final por 3 minutos a 72°C. El tiempo de extensión dependió del tamaño del fragmento a amplificar siguiendo la regla 15 s/kb. Para la amplificación de loci completos se añadió dimetilsulfóxido (DMSO, ThermoFisher Scientific, Alemania) al volumen de reacción con una concentración final de 2.5 % y se utilizaron 35 ciclos de PCR.

Cada reacción de PCR de fusión se realizó en un volumen final de 20  $\mu$ L que contuvo 1 X de *Phusion HF Buffer* (ThermoFisher Scientific, Alemania), 200  $\mu$ M de dNTPs (ThermoFisher Scientific, Alemania), 0.5  $\mu$ M del cebador *Forward*, 0.5  $\mu$ M del cebador *Reverse*, 100 ng del fragmento 1 de ADN, 100 ng del fragmento 2, y 0.02 U/ $\mu$ L de *Phusion Hot Start II DNA Polymerase* (ThermoFisher Scientific, Alemania). La PCR de fusión consistió primero en una etapa de pre-amplificación de 10 ciclos con la mezcla de reacción sin los cebadores con la finalidad de enlazar ambos fragmentos. Más adelante, se añadieron los cebadores y se amplificó el fragmento completo por 30 ciclos más. Las condiciones de amplificación fueron 3 minutos de denaturación inicial a 98 °C, seguido de ciclos de denaturación por 10 segundos a 98 °C, hibridación por 30 segundos a determinada temperatura, y extensión a 72 °C por un tiempo específico, y extensión final por 3 minutos a 72°C. El tiempo de extensión dependió del tamaño del fragmento a amplificar siguiendo la regla 30 s/kb.

Cada reacción de PCR para mutagénesis de sitio dirigida se realizó en un volumen final de 50  $\mu\text{L}$  que contuvo 1X de *Q5 Reaction Buffer* (New England BioLabs, Alemania), 0.5  $\mu\text{M}$  del cebador *Forward* y 0.5  $\mu\text{M}$  del cebador *Reverse*, 200  $\mu\text{M}$  de dNTPs (ThermoFisher Scientific, Alemania), 1X de *Q5 High GC Enhancer* (New England BioLabs, Alemania), y 0.02 U/ $\mu\text{L}$  de *Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase* (New England BioLabs, Alemania). Se utilizaron diferentes cantidades de ADN plasmídico que variaron desde 12.5 ng hasta 200 ng. En total se llevaron a cabo 10 reacciones. Las condiciones de amplificación fueron 3 minutos de denaturación inicial a 98 °C, seguido de 20 ciclos de denaturación por 30 segundos a 98 °C, hibridación por 60 segundos a 55 °C, y extensión a 68 °C por 20 minutos, y extensión final por 20 minutos a 68°C. Se utilizó esta temperatura de hibridación por la alta especificidad de los cebadores diseñados.

Para la verificación de los fragmentos amplificados se prepararon geles de agarosa al 1 % en tampón TAE 1X con SYBR Safe (ThermoFisher Scientific, Alemania). Cada muestra se mezcló con *DNA Gel Loading Dye 6X* (ThermoFisher Scientific, Alemania) en proporción 5:1. Se utilizó el marcador de peso molecular *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (ThermoFisher Scientific, Alemania) y el gel se corrió a 90 V durante 40-45 minutos.

Los productos de PCR corridos en el gel se extrajeron con el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN purificado se almacenó a 4 °C hasta su utilización.

#### **4.9.3 Digestión y ligación**

La digestión se realizó con las enzimas de restricción BamHI, SpeI, Sall y BglII (New England BioLabs, Alemania) dependiendo del fragmento de ADN y el plásmido. Se utilizó un volumen de reacción de 50  $\mu\text{L}$  que contuvo 1X de *CutSmart® Buffer* (New England BioLabs, Alemania), 1  $\mu\text{g}$  de ADN y 10 U de la enzima de restricción (equivalente a 1  $\mu\text{L}$ ). La mezcla de reacción se incubó a 37 °C por dos horas. Los productos de digestión se purificaron con el kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Estados Unidos) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se utilizó la herramienta en línea *Ligation Calculator* (Universidad de Düsseldorf, Alemania) para calcular la cantidad de inserto de ADN requerido para 80-100 ng de plásmido digerido en una proporción 3:1. La ligación se realizó con un volumen de reacción de 20  $\mu\text{L}$  que contuvo 1X de *T4 DNA Ligase Buffer* (New England BioLabs, Alemania), 80-100 ng de plásmido, la masa de inserto de ADN calculada y 1  $\mu\text{L}$  de *T4 DNA Ligase* (New England

BioLabs, Alemania). Se incubó la mezcla a temperatura ambiente por 20 minutos y se utilizó directamente para la transformación en *E. coli*.

En el caso del plásmido con mutación dirigida, se añadió 1  $\mu\text{L}$  de DpnI a la mezcla de reacción de PCR y se incubó a 37 °C por cinco horas. Esta mezcla se utilizó directamente para la transformación en *E. coli*.

#### 4.9.4 Clonación

Cada plásmido resultante de la metodología descrita en la sección previa se introdujo en células químicamente competentes de *Escherichia coli* DH5 $\alpha^{\text{TM}}$  (Invitrogen, Estados Unidos). Las células se descongelaron en hielo previo a su utilización. Se colocaron 15  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción en un tubo eppendorf de 1.5 mL y se añadieron 50  $\mu\text{L}$  de las células competentes. Como control negativo, se utilizó el mismo volumen de células sin la mezcla de reacción. Los tubos se incubaron en hielo durante 30 minutos. Posteriormente, se realizó un choque de temperatura por 90 segundos a 42 °C y los tubos se colocaron nuevamente en hielo durante 60 segundos. Más tarde, se añadió 450  $\mu\text{L}$  de caldo LB sin antibióticos a cada tubo, y se incubaron a 37 °C y 180 rpm por 60 minutos. Por último, 100  $\mu\text{L}$  de las células transformadas se sembraron por superficie en cajas de agar LB suplementado con AMP y se incubaron a 37 °C por 24 horas.

Se utilizó la PCR de colonias para el cribado de clones transformados. Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 12.5  $\mu\text{L}$  que contuvo 1 X *PCR Máster Mix* (ThermoFisher Scientific, Alemania), 0.5  $\mu\text{M}$  del cebador *Forward* y 0.5  $\mu\text{M}$  del cebador *Reverse*. Se picó una colonia con una punta de pipeta de 200  $\mu\text{L}$  estéril y se inoculó en una mezcla de reacción (Bergkessel y Guthrie, 2013). Las condiciones de amplificación por PCR fueron 5 minutos de denaturación inicial a 95 °C, seguido de 30 ciclos de denaturación por 30 segundos a 95 °C, hibridación por 30 segundos a determinada temperatura, y extensión a 72 °C por un tiempo específico, y extensión final por 8 minutos a 72°C. El tiempo de extensión dependió del tamaño del fragmento a amplificar siguiendo la regla 1 min/kb (**Tabla 5**).

Las colonias positivas se inocularon en tubos con 5 mL de caldo LB suplementado con AMP y se incubaron a 37 °C y 180 rpm por 16 horas. Este cultivo se utilizó para guardar en crioviales a -80 °C y extraer el plásmido como ya se especificó anteriormente. El plásmido se envió a secuenciar a *GATC Biotech* (Heidelberg, Alemania) para confirmar la presencia de la secuencia deseada.

#### 4.10 Generación de cepas de *Bacillus subtilis*

Ninguna de las cepas utilizadas en este estudio tenía algún defecto en el sistema de competitividad de *B. subtilis*. En consecuencia, se siguió una metodología de transformación de dos pasos para la inducción de competencia genética. La cepa de interés se sembró en un tubo con 5 mL de caldo LB suplementado con los antibióticos adecuados dependiendo de los marcadores de selección. Se inoculó un matraz con 20 mL de medio SpC con un volumen determinado del cultivo previo para alcanzar una  $DO_{600\text{ nm}}$  de  $\sim 0.4$ . El matraz se incubó a 37 °C y 180 rpm. Se tomaron medidas de densidad óptica cada 30 minutos para monitorear el crecimiento microbiano (Cutting y Azevedo, 1995; Cutting y Vander, 1990).

Cuando el cultivo comenzó la fase estacionaria se detuvo la incubación. Se inoculó un matraz con 20 mL de medio SpII con 2 mL del cultivo en fase estacionaria. El matraz se incubó en las mismas condiciones descritas por 90 minutos. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 3.750 rpm y 25 °C por 8 minutos. Se resuspendieron las células con 1.8 mL del sobrenadante y 0.2 mL de glicerol al 60 %. Se distribuyeron 500  $\mu\text{L}$  de las células competentes en tubos eppendorf de 1.5 mL y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización (Cutting y Azevedo, 1995; Cutting y Vander, 1990).

Se colocó 1-1.5  $\mu\text{g}$  de plásmido en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Los plásmidos pAX01 y pDR111 se linearizaron con PvuI y BspI, respectivamente, en un volumen de reacción de 50  $\mu\text{L}$ . Se descongelaron las células a 37 °C e inmediatamente se añadieron 150  $\mu\text{L}$  de estas. Como control negativo, se utilizó el mismo volumen de células sin el plásmido. Se incubó el tubo a 37 °C y 180 rpm durante 45 minutos. Se agregó 800  $\mu\text{L}$  de caldo LB sin antibióticos y se incubó a 37 °C y 180 rpm durante 60 minutos. Se sembró por superficie 100  $\mu\text{L}$  del cultivo en una caja de agar LB suplementado con antibióticos. Los antibióticos dependieron del plásmido que se utilizó para la transformación. El resto del cultivo se centrifugó a 17.000 g por 3 minutos. Las células se resuspendieron en 100  $\mu\text{L}$  del mismo sobrenadante y se sembraron en otra caja de agar LB suplementado con los mismos antibióticos. Las cajas se incubaron a 37 °C durante 24 horas (Cutting y Azevedo, 1995; Cutting y Vander, 1990).

Para las cepas transformadas con el plásmido pAX01, el medio LB se suplementó con ERY, y en el caso del plásmido pDR111 con SPE. Se realizó una PCR de las colonias que crecieron como se describió en la Sección 4.9.4. La recombinación homóloga resultó en la integración del fragmento de interés y el marcador de resistencia en el genoma (**Figura**

12). Por ello, se tomaron como colonias positivas a las colonias que no presentaron amplificación puesto que su tamaño (>7 kb) sobrepasa la eficiencia de *Taq* polimerasa utilizada.

Las colonias positivas se aislaron en nuevas cajas de agar LB suplementado con antibióticos de acuerdo con el plásmido transformado. Colonias individuales se inocularon en tubos con 5 mL de caldo LB suplementado con los mismos antibióticos y se incubaron a 37 °C y 180 rpm por 16 horas. Estos cultivos se utilizaron para extraer el ADN genómico, el que se utilizó para verificar la correcta integración de la secuencia de interés mediante PCR convencional como se describió en la Sección 4.9.2. También, se amplificó el gen *bla* para descartar recombinación de sitio específico.

Las cepas transformadas con el plásmido pMAD se sembraron en cajas de agar LB suplementado con X-Gal (100 µg/mL) y antibióticos MLS, a saber, ERY (2 µg/mL) y LNC (25 µg/mL), y se incubaron a 30 °C por 2-3 días. Se preparó un cultivo de 5 colonias azules en 5 mL de caldo LB suplementado con MLS y se incubó a 30 °C y 180 rpm por 16 horas. Se inoculó un matraz con 10 mL de caldo LB suplementado con MLS a partir de dicho cultivo para alcanzar una  $DO_{600\text{ nm}}$  de ~ 0.1, y se incubó a 30 °C y 180 rpm durante 2 horas. Se cambió la temperatura a 42 °C y se continuó la incubación por 6 horas más. Este constituyó el primer choque térmico para inducir la integración del plásmido en el genoma. Se prepararon diluciones seriadas con caldo LB hasta la dilución  $10^{-7}$ . Se sembró por superficie las cuatro últimas diluciones ( $10^{-4}$  a  $10^{-7}$ ) en cajas de agar LB suplementado con X-Gal y MLS, y se incubaron a 42 °C por 16 horas. Se realizó una PCR de las colonias azules para comprobar la integración del plásmido (Arnaud et al., 2004).

Cinco a diez colonias positivas se inocularon en un tubo con 5 mL de caldo LB sin antibióticos. El tubo se incubó a 30 °C y 180 rpm durante 6 horas. Se cambió la temperatura a 42 °C y se continuó la incubación por 3 horas más. Este constituyó el segundo choque térmico para inducir la escisión del plásmido desde el genoma. Se prepararon diluciones seriadas con caldo LB hasta la dilución  $10^{-7}$ . Se sembró por superficie las cuatro últimas diluciones ( $10^{-4}$  a  $10^{-7}$ ) en cajas de agar LB suplementado con X-Gal y sin antibióticos, y se incubaron a 42 °C por 16 horas. Se realizó una PCR de las colonias sin color para comprobar la escisión del plásmido y la delección del gen de interés (Arnaud et al., 2004).

Las colonias positivas se aislaron en cajas de agar LB suplementado con X-Gal y sin antibióticos. Colonias individuales sin color se inocularon en tubos con 5 mL de caldo LB

sin antibióticos, y se incubaron a 37 °C y 180 rpm por 16 horas. Estos cultivos se utilizaron para extraer el ADN genómico, el que se utilizó para verificar la delección del gen de interés mediante PCR convencional. También, se amplificó el gen de interés para confirmar su ausencia. Por último, se utilizaron cebadores específicos para el gen *bla* para verificar la escisión del plásmido y su ausencia en la célula.

#### 4.11 Estimulación de nuevas cepas

Se utilizó el mismo procedimiento de estimulación con PhrA descrito en la Sección 4.3 para todas las cepas generadas. No obstante, para las cepas transformadas con el plásmido pAX01, la expresión genética se indujo con 1 % (m/v) de xilosa (Sigma-Aldrich, Alemania) y 100 µM de IPTG al mismo tiempo.

Una serie de experimentos se realizó en la Facilidad para Citometría de Flujo e Imagen del Instituto Max Planck para Microbiología Terrestre en Marburg, Alemania. Se utilizó un microscopio invertido de fluorescencia *Nikon ECLIPSE Ti2* (Nikon, Japón) equipado con un lente objetivo de aire 60x *Plan Apo* de apertura numérica de 0.95 (Nikon, Japón). El microscopio también estuvo enlazado con un cámara *iXON 897 EMCCD* (Andor, Reino Unido) y un láser diodo *Klasech* de 300 mW (Acal BFi, Bélgica) de emisión a 532 nm acoplado mediante un filtro *beamsplitter* de 532nm. Se utilizó un sistema de iluminación *X-Cite Exact Illuminator* (Excelitas, Alemania) para excitar la fluorescencia.

Con la finalidad de atenuar la degradación de CFP, el filtro de densidad neutro externo se configuró en 12. Se eligieron y enfocaron dos puntos de cada monocapa densa de células correspondiente a cada muestra. En cada punto se iluminó para YFP (ex: 504/12 nm, em: 554/23 nm) durante 2 segundos. Posteriormente, se excitó CFP (ex: 436/20 nm, em: 480/40 nm) por 40 segundos, se procedió al fotoblanqueo por 4 segundos, y se iluminó nuevamente para CFP durante 30 segundos. Por último, se excitó YFP durante dos segundos para comprobar la eficiencia del fotoblanqueo. Este microscopio no contaba con tubos fotomultiplicadores, por ello la eficiencia FRET se calculó a partir del análisis de las microfotografías tomadas cada segundo mediante la herramienta ImageJ R1.51. Para este análisis se tomó la misma región de las imágenes donde la eficiencia del fotoblanqueo fue mayor al 90 %.

## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Especificidad y sensibilidad del biosensor tipo FRET

Se dispuso de un biosensor tipo FRET PhrA-deficiente que expresa las proteínas de fusión RapA-CFP y Spo0F-YFP mediante un promotor inducible con IPTG. Las células sin ningún tipo de estímulo presentaron una eficiencia FRET de  $\sim 0.11$ . Experimentos de complementación con PhrA demostraron que un estímulo de  $10 \mu\text{M}$  de PhrA sintético es suficiente para recuperar el nivel de esporulación de la cepa salvaje (Perego, 1997; Perego y Hoch, 1996). Por ello, se estimularon las células con la misma concentración de PhrA y se obtuvo una eficiencia FRET de  $\sim 0.04$  (**Figura 13**). Este resultado confirma que este péptido forma un complejo trimérico con RapA y Spo0F puesto que RapA posee un sitio de unión físico individual para el péptido y otro diferente para Spo0F (Diaz et al., 2012). En consecuencia, la unión de PhrA produce un cambio conformacional en RapA que resulta en la inhibición alostérica de su actividad fosfatasa (Gallego y Marina, 2013; Ishikawa, Core y Perego, 2002; Parashar, Mirouze, Dubnau y Neiditch, 2011).

Las células se estimularon con una concentración de  $10 \text{ nM}$  de PhrA, equivalente a una dilución 1:1000 del estímulo de  $10 \mu\text{M}$ . Como se esperaba, a dicha concentración se observó un cambio significativo en comparación a las células sin estímulo. La eficiencia FRET obtenida fue de  $\sim 0.07$  (**Figura 13**). La espectrometría de masas es una técnica útil para la determinación de proteínas y péptidos. Sin embargo, la detección de pentapéptidos, como PhrA, resulta complicada a concentraciones nanomolares, sobre todo en muestras biológicas (Angel et al., 2012). Por ello, el biosensor resulta una alternativa útil para la detección de PhrA por su alta sensibilidad.

Con la finalidad, de probar la especificidad del receptor de RapA, se utilizó un péptido PhrA mutado (AQTRN) que contiene el mismo número y tipo de aminoácidos. Se utilizó un estímulo de  $20 \mu\text{M}$  en el experimento y se obtuvo una eficiencia FRET similar a las de las células sin estímulo, sin diferencia significativa (**Figura 13**). Además, otros pentapéptidos de la familia Phr tampoco presentaron ningún efecto en la interacción RapA-Spo0F (**Anexo 6**). Estos resultados confirman que el receptor de RapA es altamente específico para PhrA (Ishikawa et al., 2002). Al mismo tiempo, estos experimentos afirman que este biosensor tipo FRET presenta alta especificidad para detectar PhrA. Por ello, utilizamos se lo utilizó para monitorear la producción de PhrA en cultivos esporulantes de *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens*.

## 5.2 Función de PhrA en la esporulación

Se realizaron ensayos de esporulación con la cepa *B. subtilis* W168, una cepa PhrA-deficiente derivada de esta, y una cepa silvestre de *B. amyloliquefaciens*. Después de 24 horas de incubación en medio de esporulación, la población entera de la cepa PhrA-deficiente sufrió un proceso de lisis y muerte celular puesto que carece de la capacidad de producir esporas (**Figura 14B**). Por otro lado, *B. subtilis* W168 y *B. amyloliquefaciens* esporularon como respuesta a la escasez de nutrientes (**Figura 14A, 14C**). Este resultado resalta la importancia de PhrA para iniciar el proceso de esporulación en este microorganismo (**Figura 1**) (Perego y Hoch, 1996).

PhrA es un péptido regulador de fosfatasa que interactúa directamente con RapA. Esto resulta en la inhibición de su actividad fosfatasa sobre la proteína Spo0F, de manera que esta puede transferir el fosfato hacia Spo0B, y este a su vez, hacia el factor de transcripción Spo0A (Burbulys, Trach y Hoch, 1991; Diaz et al., 2012; Perego, 1997). Este factor regula la expresión de una gran cantidad de genes, entre los que se encuentran algunos factores sigma que intervienen en las diferentes fases de esporulación (Fawcett, Eichenberger, Losick y Youngman, 2000; Molle et al., 2003). En consecuencia, la deficiencia de PhrA resulta en una actividad descontrolada de RapA que imposibilita la producción de esporas (**Figura 1**) (Perego y Hoch, 1996).

*B. subtilis* presentó una eficiencia de esporulación de ~ 50 % a las 24 horas del inicio de la escasez de nutrientes. En consecuencia, se observaron muchas células “tardías” que aún no entraron en proceso de esporulación (**Figura 14A**). Este es el resultado de un fenómeno denominado heterogeneidad temporal que es común en *B. subtilis*. La heterogeneidad resulta en dos subpoblaciones celulares: “tempranas” y “tardías”. Este proceso surge en una población microbiana con la finalidad de aprovechar al máximo los nutrientes y como preparación para dos condiciones ambientales opuestas: una en la que exista nuevamente disponibilidad de nutrientes, y otra en la que las condiciones de estrés permanezcan constantes (De Jong et al., 2010; Veening et al., 2008). Las esporas “tempranas” se terminan de producir a ~ 20-22 horas de incubación en medio de esporulación, tras lo que comienza la formación de esporas “tardías” (Mutlu et al., 2018).

*B. amyloliquefaciens* aparentemente muestra mayor eficiencia y velocidad en la producción de esporas en comparación a *B. subtilis* puesto que cerca del 100 % de la población celular esporuló a las 24 horas de incubación (**Figura 14C**). El resultado

concuerta con la alta eficiencia de esporulación (~ 95 %) de esta cepa en medios mínimos con mezcla de sales (Díaz et al., 2015). Sin embargo, no hay suficiente información disponible del proceso de esporulación en *B. amyloliquefaciens*. Las diferencias en eficiencia y velocidad sugieren diferentes cinéticas de producción de PhrA entre estas tres cepas. Por ello, se extrajeron sobrenadantes de cultivos esporulantes siguiendo la metodología descrita en la Sección 4.5, para monitorear la producción de PhrA con la ayuda de el biosensor tipo FRET de *B. subtilis*.

### 5.3 Determinación de PhrA en cultivos esporulantes

Se extrajo sobrenadantes cada 20 minutos de cultivos en medio de esporulación de *Bacillus subtilis* W168, la cepa PhrA-deficiente y *B. amyloliquefaciens*. Se estimuló las células del biosensor con los sobrenadantes extraídos del cultivo al inicio y a los 80 minutos de incubación. Las tres cepas al inicio del ensayo no produjeron ningún péptido (**Figura 15**). Como se esperaba, la cepa PhrA-deficiente exhibió niveles de eficiencia FRET similares a las células sin estímulo puesto que esta cepa es incapaz de sintetizar PhrA. En el caso de la cepa silvestre de *B. subtilis* se observó una diferencia significativa en la respuesta FRET. *B. amyloliquefaciens* también produjo un péptido detectable por el biosensor. Los genomas de varios aislados de esta especie presentan un gen que codifica para una proteína de secuencia similar a la de PhrA de *B. subtilis* (He et al., 2012). Además, este péptido es muy conservado en microorganismos esporulantes del género *Bacillus* (**Anexo 7**). En consecuencia, se sugiere que *B. amyloliquefaciens* produce PhrA con la misma función que en *B. subtilis* (Even, Omer, Pollak y Eldar, 2016).

A consecuencia de que el biosensor fue capaz de detectar PhrA de estas cepas, se utilizaron todos los sobrenadantes extraídos hasta las cuatro horas de incubación. Tal como se describió antes, la cepa PhrA-deficiente mantuvo el nivel de las células sin estímulo. Aparentemente, *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* presentan cinéticas de producción de PhrA similares. La producción comienza aproximadamente al minuto 30 y permanece constante, en los mismos niveles, hasta el minuto 220 (**Figura 16**). La expresión de *phrA* al inicio de la depleción de nutrientes resalta la importancia de este péptido para iniciar el proceso de esporulación (Perego y Hoch, 1996). Específicamente, este péptido permite la acumulación de Spo0A fosforilada que a su vez activa la expresión de los genes tempranos de esporulación. Esta expresión comienza a los 40 minutos de incubación en medio de

esporulación lo que concuerda claramente con la elevada producción de PhrA (**Figura 16**) (Parker, Daniel y Errington, 1996; Partridge y Errington, 1993; York et al., 1992).

La síntesis de PhrA de *B. subtilis* termina aproximadamente al minuto 180. Esto concuerda con un experimento adicional en el que se monitoreo la producción de PhrA de la misma cepa hasta las 24 horas de incubación en medio de esporulación (**Anexo 8**). Por otro lado, la síntesis de este péptido parece continuar posterior a la hora cuatro de incubación en el caso de *B. amyloliquefaciens*. Este hecho esta relacionado con la producción continua de esporas observada en esta cepa tras la depleción de nutrientes en medios mínimos de mezcla de sales (Díaz et al., 2015). Además, concuerda con la eficiencia de esporulación observada en la microfotografía antes descrita (**Figura 14C**).

#### **5.4 Modelo de señalización de PhrA**

Las características y utilidad del biosensor para detectar PhrA abrieron la interrogante si puede ser implementado como una herramienta cuantitativa. Por ello, se diseñó un modelo de internalización de PhrA y de respuesta FRET. Con la finalidad de determinar los parámetros contemplados en el modelo se realizaron diversos experimentos: una curva dosis-respuesta, una cinética intracelular y extracelular, un experimento de competición y una estimulación secuencial con diferentes péptidos.

##### **5.4.1 Dosificación-respuesta**

Se estimularon las células con diferentes concentraciones de PhrA variando desde 10 pM hasta 100  $\mu$ M. La eficiencia FRET permaneció en el nivel de las células sin estímulo a una concentración menor a 1 nM. Este correspondió al nivel mínimo de detección del biosensor. Por el contrario, con una estimulación mayor a 100 nM, el receptor de RapA se saturó por lo que se obtuvo una eficiencia FRET de  $\sim 0.04$ . La variación en la respuesta FRET se pudo observar en el rango de 1-100 nM de estímulo (**Figura 17**). Los ensayos de esporulación con cepas PhrA-deficientes presentan diferencias significativas a partir de una estimulación de 1  $\mu$ M con PhrA. En consecuencia, el biosensor tipo FRET es una herramienta más sensible para la detección de concentraciones nanomolares de PhrA (Perego, 1997; Perego y Hoch, 1996). Otros péptidos Phr interactúan con sus correspondientes proteínas Rap produciendo cambios significativos a nivel genético y fenotípico en el mismo rango de estimulación utilizado, es decir, concentraciones nanomolares de péptido (Bendori et al., 2015; Lazazzera, Solomon y Grossman, 1997;

Mirouze, Parashar, Baker, Dubnau y Neiditch, 2011; Ogura, Shimane, Asai, Ogasawara y Tanaka, 2003; Solomon, Lazazzera y Grossman, 1996).

Mediante el modelo se realizó un ajuste de los resultados y se determinó la concentración intracelular de PhrA y la dosis mínima efectiva ( $EC_{50}$ ). Este valor corresponde a una concentración intracelular de  $\sim 41 \mu\text{M}$  que equivale a una estimulación con PhrA de  $\sim 10 \text{ nM}$  (**Tabla 2**) (**Figura 17**). Este resultado confirma la baja afinidad que presenta el receptor de RapA, y otras proteínas de la misma familia, que se encuentra en el rango  $\mu\text{M}$  (Even et al., 2016; Gallego y Marina, 2013; Ogura et al., 2003). Conociendo la dosis mínima efectiva, se utilizó un estímulo de  $10 \text{ nM}$  de PhrA para los siguientes experimentos.

#### 5.4.2 Cinética de internalización

Se utilizaron distintos tiempos de estimulación para elaborar la cinética intracelular dado que la respuesta FRET depende de la concentración de PhrA en el interior de la célula. Para la cinética extracelular, se centrifugaron las células después de la estimulación y se extrajo el sobrenadante. Este se utilizó para estimular un nuevo grupo de células con la finalidad de determinar la concentración extracelular de PhrA (**Figura 9**). Se observó que hasta el minuto 8, las células internalizan completamente el péptido extracelular disponible (**Figura 18A, 18B**). Este proceso de internalización depende del complejo oligopéptido permeasa (Opp). Por ello las características de este complejo influyen directamente en la velocidad de internalización y afinidad por los oligopéptidos (Perego et al., 1991; Rudner, LeDeaux, Ireton y Grossman, 1991).

En base al modelo se pudo calcular la velocidad máxima y afinidad que corresponden a los valores  $\sim 0.3 \text{ amol/min}$  y  $\sim 12 \text{ nM}$ , respectivamente (**Tabla 2**). La afinidad predicha es mayor al valor reportado para el complejo Opp en gram negativos que se encuentra en el rango  $\mu\text{M}$  (Tame et al., 1994). Esta diferencia probablemente esta relacionada a la discrepancia estructural de la pared celular entre ambos grupos bacterianos. Específicamente, la proteína de unión a los péptidos (OppA) es una lipoproteína anclada a la pared en gram positivos, mientras que en gram negativos es una proteína difusible del espacio periplasmático (Perego et al., 1991). En adición, la integridad de complejo Opp, y el operón que lo codifica, resulta esencial para la internalización (**Anexo 9**) (LeDeaux, Solomon y Grossman, 1997; Perego et al., 1991). Por otro lado, la velocidad de internalización predicha es mayor (equivalente a  $\sim 180,000 \text{ moléculas/min}$ ) a la reportada

para PhrC (~ 2,000 moléculas/min). Esto se debe a la sensibilidad de la técnica experimental utilizada en dicho estudio, a saber, PhrC radiomarcado (Lazazzera et al., 1997).

Posterior al minuto 8, las células mantuvieron un estado de “memoria” como respuesta al estímulo, a pesar de que PhrA en el espacio extracelular estuvo completamente agotado (**Figura 18A, 18B**). Esta “memoria” se puede explicar por la elevada estabilidad de la interacción entre los péptidos Phr y sus correspondientes proteínas Rap (Gallego y Marina, 2013). Hasta el momento sólo se describió una peptidasa intracelular, PepF, que parece participar en el procesamiento de PhrA y modular su actividad sobre RapA. Sin embargo, esta actividad está relacionada a la sobreexpresión de un plásmido multicopia (Kanamaru, Stephenson y Perego, 2002). Por otro lado, la utilización de un plásmido integrativo con el gen *pepF* inducible con xilosa presentó un efecto débil de la peptidasa sobre PhrA (**Anexo 10**).

#### 5.4.3 Competición con otros péptidos de señalización

Para determinar la competición a nivel del complejo Opp se realizaron dos experimentos de estimulación simple con dos concentraciones de PhrA y diluciones seriadas de PhrA mutado. Como ya se describió con anterioridad en la sección 5.2, el péptido mutado no produce ningún tipo de respuesta FRET (**Figura 19**). Cuando la concentración del péptido competidor es igual o menor a la concentración de PhrA, este no afecta de ninguna manera su internalización. Por otro lado, cuando la cantidad de péptido competidor sobrepasa diez veces la de PhrA, este comienza a influir en su internalización, y por ende en la respuesta FRET. En adición, esta respuesta aumentó de una manera dosis-respuesta conforme acrecenta la cantidad de péptido competidor. Por último, se recuperó el nivel de las células sin estímulo a partir de una concentración de péptido competidor mil veces, o mayor, a la de PhrA (**Figura 19**).

Los resultados confirman que el complejo Opp no internaliza a los oligopéptidos con especificidad de secuencia. Por ello, este complejo es capaz de internalizar no sólo péptidos de señalización, sino también, otros péptidos efectores (Mirouze et al., 2011; Perego et al., 1991). La ausencia de especificidad del complejo es posible porque OppA posee una envoltura de unión al péptido de alta versatilidad (Tame et al., 1994).

Para determinar la competición a nivel de receptor de RapA se realizó un experimento de estimulación secuencial con PhrA mutado y con PhrA normal. Cuando las células se estimularon con el péptido mutado no se observó ningún cambio en la respuesta

FRET. Posteriormente, se lavaron las mismas células y se estimularon con PhrA normal 10 nM. Como se esperaba, las células respondieron al estímulo de la manera habitual independientemente de la cantidad de péptido competidor que se encuentra en el interior celular (**Figura 20**). Esto se explica por la alta especificidad de la interacción entre cada proteína Rap y su correspondiente péptido regulador Phr (Core, Ishikawa y Perego, 2001; Perego, 1997).

Por un lado, la especificidad en los péptidos esta dada por los aminoácidos en las posiciones 1, 3 y 4 que presentan alta variabilidad entre la familia Phr. Precisamente, el péptido competidor utilizado presenta diferentes residuos en las mismas posiciones, por lo que es incapaz de unirse al receptor de RapA (Mirouze et al., 2011). Por otro lado, el sitio de interacción del receptor consiste en un canal formado por 7 repeticiones tetratricopéptido (TPR). Estas contienen diversos residuos que participan en el anclaje y especificidad de unión al péptido. Los residuos que varían entre la familia de las proteínas Rap participan en la especificidad (Gallego y Marina, 2013).

#### **5.4.4 Ajuste y estimación de parámetros**

Los parámetros de número de células, volumen intracelular y volumen extracelular se calcularon experimentalmente (**Tabla 1**). Por otro lado, parámetros restantes se estimaron mediante el modelo por lo que se expresa el valor de mejor ajuste con los límites de confianza inferior y superior (**Tabla 2**). El volumen extracelular corresponde al volumen final utilizado para la estimulación (500  $\mu$ L). Los diversos parámetros se explicaron en las secciones previas, a excepción de  $FRET_0$  y  $\Delta FRET$  que corresponden a la eficiencia FRET de las células sin estímulo y la diferencia con las células con saturación, respectivamente. Estos valores servirán para predecir la respuesta FRET en base al modelo. Se puede afirmar que el ajuste fue exitoso puesto que la diferencia entre los límites no sobrepasa el orden de magnitud (**Tabla 2**).

#### **5.4.5 Cuantificación de PhrA en sobrenadantes**

Se utilizó el promedio de los datos mostrados en la Sección 5.3 para calcular la concentración extracelular de PhrA en los sobrenadantes con la ayuda del modelo. Se diseñó un *script* específicamente para este fin (**Anexo 11**). La concentración extracelular de PhrA calculada fue inferior a  $\sim 3.3$  nM a lo largo de todo el experimento. Estos valores corresponden al límite inferior de detección puesto que otros oligopéptidos sintetizados al mismo tiempo compiten por la internalización de PhrA. La competición resulta en una

reducida acumulación de PhrA en el interior celular que corresponde a una respuesta FRET más cercana a las células sin estimulación (**Figura 21**).

La concentración extracelular de PhrA correspondiente al mutante PhrA-deficiente se mantuvo en el nivel de 0 nM, lo que concuerda con su incapacidad de producir este péptido. En el caso de *B. subtilis* W168, la cantidad de PhrA producido pasó a niveles indetectables después de la tercera hora (**Anexo 8**). El mismo péptido se produjo continuamente a lo largo del experimento en el caso de *B. amyloliquefaciens* a niveles detectables (véase Sección 5.3 y 5.4.1) (**Figura 21**). Este corresponde al primer intento de monitorear y cuantificar la síntesis de PhrA en el proceso de esporulación. Por ello, se necesitan la aplicación de otras técnicas como espectrometría de masas para complementar estos resultados.

## 5.5 Construcción de cepas

Los plásmidos y las cepas utilizadas en este estudio se encuentran descritos con detalle en la **Tabla 6** y **Tabla 7**. El plásmido pAX01 se utilizó para sobreexpresar los genes *kinA*, *kinB* y *pepF* en el biosensor. Los plásmidos con dichos genes se integraron exitosamente en el gen *lacA* puesto que se obtuvo amplicones con el peso molecular esperado de ~ 6,800 pb. Por otro lado, los cebadores amplificaron un fragmento predicho de ~ 2,500 pb que corresponde a la cepa silvestre (**Figura 22A**). Esta diferencia de tamaño es el resultado de la integración por recombinación homóloga del fragmento contenido entre la región corriente arriba y corriente abajo del gen *lacA* presentes en el plásmido. Este fragmento presenta el marcador de resistencia para eritromicina, el gen deseado, el regulador del operón xilosa y una parte del esqueleto del plásmido (**Figura 12**) (Härtl et al., 2001).

El plásmido con el sistema FRET contuvo la mutación deseada (c.160G>A) que se verificó mediante secuenciación (**Anexo 12**). Este plásmido se utilizó para transformar la cepa derivada de *B. subtilis* W168 deficiente de RapA, PhrA y Spo0F ( $\Delta rapA phrA \Delta spo0F$ ). El plásmido se integró correctamente en el gen *amyE* lo que concuerda con el tamaño del fragmento amplificado de ~ 8,900 pb. Se obtuvo el mismo fragmento con el ADN del biosensor como templado. Este resultado concuerda puesto que ambas cepas contuvieron el mismo sistema FRET. En el caso de la cepa silvestre se obtuvo el amplicón esperado de ~ 3,200 pb (**Figura 22B**). El plásmido pDR111 y sus derivados presentan una región corriente arriba y corriente abajo del gen *amyE* que contienen entre sí el marcador de resistencia, el gen deseado y el regulador del operón lactosa. Por ello, la integración por recombinación

homóloga del plásmido produce un fragmento de peso molecular mayor a 6,000 pb correspondiente al gen *amyE* (Ben et al., 2003).

Se realizaron deleciones limpias para los genes *oppA*, *kinA* y *kinB* con el plásmido pMAD correspondiente. En los tres casos, las cepas mutantes amplificaron un fragmento de tamaño reducido que corresponde al locus deseado menos el tamaño del gen eliminado. Por otro lado, la cepa silvestre presentó un amplicón de tamaño normal de acuerdo con los cebadores utilizados. De igual manera, las mismas cepas no presentaron amplificación con cebadores específicos para el gen eliminado (**Figura 23A, 23B, 23C**). De acuerdo con la confirmación molecular, las cepas no presentaron resistencia a los antibióticos MLS, ni la capacidad de metabolizar X-Gal. En adición, no presentaron amplificación para el gen *bla* (**Figura 24**). Por ello, se afirmó que la delección de los genes y la excisión del plásmido fue exitosa (Arnaud et al., 2004).

Se utilizaron cebadores específicos para el gen *bla*, que provee la resistencia a  $\beta$ -lactámicos, con la finalidad de descartar recombinación de sitio específico o inserción del plásmido en otra parte del genoma. Ninguna de las cepas presentó amplificación de este gen, excepto el control positivo que correspondió al plásmido pAX01 y presentó un fragmento de ~ 860 pb (**Figura 24**). En consecuencia, se descartó la recombinación de sitio específico de los plásmidos. La correcta integración del plásmido evidenciada fue el resultado de una linearización adecuada de este previo a la transformación. Precisamente, la linearización de plásmidos aumenta la probabilidad de obtener una integración adecuada del fragmento. Como resultado, el fragmento estará presente en una sola copia en el genoma lo que contribuirá a la utilización de la cepa resultante con fines cuantitativos (Lehner, Wang y Hunziker, 2013).

## 5.6 Interacción RapA-Spo0F independiente de fosforilación

Se ha visto que la sobreexpresión de las histidinas quinasas que participan en la fosfotransferencia aumentan la eficiencia de fosforilación (De Jong et al., 2010). Por ello, se quiso determinar si existe algún efecto de esta sobreexpresión a nivel de interacción RapA-Spo0F con el biosensor. Las quinasas KinA y KinB son los principales sensores que participan en la iniciación de esporulación como respuesta a la disminución de nutrientes (LeDeaux, Yu y Grossman, 1995). En consecuencia, se diseñó una cepa que sobreexpresa *kinA* y una que sobreexpresa *kinB*. Ambas cepas presentaron el mismo nivel de respuesta FRET tanto para las células sin estímulo, como para las células estimuladas con 10  $\mu$ M de

PhrA (**Figura 25**). Estos resultados sugirieron que la interacción RapA-Spo0F y PhrA-RapA-Spo0F son independientes del estado de fosforilación de Spo0F.

Con la finalidad de comprobar dicha premisa se diseñaron mutantes deficientes de las histidinas quinasa KinA y KinB. Como se esperaba, no se observó ninguna diferencia en la respuesta FRET de las células con estímulo y sin estímulo de los mutantes en comparación con la cepa silvestre (**Figura 26**). Los mutantes *kinA* presentan una reducción del 80 % en la eficiencia de esporulación (Perego, Cole, Burbulys, Trach y Hoch, 1989). No es así el caso de los mutantes *kinB* que no exhiben reducción, o muy leve, en la eficiencia de esporulación. Esto a razón que esta quinasa forma parte de una ruta accesoria de fosforilación en caso de deficiencia de KinA (Dartois, Djavakhishvili y Hoch, 1996; LeDeaux et al., 1995; Trach y Hoch, 1993).

Se diseñó un doble mutante *kinA-kinB* a partir del mutante deficiente de KinA. En otros estudios, el mismo doble mutante presentó una eficiencia de fosforilación cercana al nivel de las cepas deficientes de Phr y Spo0F (Trach y Hoch, 1993). Sin embargo, al igual que con las anteriores cepas no se distinguió ninguna diferencia significativa en la respuesta FRET en comparación con la cepa silvestre (**Figura 26**). Estos resultados concuerdan con experimentos *in vitro* donde la actividad de las quinasa KinA-D no influyó la función de RapA y PhrA (Perego, 1997). Esto confirma que la interacción RapA-Spo0F y PhrA-RapA-Spo0F es independiente del estado de fosforilación de Spo0F.

Existe otra quinasa accesoria, KinC que actúa en caso de deficiencia de KinA y KinB para mantener un bajo nivel de esporulación que permita sobrevivir un fragmento de la población (LeDeaux et al., 1995). Con la finalidad de descartar la influencia de cualquier quinasa en la interacción RapA-Spo0F y PhrA-RapA-Spo0F se construyó un mutante resistente a la fosforilación, Spo0F D54N. Esta mutación en el sitio activo de Spo0F impide que esta proteína sea fosforilada por cualquier quinasa, por lo tanto, pierde su función (Sanders, Gillece, Stock, Burlingame y Koshland, 1989; Volz, 1993; Zapf, Hoch y Whiteley, 1996). Este mutante exhibió la misma respuesta FRET con y sin estimulación en comparación a la cepa silvestre (**Figura 27**). Esto confirma que la interacción RapA-Spo0F y PhrA-RapA-Spo0F es independiente del estado de fosforilación de Spo0F.

## 6 CONCLUSIONES

El biosensor tipo FRET utilizado presenta alta sensibilidad a concentraciones nanomolares de PhrA y alta especificidad de respuesta únicamente a este péptido. En adición este biosensor puede ser utilizado para la detección y cuantificación de PhrA.

PhrA es esencial para iniciar el proceso de esporulación, por ello su síntesis tiene lugar al momento que la concentración de nutrientes disminuye dramáticamente. A sí mismo, este péptido está conservado a lo largo del género *Bacillus* posiblemente cumpliendo la misma función que en *B. subtilis*. Se recomienda mayor investigación al respecto.

La velocidad de internalización de PhrA depende de la actividad del complejo oligopéptido permeasa y está influida por la concentración extracelular de péptidos competidores. Por otro lado, no existe competición con otros péptidos a nivel del receptor en RapA, pues este es altamente específico para PhrA.

El estado de fosforilación de Spo0F, y la actividad o ausencia de las histidinas quinasas, no influyen en la interacción estable que mantiene RapA-Spo0F y PhrA-RapA-Spo0F. Este hecho revela características de interés que se pueden investigar posteriormente en RapA y proteínas similares a esta.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aizawa, S.-I. (2014). *Bacillus subtilis* — The Representative of Gram-Positive Bacteria. In *The Flagellar World* (pp. 22–23). Oxford: Elsevier.
- Ali, J., Najeeb, J., Asim, M., Farhan, M. y Raza, A. (2017). Biosensors: Their Fundamentals, Designs, Types and Most Recent Impactful Applications: A Review. *Journal of Biosensors & Bioelectronics*, 8(1), 1–9. doi:10.4172/2155-6210.1000235
- Angel, T., Aryal, U., Hengel, S., Baker, E., Kelly, R., Robinson, E. y Smith, R. (2012). Mass spectrometry-based proteomics: existing capabilities and future directions. *Chemical Society Reviews*, 41(10), 3912–3928. doi:10.1039/c2cs15331a
- Arnaud, M., Chastanet, A. y Débarbouillé, M. (2004). New Vector for Efficient Allelic Replacement in Naturally Gram-Positive Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6887–6891. doi:10.1128/AEM.70.11.6887
- Ashwini, N. y Srividya, S. (2014). Potentiality of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent for management of anthracnose disease of chilli caused by *Colletotrichum gloeosporioides* OGC1. *3 Biotech*, 4(2), 127–136. doi:10.1007/s13205-013-0134-4
- Babel, H. y Bischofs, I. (2016). Molecular and cellular factors control signal transduction via switchable allosteric modulator proteins (SAMPs). *BMC Systems Biology*, 10(1), 35–52. doi:10.1186/s12918-016-0274-3
- Ben, S., Rudner, D. y Losick, R. (2003). RacA, a Bacterial Protein That Anchors Chromosomes to the Cell Poles. *Science*, 299(1), 532–536. doi:10.1126/science.1079914
- Bendori, S., Pollak, S., Hizi, D. y Eldar, A. (2015). The RapP-PhrP quorum-sensing system of *Bacillus subtilis* strain NCIB3610 affects biofilm formation through multiple targets, due to an atypical signal-insensitive allele of RapP. *Journal of Bacteriology*, 197(3), 592–602. doi:10.1128/JB.02382-14
- Bergkessel, M. y Guthrie, C. (2013). Colony PCR. En B. Imperiali (Ed.), *Methods in Enzymology* (pp. 299–309). New York: Elsevier.
- Bischofs, I., Hug, J., Liu, A., Wolf, D. y Arkin, A. (2009). Complexity in bacterial cell-cell communication: quorum signal integration and subpopulation signaling in the *Bacillus subtilis* phosphorelay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

*States of America*, 106(16), 6459–6464. doi:10.1073/pnas.0810878106

- Boguslawski, K., Hill, P. y Griffith, K. (2015). Novel mechanisms of controlling the activities of the transcription factors Spo0A and ComA by the plasmid-encoded quorum sensing regulators Rap60-Phr60 in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 96(2), 325–348. doi:10.1111/mmi.12939
- Bongiorni, C., Stoessel, R., Shoemaker, D. y Perego, M. (2006). Rap Phosphatase of Virulence Plasmid pXO1 Inhibits *Bacillus anthracis* Sporulation. *Journal of Bacteriology*, 188(2), 487–498. doi:10.1128/JB.188.2.487
- Burbulys, D., Trach, K. y Hoch, J. (1991). Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell*, 64(3), 545–552. doi:10.1016/0092-8674(91)90238-T
- Burkholder, P. y Giles, N. (1947). Induced Biochemical Mutations in *Bacillus subtilis*. *American Journal of Botany*, 34(6), 345–348. Recuperado de <http://www.jstor.org/stable/2437147>
- Capra, E. y Laub, M. (2012). Evolution of Two-Component Signal Transduction Systems. *Annual Review of Microbiology*, 66(1), 325–347. doi:10.1146/annurev-micro-092611-150039
- Chan, F., Siegel, R., Zacharias, D., Swofford, R., Holmes, K., Tsien, R. y Lenardo, M. (2001). Fluorescence resonance energy transfer analysis of cell surface receptor interactions and signaling using spectral variants of the green fluorescent protein. *Cytometry*, 44(4), 361–368. doi:10.1002/1097-0320(20010801)44:4<361::AID-CYTO1128>3.0.CO;2-3
- Comella, N. y Grossman, A. D. (2005). Conservation of genes and processes controlled by the quorum response in bacteria: Characterization of genes controlled by the quorum-sensing transcription factor ComA in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 57(4), 1159–1174. doi:10.1111/j.1365-2958.2005.04749.x
- Core, L., Ishikawa, S. y Perego, M. (2001). A free terminal carboxylate group is required for PhrA pentapeptide inhibition of RapA phosphatase. *Peptides*, 22(10), 1549–1553. doi:10.1016/S0196-9781(01)00491-0
- Cutting, S. y Azevedo, V. (1995). Genetic Mapping in *Bacillus subtilis*. En K. Adolph (Ed.),

- Method in Molecular Genetics* (pp. 323–338). San Diego: Academic Press.
- Cutting, S. y Vander, P. (1990). Genetic Analysis. En C. Harwood y S. Cutting (Eds.), *Molecular Biological Methods for Bacillus* (pp. 27–61). Chichester: John Wiley & Sons.
- Dartois, V., Djavakhishvili, T. y Hoch, J. (1996). Identification of a membrane protein involved in activation of the KinB pathway to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *178*(4), 1178–1186. Recuperado de <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=177782&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- De Jong, I. G., Veening, J. W. y Kuipers, O. P. (2010). Heterochronic phosphorelay gene expression as a source of heterogeneity in *Bacillus subtilis* spore formation. *Journal of Bacteriology*, *192*(8), 2053–2067. doi:10.1128/JB.01484-09
- Diaz, A., Core, L., Jiang, M., Morelli, M., Chiang, C., Szurmant, H. y Perego, M. (2012). *Bacillus subtilis* RapA Phosphatase Domain Interaction with Its Substrate, Phosphorylated Spo0F, and Its Inhibitor, the PhrA Peptide. *Journal of Bacteriology*, *194*(6), 1378–1388. doi:10.1128/JB.06747-11
- Díaz, A., García, J. y Zapata, J. (2015). Improvement of Sporulation Conditions of a New Strain of *Bacillus amyloliquefaciens* in Liquid Fermentation. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, *6*(4), 302–310. doi:10.4236/abb.2015.64029
- Domínguez, J., Wolf, D., Fritz, G., Höfler, C., Wedlich, R. y Mascher, T. (2014). Subcellular localization, interactions and dynamics of the phage-shock protein-like Lia response in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, *92*(4), 716–732. doi:10.1111/mmi.12586
- Elsholz, A., Wacker, S. y Losick, R. (2014). Self-regulation of exopolysaccharide production in *Bacillus subtilis* by a tyrosine kinase. *Genes & Development*, *28*(15), 1710–1720. doi:10.1101/gad.246397.114.
- Even, E., Omer, S., Pollak, S. y Eldar, A. (2016). Transient Duplication-Dependent Divergence and Horizontal Transfer Underlie the Evolutionary Dynamics of Bacterial Cell-Cell Signaling. *PLoS Biology*, *14*(12), 1–23. doi:10.1371/journal.pbio.2000330
- Fabret, C., Feher, V. y Hoch, J. (1994). Two-Component signal transduction in *Bacillus subtilis* : How one organism sees its world. *Journal of Bacteriology*, *217*(2), 220–230.

Recuperado

de

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC93607/pdf/jb001975.pdf>

- Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R. y Youngman, P. (2000). The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(14), 8063–8068. doi:10.1073/pnas.140209597
- Feeney, M., Murphy, K. y Lopilato, J. (2014). Designing PCR primers painlessly. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 15(1), 28–29. doi:10.1128/jmbe.v15i1.634
- Gallego, F. y Marina, A. (2013). Structural Basis of Rap Phosphatase Inhibition by Phr Peptides. *PLoS Biology*, 11(3), 14–16. doi:10.1371/journal.pbio.1001511
- Gao, R., Mack, T. y Stock, A. (2007). Bacterial response regulators: versatile regulatory strategies from common domains. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(5), 225–234. doi:10.1016/j.tibs.2007.03.002
- González, J., Hobbs, E. y Losick, R. (2003). Cannibalism by sporulating bacteria. *Science*, 301(7), 510–513. doi:10.1126/science.1086462
- Griffith, K. L. y Grossman, A. D. (2008). A Degenerate Tripartite DNA-Binding Site Required for Activation of ComA-Dependent Quorum Response Gene Expression in *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 381(2), 261–275. doi:10.1016/j.jmb.2008.06.035
- Griffiths, M. y Schraft, H. (2017). *Bacillus cereus* Food Poisoning. En C. Dood, T. Aldsworth, R. Stein, D. Cliver y H. Riemann (Eds.), *Foodborne Diseases* (3rd Ed., pp. 395–405). Londres: Elsevier.
- Härtl, B., Wehrl, W., Wiegert, T., Homuth, G. y Schumann, W. (2001). Development of a New Integration Site within the *Bacillus subtilis* Chromosome and Construction of Compatible Expression Cassettes. *Journal of Bacteriology*, 183(8), 2696–2699. doi:10.1128/JB.183.8.2696
- Harwood, C. (2007). *Bacillus subtilis* as a model for Bacterial Systems Biology. En *Encyclopedia of Life Sciences* (pp. 1978–1988). New York: John Wiley & Sons. doi:10.1002/9780470015902.a0002027
- He, P., Hao, K., Blom, J., Rückert, C., Vater, J., Mao, Z., ... Borriss, R. (2012). Genome sequence of the plant growth promoting strain *Bacillus amyloliquefaciens* subsp.

- plantarum* B9601-Y2 and expression of mersacidin and other secondary metabolites. *Journal of Biotechnology*, 164(2), 281–291. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.12.014
- Hoch, J. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current Opinion in Microbiology*, 3(2), 165–170. doi:10.1016/S1369-5274(00)00070-9
- Ibrahim, M. A., Griko, N., Junker, M. y Bulla, L. A. (2010). *Bacillus thuringiensis*: A genomics and proteomics perspective. *Bioengineered Bugs*, 1(1), 31–50. doi:10.4161/bbug.1.1.10519
- Ihekwaba, A., Mura, I. y Barker, G. (2014). Computational modelling and analysis of the molecular network regulating sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *BMC Systems Biology*, 8(1), 119. doi:10.1186/s12918-014-0119-x
- Ishikawa, S., Core, L. y Perego, M. (2002). Biochemical characterization of aspartyl phosphate phosphatase interaction with a phosphorylated response regulator and its inhibition by a pentapeptide. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23), 20483–20489. doi:10.1074/jbc.M201086200
- Jabbari, S., Heap, J. y King, J. (2011). Mathematical modelling of the sporulation-initiation network in *Bacillus subtilis* revealing the dual role of the putative quorum-sensing signal molecule PhrA. *Bulletin of Mathematical Biology*, 73(1), 181–211. doi:10.1007/s11538-010-9530-7
- Jares, E. y Jovin, T. (2003). FRET imaging. *Nature Biotechnology*, 21(11), 1387–1395. doi:10.1038/nbt896
- Kanamaru, K., Stephenson, S. y Perego, M. (2002). Overexpression of the PepF oligopeptidase inhibits sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 184(1), 43–50. doi:10.1128/JB.184.1.43-50.2002
- Karpova, T., Baumann, C., He, L., Wu, X., Grammer, A., Lipsky, P., ... McNally, J. (2003). Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *Journal of Microscopy*, 209(1), 56–70. doi:10.1046/j.1365-2818.2003.01100.x
- Kiehler, B., Haggett, L. y Fujita, M. (2017). The PAS domains of the major sporulation kinase in *Bacillus subtilis* play a role in tetramer formation that is essential for the autokinase activity. *MicrobiologyOpen*, 6(4), 1–12. doi:10.1002/mbo3.481

- Kremers, G., Gilbert, S., Cranfill, P., Davidson, M. y Piston, D. (2011). Fluorescent proteins at a glance. *Journal of Cell Science*, *124*(15), 157–160. doi:10.1242/jcs.095059
- Kumar, A. y Singh, T. (2013). A quantitative study of gene regulatory pathways in *Bacillus subtilis* for virulence and competence phenotype by quorum sensing. *Systems and Synthetic Biology*, *7*(1), 33–39. doi:10.1007/s11693-013-9105-7
- Lazazzera, B. A., Solomon, J. M. y Grossman, A. D. (1997). An exported peptide functions intracellularly to contribute to cell density signaling in *B. subtilis*. *Cell*, *89*(6), 917–925. doi:10.1016/S0092-8674(00)80277-9
- LeDeaux, J., Solomon, J. y Grossman, A. (1997). Analysis of non-polar deletion mutations in the genes of the *spo0K* (*opp*) operon of *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiology Letters*, *153*(1), 63–69. doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb10464.x
- LeDeaux, J., Yu, N. y Grossman, A. (1995). Different roles for KinA, KinB, and KinC in the initiation of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, *177*(3), 861–863.
- Lehner, R., Wang, X. y Hunziker, P. (2013). Plasmid linearization changes shape and efficiency of transfection complexes. *European Journal of Nanomedicine*, *5*(4), 205–212. doi:10.1515/ejnm-2013-0028
- Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D. y Stahl, D. (2015). *Brock Biology of Microorganisms* (14th Ed.). New York: Pearson Education.
- Merkx, M., Golynskiy, M., Lindenburg, L. y Vinkenborg, J. (2013). Rational design of FRET sensor proteins based on mutually exclusive domain interactions. *Biochemical Society Transactions*, *41*(5), 1201–1205. doi:10.1042/BST20130128
- Michna, R., Zhu, B., Mäder, U. y Stülke, J. (2016). Subti Wiki 2.0—an integrated database for the model organism *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acids Research*, *44*(1), 654–662. doi:10.1093/nar/gkv1006
- Miller, M. y Bassler, B. (2001). Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology*, *55*, 165–199. doi:10.1146/annurev.micro.55.1.165
- Mirouze, N., Parashar, V., Baker, M., Dubnau, D. y Neiditch, M. (2011). An atypical Phr peptide regulates the developmental switch protein RapH. *Journal of Bacteriology*, *193*(22), 6197–6206. doi:10.1128/JB.05860-11

- Mitrophanov, A. y Groisman, E. (2008). Signal integration in bacterial two-component regulatory systems. *Genes & Development*, 22(19), 2601–2611. doi:10.1101/gad.1700308.response
- Molle, V., Fujita, M., Jensen, S., Eichenberger, P., González, J., Liu, J. y Losick, R. (2003). The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 50(5), 1683–1701. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03818.x
- Monnet, V. (2003). Cellular and Molecular Life Sciences Bacterial oligopeptide-binding proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 60(3), 2100–2114. doi:10.1007/s00018-003-3054-3
- Mutlu, A., Trauth, S., Ziesack, M., Nagler, K., Bergeest, J., Rohr, K., ... Bischofs, I. (2018). Phenotypic memory in *Bacillus subtilis* links dormancy entry and exit by a spore quantity-quality tradeoff. *Nature Communications*, 9(69), 1–12. doi:10.1038/s41467-017-02477-1
- Narula, J., Fujita, M. y Igoshin, O. A. (2016). Functional requirements of cellular differentiation: lessons from *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 34, 38–46. doi:10.1016/j.mib.2016.07.011
- Ng, W. y Bassler, B. (2009). Bacterial quorum-sensing network architectures. *Annual Review of Genetics*, 43(1), 197–222. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134304
- Nicholson, W. y Setlow, P. (1990). Sporulation, Germination and Outgrowth. In C. Harwood y S. Cutting (Eds.), *Molecular Biological Methods for Bacillus* (pp. 391–450). Chichester: John Wiley & Sons.
- Ogura, M., Shimane, K., Asai, K., Ogasawara, N. y Tanaka, T. (2003). Binding of response regulator DegU to the aprE promoter is inhibited by RapG, which is counteracted by extracellular PhrG in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 49(6), 1685–1697. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03665.x
- Papenfort, K. y Bassler, B. (2016). Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 14(9), 576–588. doi:10.1038/nrmicro.2016.89
- Parashar, V., Mirouze, N., Dubnau, D. y Neiditch, M. (2011). Structural basis of response regulator dephosphorylation by Rap phosphatases. *PLoS Biology*, 9(2).

doi:10.1371/journal.pbio.1000589

- Parker, G. F., Daniel, R. A. y Errington, J. (1996). Timing and genetic regulation of commitment to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiology*, 142(12), 3445–3452. doi:10.1099/13500872-142-12-3445
- Partridge, S. y Errington, J. (1993). The importance of morphological events and intercellular interactions in the regulation of prespore-specific gene expression during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 8(5), 945–955. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01639.x
- Perego, M. (1997). A peptide export-import control circuit modulating bacterial development regulates protein phosphatases of the phosphorelay. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(16), 8612–8617. doi:10.1073/pnas.94.16.8612
- Perego, M., Cole, S., Burbulys, D., Trach, K. y Hoch, J. (1989). Characterization of the Gene for a Protein Kinase Which Phosphorylates the Sporulation Regulatory Proteins Spo0a and Spo0f of *Bacillus subtilis*. *Journal Of Bacteriology*, 171(11), 6187–6196.
- Perego, M., Higgins, C., Pearce, S., Gallagher, M. y Hoch, J. (1991). The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation. *Molecular Microbiology*, 5(1), 173–185. doi:10.1111/j.1365-2958.1991.tb01838.x
- Perego, M. y Hoch, J. (1996). Cell-cell communication regulates the effects of protein aspartate phosphatases on the phosphorelay controlling development in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(4), 1549–1553. doi:10.1073/pnas.93.4.1549
- Perraud, A., Weiss, V. y Gross, R. (1999). Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends in Microbiology*, 7(3), 115–120. doi:10.1016/S0966-842X(99)01458-4
- Piggot, P. (2009). *Bacillus subtilis*. En *Encyclopedia of Microbiology* (3rd Ed., pp. 45–56). Elsevier. doi:10.1016/B978-012373944-5.00036-5
- Piggot, P. y Hilbert, D. (2004). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current Opinion in Microbiology*, 7(6), 579–586. doi:10.1016/j.mib.2004.10.001
- Piston, D. y Kremers, G. (2007). Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(9), 407–414. doi:10.1016/j.tibs.2007.08.003

- Pottathil, M. y Lazazzera, B. (2003). The extracellular Phr Peptide-Rap Phosphatase signaling circuit of *Bacillus subtilis*. *Frontiers in Bioscience*, 8(1), 32–45.
- Qiao, J., Yu, X., Liang, X., Liu, Y., Borriss, R. y Liu, Y. (2017). Addition of plant-growth-promoting *Bacillus subtilis* PTS-394 on tomato rhizosphere has no durable impact on composition of root microbiome. *BMC Microbiology*, 17(1), 1–12. doi:10.1186/s12866-017-1039-x
- Rowland, C., Brown, C., Medintz, I. y Delehanty, J. (2015). Intracellular FRET-based probes: a review. *Methods and Applications in Fluorescence*, 3(5), 1–27. doi:10.1088/2050-6120/3/4/042006
- Rudner, D., LeDeaux, J., Ireton, K. y Grossman, A. (1991). The spo0K locus of *Bacillus subtilis* is homologous to the oligopeptide permease locus and is required for sporulation and competence. *Journal of Bacteriology*, 173(4), 1388–1398. doi:10.1128/jb.173.4.1388-1398.1991
- Russell, J., Cabeen, M., Wiggins, P., Paulsson, J. y Losick, R. (2017). Noise in a phosphorelay drives stochastic entry into sporulation in *Bacillus subtilis*. *The EMBO Journal*, 36(20), 2925–3095. doi:10.15252/emj.201796988
- Sanders, D., Gillece, B., Stock, A., Burlingame, A. y Koshland, D. (1989). Identification of the site of phosphorylation of the chemotaxis response regulator protein, CheY. *Journal of Biological Chemistry*, 264(36), 21770–21778. Recuperado de <http://www.jbc.org/content/264/36/21770.full.pdf>
- Schultz, D. (2016). Coordination of cell decisions and promotion of phenotypic diversity in *B. subtilis* via pulsed behavior of the phosphorelay. *BioEssays*, 38(5), 440–445. doi:10.1002/bies.201500199
- Sekar, R. y Periasamy, A. (2003). Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations. *Journal of Cell Biology*, 160(5), 629–633. doi:10.1083/jcb.200210140
- Skerker, J., Perchuk, B., Siryaporn, A., Lubin, E., Ashenberg, O., Goulian, M. y Laub, M. (2008). Rewiring the Specificity of Two-Component Signal Transduction Systems. *Cell*, 133(6), 1043–1054. doi:10.1016/j.cell.2008.04.040
- Solomon, J., Lazazzera, B. y Grossman, A. (1996). Purification and characterization of an

- extracellular peptide factor that affects 2 different developmental pathways in *Bacillus subtilis*. *Genes & Development*, 10, 2014–2024. doi:10.1101/gad.10.16.2014
- Spencer, R. (2003). *Bacillus anthracis*. *Clinical Pathology*, 56(1), 182–187. doi:10.1128/JB.188.9.3402-3408.2006
- Stefanic, P., Decorosi, F., Viti, C., Petito, J., Cohan, F. y Mandic, I. (2012). The quorum sensing diversity within and between ecotypes of *Bacillus subtilis*. *Environmental Microbiology*, 14(6), 1378–1389. doi:10.1111/j.1462-2920.2012.02717.x
- Stock, A., Robinson, V. y Goudreau, P. (2000). Two-Component Signal Transduction. *Annual Review of Biochemistry*, 69, 183–215. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.183
- Sun, Y., Rombola, C., Jyothikumar, V. y Periasamy, A. (2013). Förster Resonance Energy Transfer Microscopy and Spectroscopy for Localizing Protein – Protein Interactions in Living Cells. *Cytometry*, 83(2), 780–793. doi:10.1002/cyto.22321
- Talboys, P. J., Owen, D. W., Healey, J. R., Withers, P. J. y Jones, D. L. (2014). Auxin secretion by *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 both stimulates root exudation and limits phosphorus uptake in *Triticum aestivum*. *BMC Plant Biology*, 14(1), 51–59. doi:10.1186/1471-2229-14-51
- Tame, J., Murshudov, G., Dodson, E., Neil, T., Dodson, G., Higgins, C. y Wilkinson, A. (1994). The structural basis of sequence-independent peptide binding by OppA protein. *Science*, 264(5165), 1578–1581. doi:10.1126/science.8202710
- Tortora, G., Funke, B. y Case, C. (2016). *Microbiology: An Introduction* (12th Ed.). Illinois: Pearson Education.
- Trach, K. y Hoch, J. (1993). Multisensory activation of the phosphorelay initiating sporulation in *Bacillus subtilis*: identification and sequence of the protein kinase of the alternate pathway. *Molecular Microbiology*, 8(1), 69–79. doi:10.1111/j.1365-2958.1993.tb01204.x
- Trauth, S. y Bischofs, I. (2014). Ectopic integration vectors for generating fluorescent promoter fusions in *Bacillus subtilis* with minimal dark noise. *PLoS ONE*, 9(5). doi:10.1371/journal.pone.0098360
- Van Munster, E., Kreemers, G., Adjobo, M. y Gadella, T. (2005). Fluorescence resonance energy transfer ( FRET ) measurement by gradual acceptor photobleaching. *Journal of*

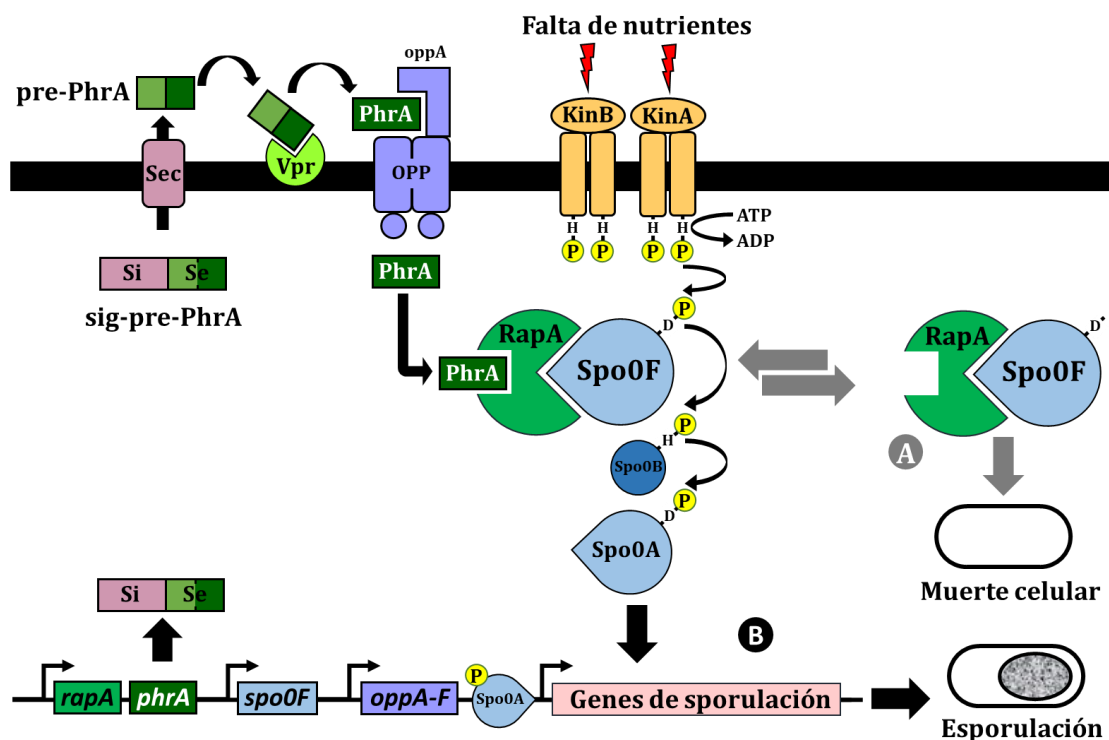
*Microscopy*, 218(3), 253–262. doi:10.1111/j.1365-2818.2005.01483.x

- Vasanth, N. y Freese, E. (1980). Enzyme changes during *Bacillus subtilis* sporulation caused by deprivation of guanine nucleotides. *Journal of Bacteriology*, 144(3), 1119–1125. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC294778/pdf/jbacter00573-0261.pdf>
- Veening, J., Stewart, E., Berngruber, T., Taddei, F., Kuipers, O. y Hamoen, L. (2008). Bet-hedging and epigenetic inheritance in bacterial cell development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(11), 4393–4398. doi:10.1073/pnas.0700463105
- Vlamakis, H., Chai, Y., Beaugard, P., Losick, R. y Kolter, R. (2013). Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nature Reviews Microbiology*, 11(3), 157–168. doi:10.1038/nrmicro2960
- Volz, K. (1993). Structural Conservation in the CheY Superfamily. *Biochemistry*, 32(44), 11741–11753. doi:10.1021/bi00095a001
- Waters, C. M. y Bassler, B. L. (2005). Quorum Sensing: cell-to-cell communication in bacteria. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 21(1), 319–346. doi:10.1146/annurev.cellbio.21.012704.131001
- Watson, J., Baker, T., Bell, S., Gann, A., Levine, M. y Losick, R. (2014). Translation. In *Molecular Biology of the Gene* (7th Ed., pp. 509–572). New York: Cold Spring Harbor.
- Willey, J., Sherwood, L. y Woolverton, C. (2014). *Prescott's Microbiology* (9th Ed.). New York: McGraw-Hill Higher Education.
- Wolf, D., Rippa, V., Mobarec, J., Sauer, P., Adlung, L., Kolb, P. y Bischofs, I. (2015). The quorum-sensing regulator ComA from *Bacillus subtilis* activates transcription using topologically distinct DNA motifs. *Nucleic Acids Research*, 44(5), 2160–2172. doi:10.1093/nar/gkv1242
- York, K., Kenney, T., Satola, S., Moran, C., Poth, H. y Youngman, P. (1992). Spo0A controls the  $\sigma(A)$ -dependent activation of *Bacillus subtilis* sporulation-specific transcription unit *spoIIIE*. *Journal of Bacteriology*, 174(8), 2648–2658. doi:10.1128/JB.174.8.2648-2658.1992
- Zapf, J., Hoch, J. y Whiteley, J. (1996). A phosphotransferase activity of the *Bacillus subtilis* sporulation protein Spo0F that employs phosphoramidate substrates. *Biochemistry*,

35(9), 2926–2933. doi:10.1021/bi9519361

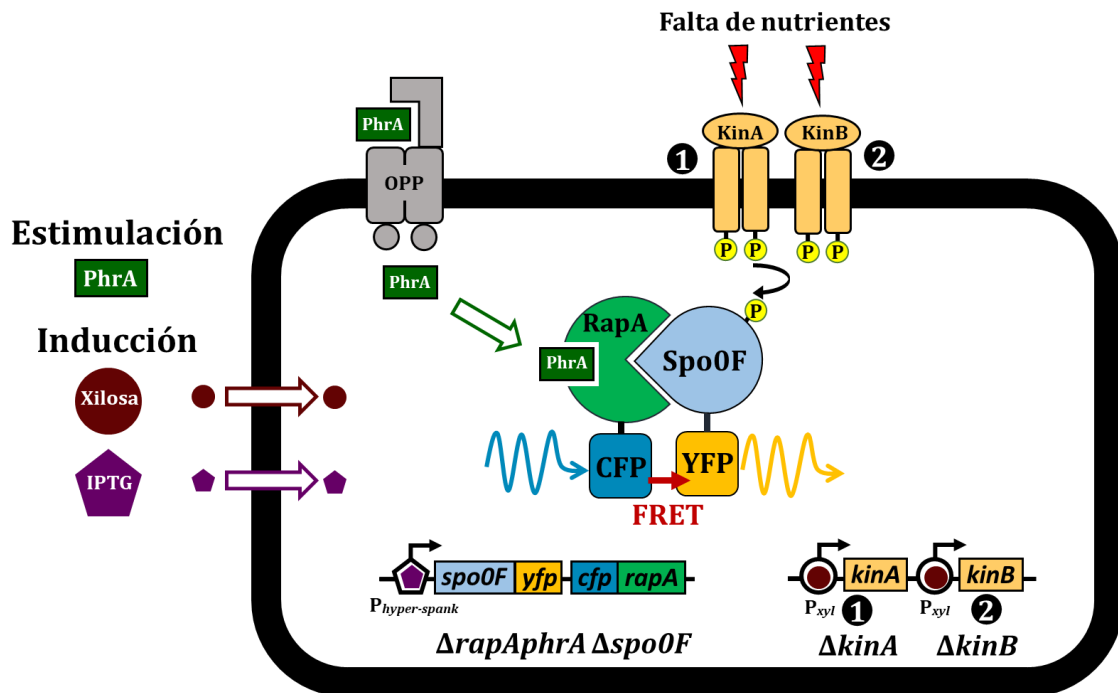
Zschiedrich, C., Keidel, V. y Szurmant, H. (2016). Molecular Mechanisms of Two-Component Signal Transduction. *Journal of Molecular Biology*, 428(19), 3752–3775. doi:10.1016/j.jmb.2016.08.003

## 8 FIGURAS



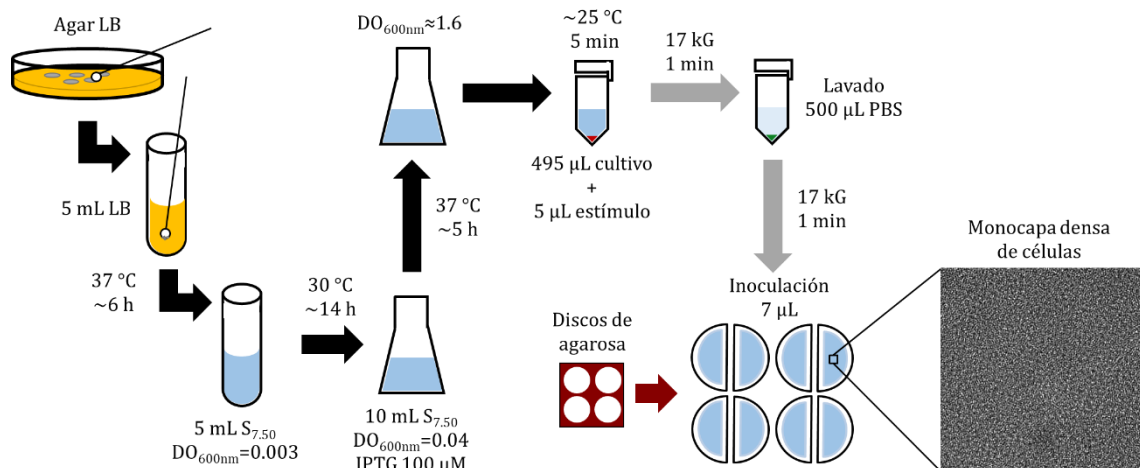
**Figura 1. Rutas de señalización que controlan la esporulación**

La fosfotransferencia KinA/B-Spo0F-Spo0B-Spo0A termina en la activación de los genes que inician el proceso de esporulación. El sistema de percepción de cuórum RapA-PhrA actúa como un mecanismo de regulación de la fosfotransferencia mediante la defosforilación de Spo0F. En células deficientes de PhrA la actividad fosfatasa de RapA está descontrolada por lo que la célula no puede esporular y muere (A). En células que sintetizan normalmente PhrA, el fosfato se transfiere desde las quinazas KinA/B hasta Spo0A para permitir que la célula esporule (B).



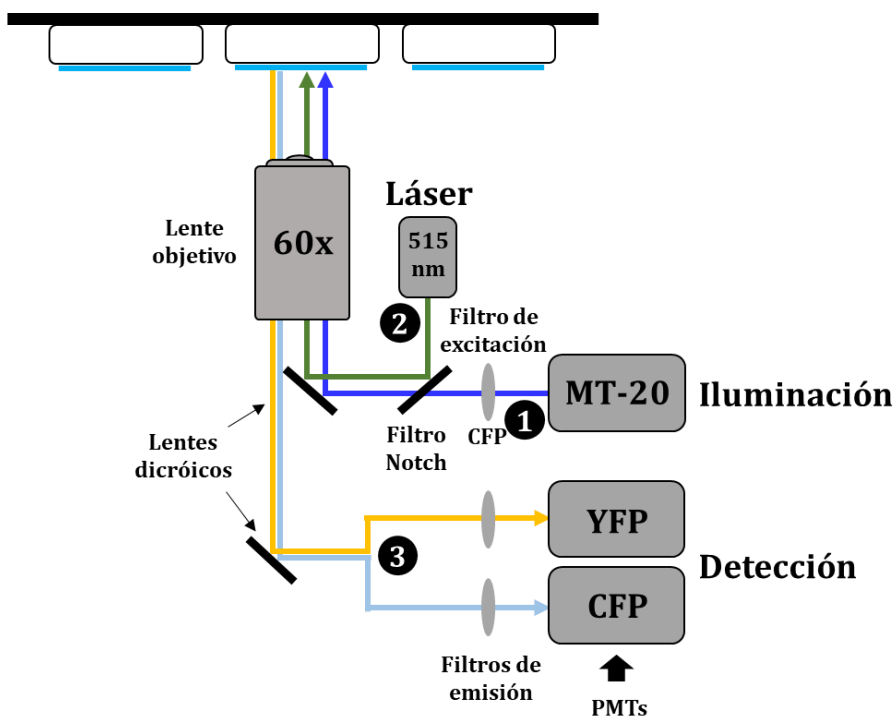
**Figura 2. Esquema del biosensor tipo FRET utilizado para estudiar la señalización de PhrA en *B. subtilis***

El biosensor original constó únicamente del sistema FRET inducible con IPTG (pentágono) en un fondo deficiente de RapA, PhrA y Spo0F. Se realizaron modificaciones posteriores en las quinazas KinA (1) y KinB (2), tanto en sobreexpresión con promotor inducible con xilosa (círculo), como en deficiencia de las quinazas. El sistema FRET consistió en las proteínas de fusión RapA-CFP y Spo0F-YFP. La transferencia de energía tuvo lugar desde CFP a YFP como resultado de la interacción entre RapA y Spo0F. La estimulación con péptido sintético PhrA resultó en la modificación de dicha interacción que por lo tanto alteró la respuesta FRET.



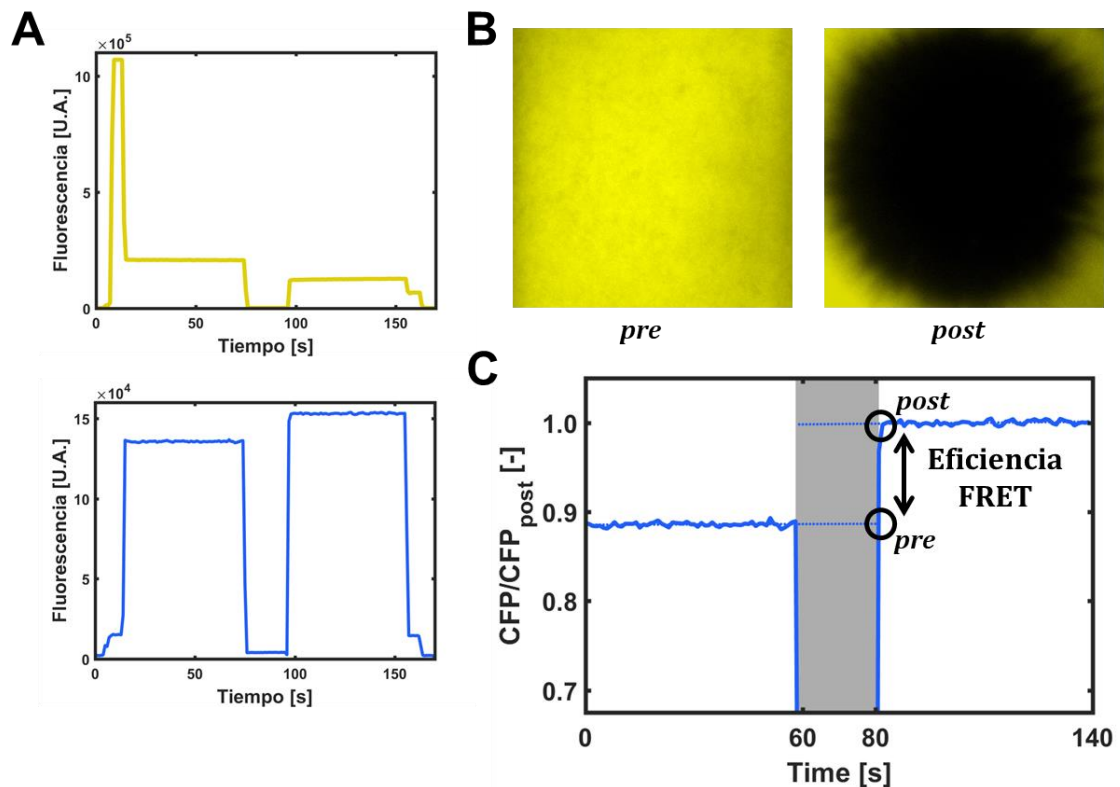
**Figura 3. Metodología de inducción, estimulación e inoculación para experimento FRET estándar**

El biosensor se inoculó sucesivamente en medio S<sub>7.50</sub> para la inducción del sistema FRET con IPTG. Las células se estimularon con péptido sintético PhrA y se inocularon en geles de agarosa para formar una monocapa densa de células. La transferencia de energía se midió a nivel de población. **Microfotografía** (AT= 600x).



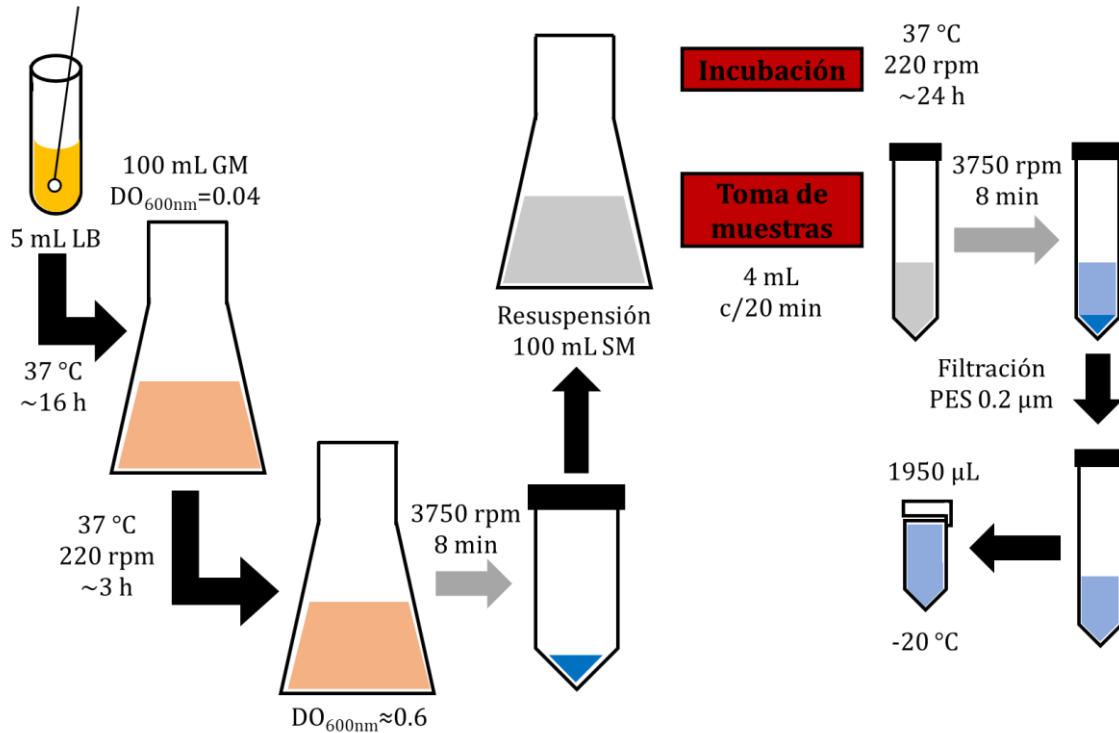
**Figura 4. Configuración del microscopio *Olympus IX81* para experimentos FRET-fotoblanqueo**

La iluminación para CFP se realizó con un sistema MT-20 (1). El aceptor se fotoblanqueó mediante un láser de 515 nm (2). Las señales de CFP y YFP se grabaron con tubos fotomultiplicadores (PMTs) (3). Todo el experimento se realizó con un lente objetivo de 60x.



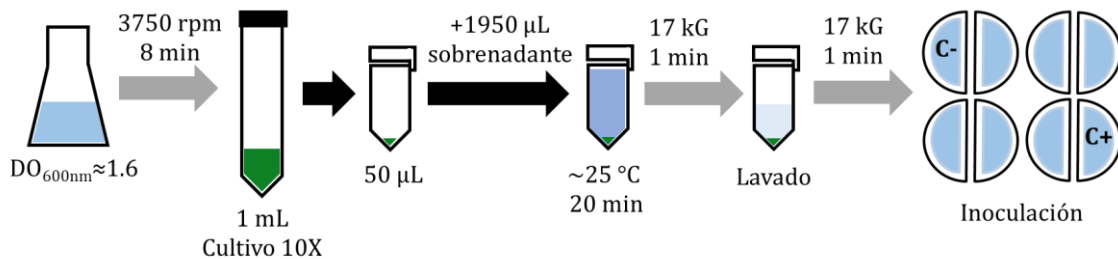
**Figura 5. Resultados de experimentos FRET-fotoblanqueo**

**A:** Fluorescencia absoluta de YFP y CFP grabada por los fotomultiplicadores. Al inicio y al final del experimento se iluminó para YFP. Se excitó CFP durante 60 segundos, se fotoblanqueó el aceptor por 20 segundos, y nuevamente se iluminó CFP durante 60 segundos. Posterior al fotoblanqueo, la señal de YFP y CFP disminuyó y aumentó, respectivamente. **B:** Microfotografías (AT=600x) tomadas para YFP al inicio y al final de cada experimento. Posterior al fotoblanqueo, se puede observar la zona oscura resultado de la destrucción del aceptor (YFP). **C:** La diferencia entre la señal de CFP después y antes del fotoblanqueo corresponde a la eficiencia FRET. La zona gris denota el tiempo de aplicación del laser (20 segundos).



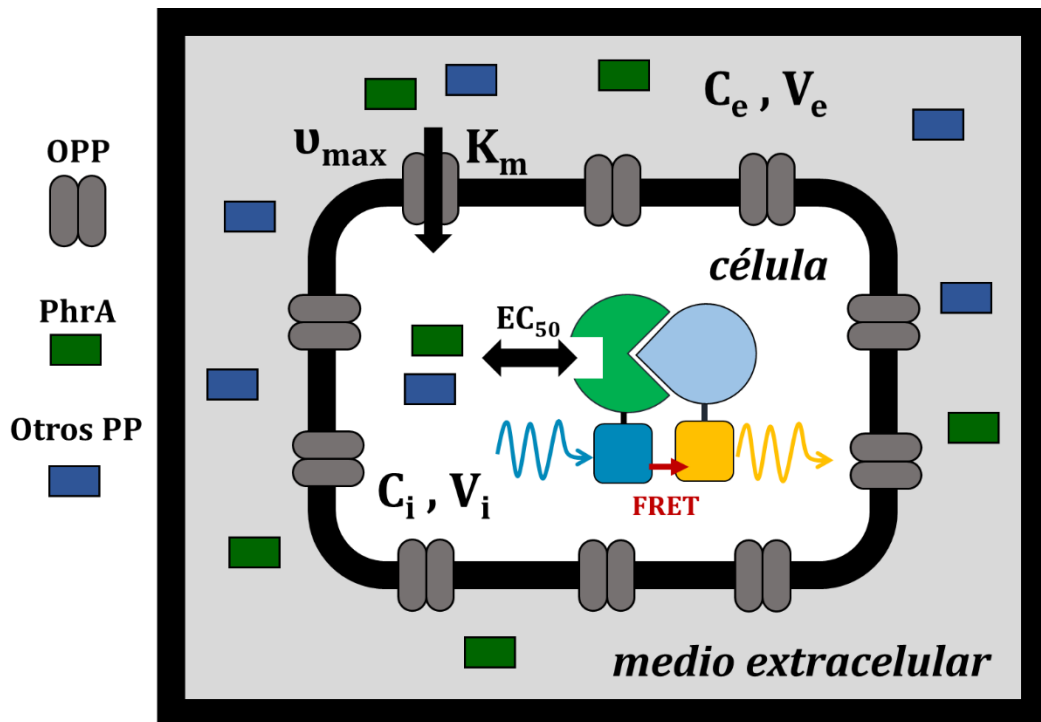
**Figura 6. Metodología de esporulación y extracción de sobrenadantes**

La esporulación se induce mediante escasez de nutrientes en esta metodología de resuspensión. **GM:** Medio de crecimiento, **SM:** medio de esporulación, **rpm:** revoluciones por minuto, **DO:** densidad óptica.



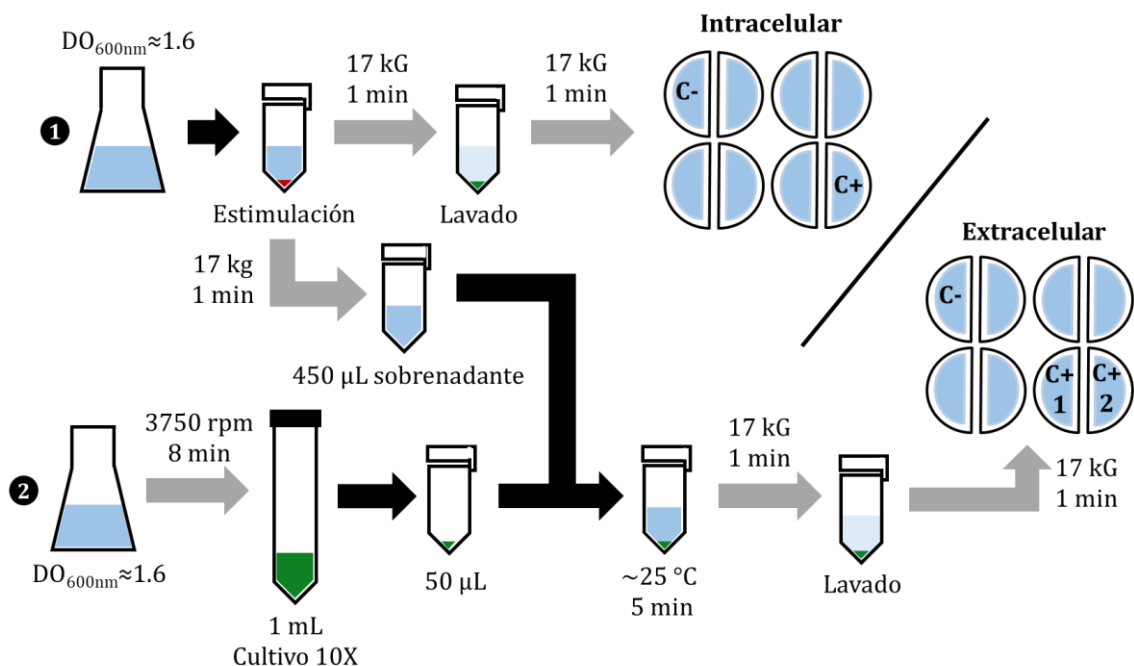
**Figura 7. Estimulación del biosensor con sobrenadantes de cultivos esporulantes**

Se concentró el cultivo 10 veces para estimular las células del biosensor con los sobrenadantes extraídos de cultivos esporulantes. **C-:** control negativo, **C+:** control positivo.



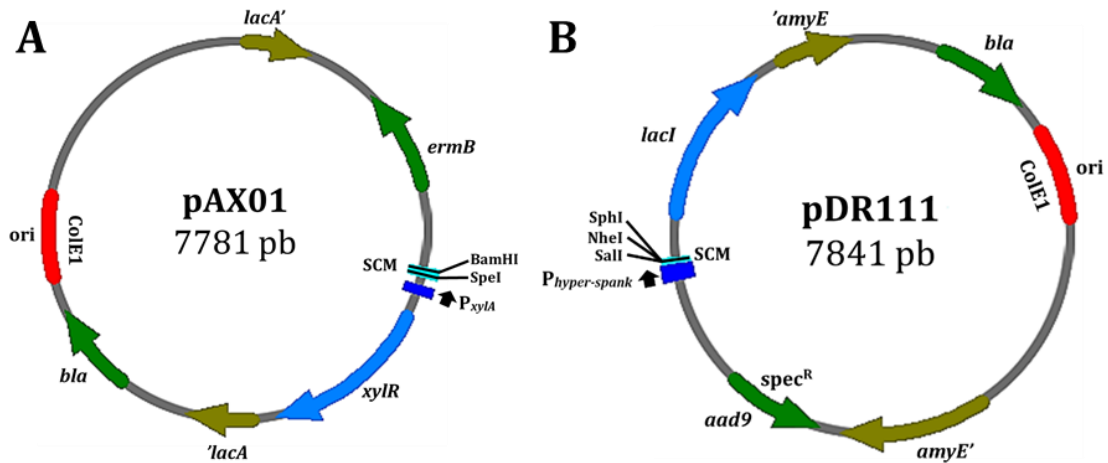
**Figura 8. Modelo de internalización y respuesta FRET**

El esquema indica los parámetros que tomó en cuenta el modelo cuantitativo de señalización de PhrA. PP: pentapéptidos



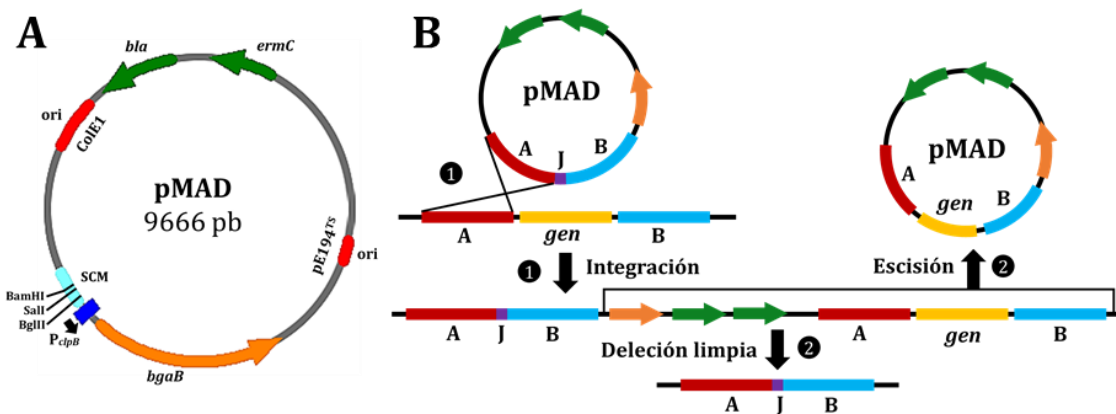
**Figura 9. Metodología de estimulación e inoculación para la elaboración de cinética intracelular y extracelular**

Para la cinética intracelular se utilizaron diferentes tiempos de estimulación (1). La misma metodología se utilizó para extraer los sobrenadantes de las células estimuladas a cada punto en el tiempo. Con estos sobrenadantes se estimularon células concentradas 10 veces (2). C-: control negativo, C+: control positivo.



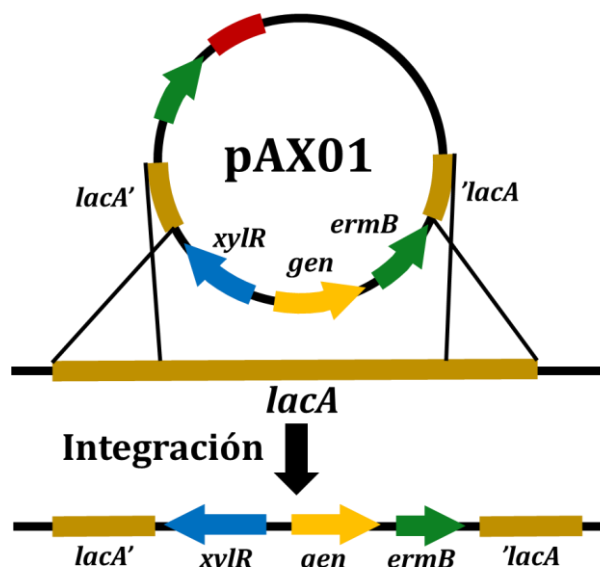
**Figura 10. Descripción de los plásmidos integrativos pAX01 y pDR111**

Ambos plásmidos contienen el origen *ColE1* y el casete de resistencia *bla* para replicación y selección con ampicilina en *E. coli*, respectivamente. En el sitio de clonación múltiple (SCM) se señalan las enzimas de restricción más utilizadas para la ligación de nuevos fragmentos **A**: El plásmido pAX01 el casete de resistencia *ermB* para selección con eritromicina, el fragmento corriente arriba y corriente abajo del gen *lacA* de *B. subtilis*. Entre ambos fragmentos está el regulador del operón xilosa de *B. megaterium* (*xylR*), el promotor de *xylA* y el SCM. **B**: El plásmido pDR111 contiene el casete de resistencia *aad9* para selección con espectinomicina, el fragmento corriente arriba y corriente abajo del gen *amyE* de *B. subtilis*, y entre ambos fragmentos el regulador del operón lactosa (*lacI*), el promotor mejorado *hiper-spank* y el SCM.



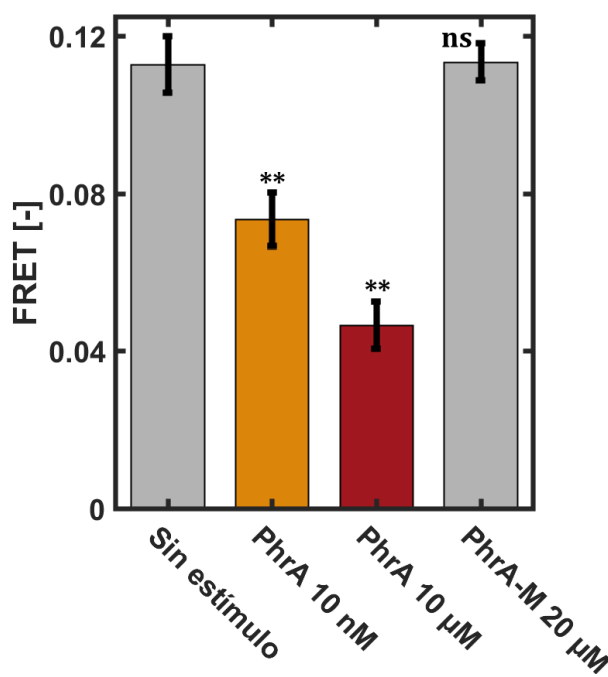
**Figura 11. Descripción del plásmido pMAD**

**A**: El plásmido pMAD contiene el origen *ColE1* y el casete de resistencia *bla* para replicación y selección con ampicilina en *E. coli*, respectivamente. También, presenta un origen termosensible, el gen *bgaB* que codifica para una  $\beta$ -galactosidasa termoresistente y el gen *ermC* para resistencia a macrólidos-lincosamidas que permitió la selección de mutantes. **B**: El primer choque térmico provoca la integración del plásmido completo por recombinación de sitio específico (1). El segundo choque térmico causa un evento de recombinación homóloga que resulta en la excisión del plásmido y la deleción de la región de interés (2). La región corriente arriba (rojo) y corriente abajo (celeste) son esenciales para la deleción del gen de interés.



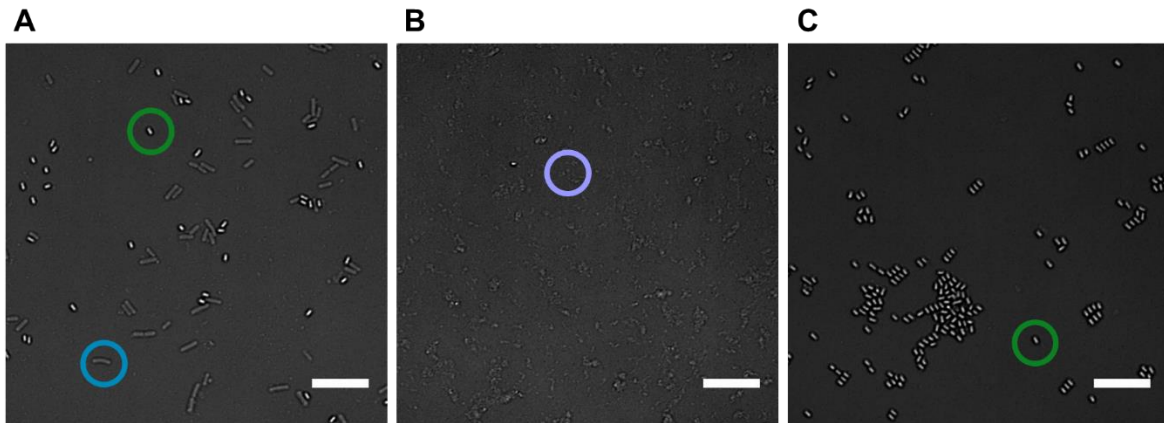
**Figura 12. Mecanismo de integración del plásmido pAX01**

La región corriente arriba y corriente abajo del gen *lacA* permiten la integración por recombinación homóloga de la región comprendida entre ambos fragmentos. El mismo mecanismo es aplicable para el plásmido pDR111 en el gen *amyE*.



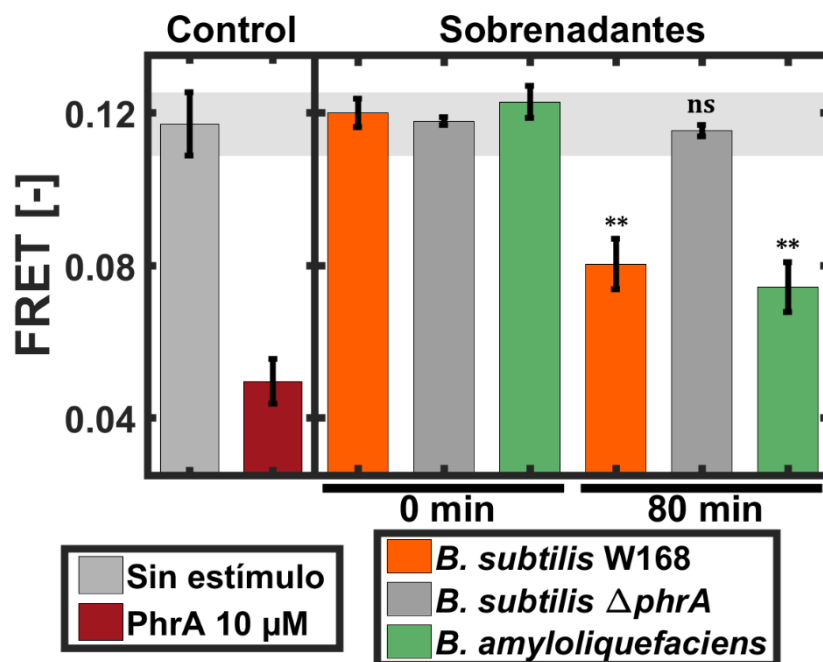
**Figura 13. Sensibilidad y especificidad del biosensor tipo FRET**

Diagrama de barras que muestra la eficiencia FRET promedio entre RapA-CFP y Spo0F-YFP. Las células sin estimulación y con estimulación con PhrA mutado (PhrA-M) muestran el mismo nivel sin diferencia significativa ( $p=0.605$ ). PhrA reduce la eficiencia FRET a  $\sim 0.07$  y  $\sim 0.04$  a una concentración de 10 nM y 10  $\mu$ M, respectivamente. Ambas concentraciones de estímulo presentan diferencias significativas con respecto a la eficiencia FRET de las células sin estímulo ( $p < 0.01$ ). Las barras de error corresponden a la desviación estándar. **Tiempo de estimulación:** 6 minutos. **Prueba estadística:** T-Student



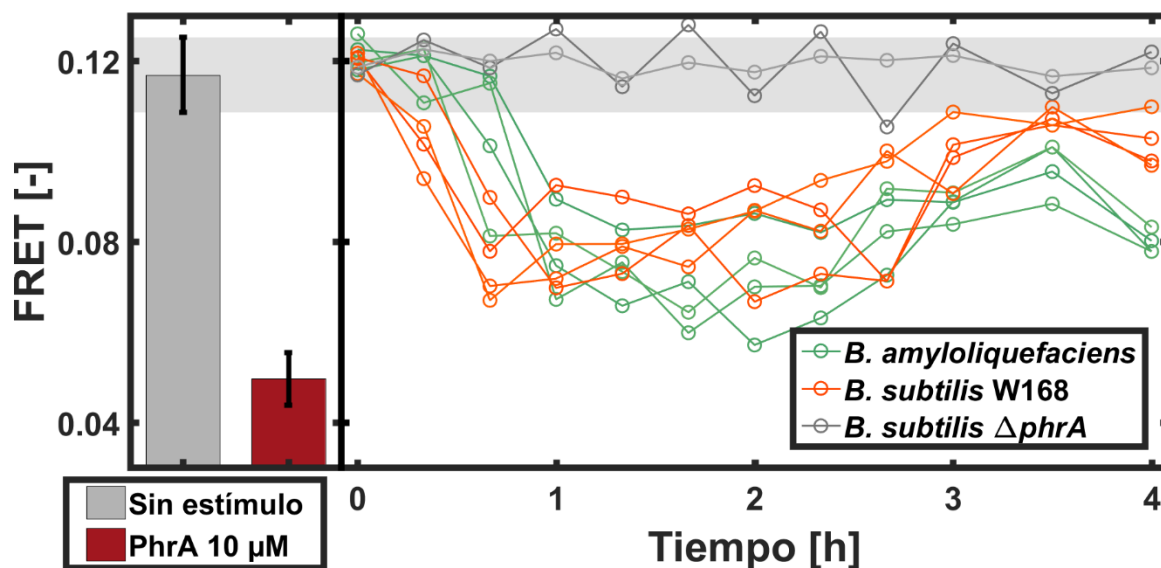
**Figura 14. Capacidad de esporulación de tres cepas de *Bacillus***

Microfotografías de campo claro (AT=1000x) de tres cepas de *Bacillus* a las 24 horas de incubación en medio de esporulación. **A:** Eficiencia de esporulación del ~50% de la cepa silvestre de *B. subtilis*. **B:** Eficiencia de esporulación del 0% de la cepa PhrA-deficiente de *B. subtilis*. **C:** Eficiencia de esporulación del ~100% de *B. amyloliquefaciens*. **Estructuras:** esporas (verde), células vegetativas (azul), restos celulares (púrpura).



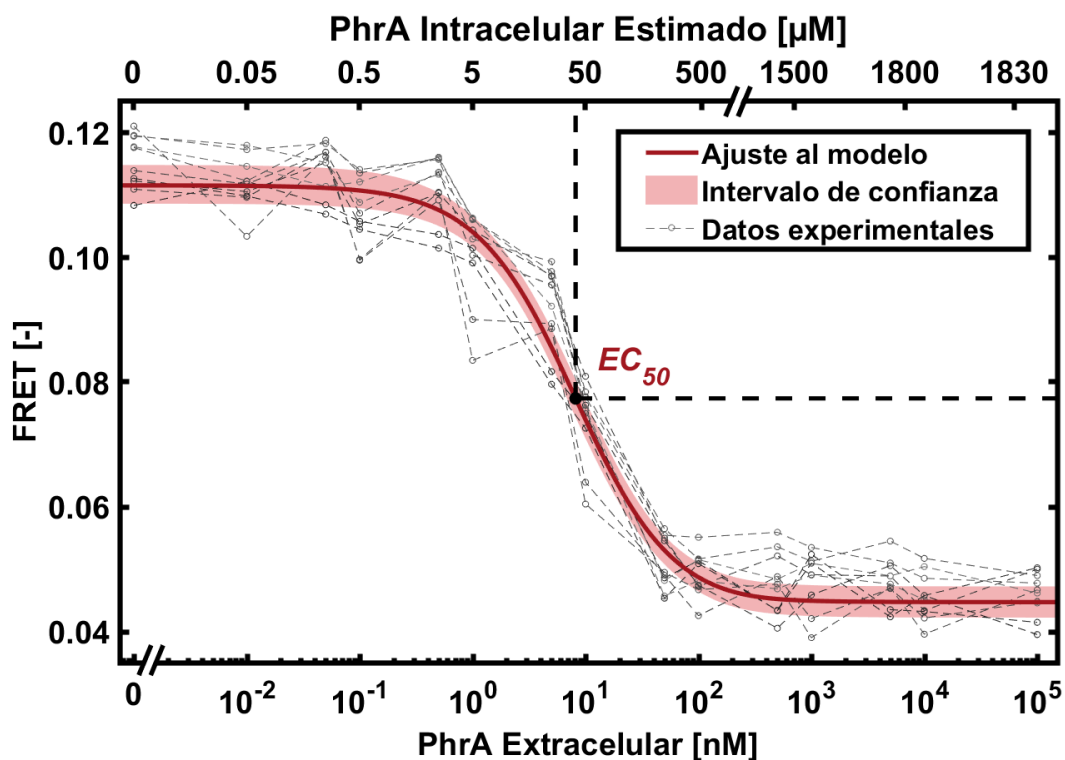
**Figura 15. Estimulación del biosensor con sobrenadantes de cultivos esporulantes de *Bacillus***

Diagrama de barras que muestra la eficiencia FRET promedio de células estimuladas con los sobrenadantes extraídos de tres cepas *B. subtilis* W168, *B. subtilis* PhrA-deficiente, y *B. amyloliquefaciens*, al inicio y al minuto 80 de incubación en medio de esporulación. Al tiempo 0 todas las cepas tienen el mismo nivel que las células sin estímulo. Al tiempo 80, la eficiencia FRET se redujo significativamente en la cepa silvestre de *B. subtilis* y *B. amyloliquefaciens* ( $p < 0.01$ ), no obstante, la cepa *B. subtilis* PhrA-deficiente exhibió la misma respuesta de las células sin estímulo ( $p = 0.304$ ). Las barras de error corresponden a la desviación estándar. La franja gris tenue corresponde al nivel de células sin estímulo. **Tiempo de estimulación:** 21 minutos. **Prueba estadística:** T-Student



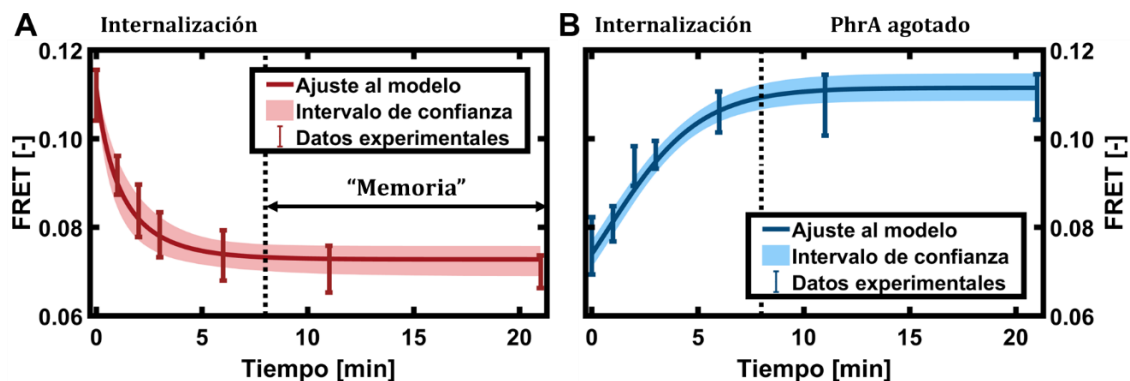
**Figura 16. Cinética de producción de PhrA en cultivos esporulantes de *Bacillus***

Diagrama de barras que muestra la eficiencia FRET promedio de células sin estímulo y con estímulo de PhrA 10  $\mu\text{M}$  como control (**izquierda**). Diagrama de puntos donde cada línea corresponde al promedio de la eficiencia FRET de cada replica biológica de cultivo esporulante y los círculos al tiempo de extracción del sobrenadante. *B. subtilis* PhrA-deficiente mantuvo el mismo nivel de las células sin estímulo a lo largo del experimento. Las cepas *B. subtilis* W168 y *B. amyloliquefaciens* exhibieron cinéticas de producción de PhrA similares, donde el mayor nivel de síntesis se encuentra entre la primera y tercera hora de incubación. *B. amyloliquefaciens* mantuvo la producción hasta el final del experimento. *B. subtilis* W168 regresó al nivel de las células sin estímulo posterior a la tercera hora de incubación (**derecha**). Las barras de error corresponden a la desviación estándar. La franja gris tenue corresponde al nivel de células sin estímulo. **Tiempo de estimulación:** 21 minutos.



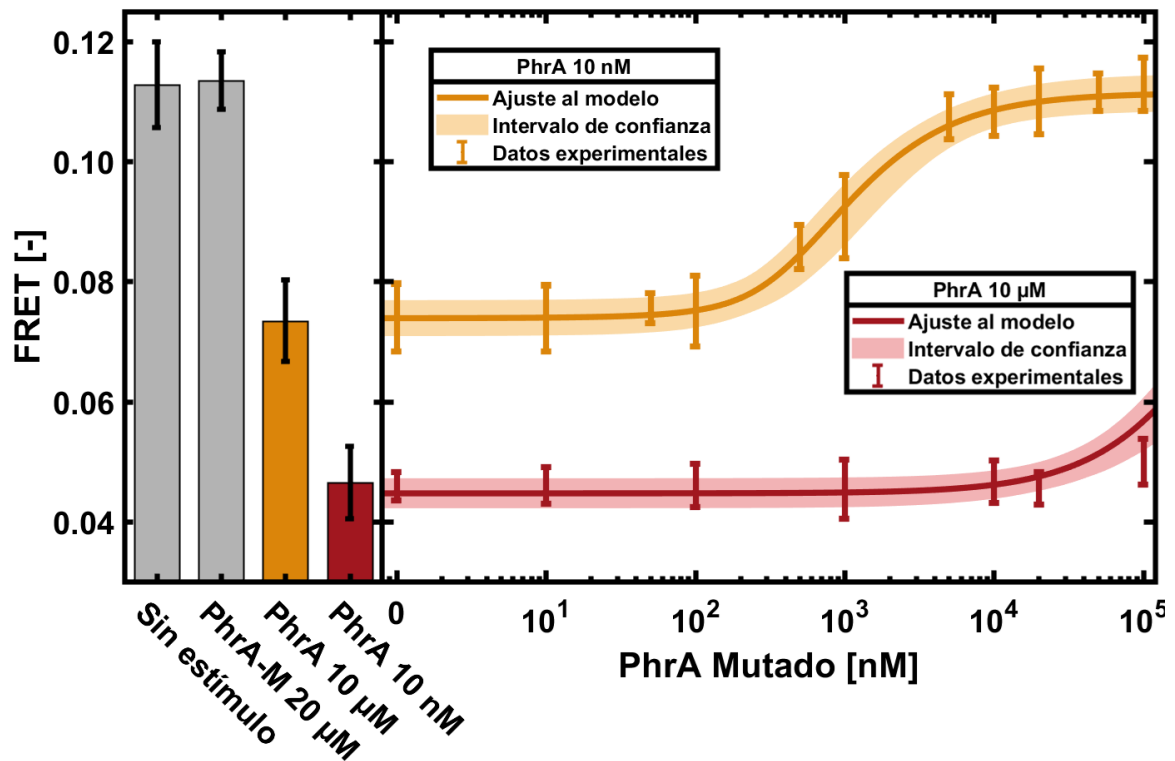
**Figura 17. Curva dosis-respuesta de PhrA**

Diagrama de puntos donde cada línea punteada corresponde a una replica biológica y cada círculo a la concentración de estimulación con PhrA. La línea roja es el ajuste hiperbólico de la curva dosis-respuesta de acuerdo con el modelo. La zona roja tenue corresponde al intervalo de confianza del ajuste del 95 %. El eje X inferior indica la concentración de PhrA extracelular (estimulación) y el eje X superior la concentración de PhrA intracelular que se estimó mediante el modelo. La concentración mínima efectiva ( $EC_{50}$ ) intracelular calculada por el modelo es  $\sim 41 \mu\text{M}$ . **Tiempo de estimulación:** 6 minutos.



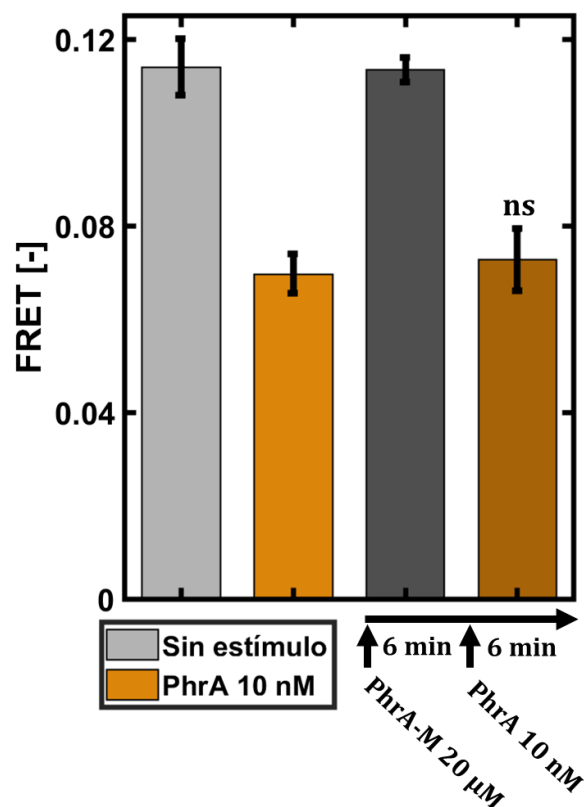
**Figura 18. Cinética de internalización de PhrA**

**A:** Diagrama de barras de error que corresponde a la desviación estándar de los resultados de eficiencia FRET en cada tiempo de estimulación: 0, 1, 2, 3, 6, 11 y 21 minutos. La línea roja es el ajuste de la dinámica de acuerdo con el modelo. La zona roja tenue corresponde al intervalo de confianza del ajuste del 95 %. La internalización del péptido tiene lugar hasta el minuto 8, posteriormente, las células mantienen un estado de “memoria” fenotípica. **Estimulación de PhrA:** 10 nM. **B:** Diagrama de barras de error que corresponde a la desviación estándar de los resultados de eficiencia FRET en respuesta al sobrenadante extraído de células con diferentes tiempos de estimulación con PhrA. La internalización del péptido tiene lugar hasta el minuto 8, posterior a lo que no queda péptido disponible en el espacio extracelular. La línea azul es el ajuste de la dinámica de acuerdo con el modelo. La zona azul tenue corresponde al intervalo de confianza del ajuste del 95 %. **Tiempo de estimulación:** 6 minutos.



**Figura 19. Competición de PhrA a nivel de internalización**

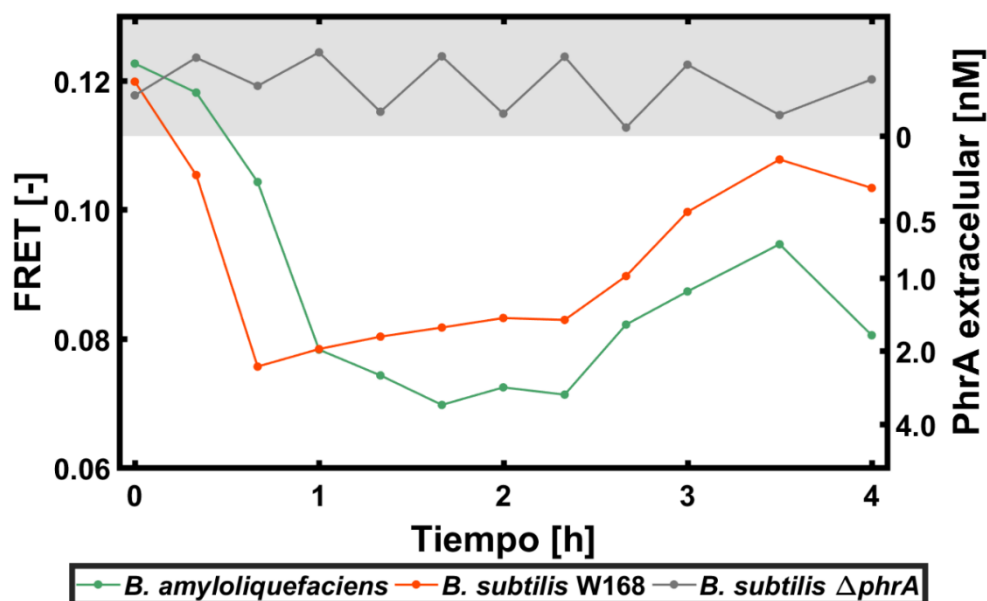
Diagrama de barras que muestra la eficiencia FRET promedio de células sin estímulo y con estímulo de PhrA 10 nM, PhrA 10  $\mu$ M y PhrA mutado (PhrA-M) 20  $\mu$ M, como control (**izquierda**). Diagrama de barras de error que corresponde a la desviación estándar de los resultados de eficiencia FRET a cada concentración de PhrA-M. Las líneas amarilla y roja corresponden a los ajustes de acuerdo con el modelo de competición con PhrA 10 nM y 10  $\mu$ M, respectivamente. Las zonas tenues del mismo color son el intervalo de confianza del ajuste del 95 %. La competición sucede de manera dosis-respuesta en una concentración 10 veces a la de PhrA. **Tiempo de estimulación:** 6 minutos.



### Figura 20. Competición de PhrA a nivel de receptor de RapA

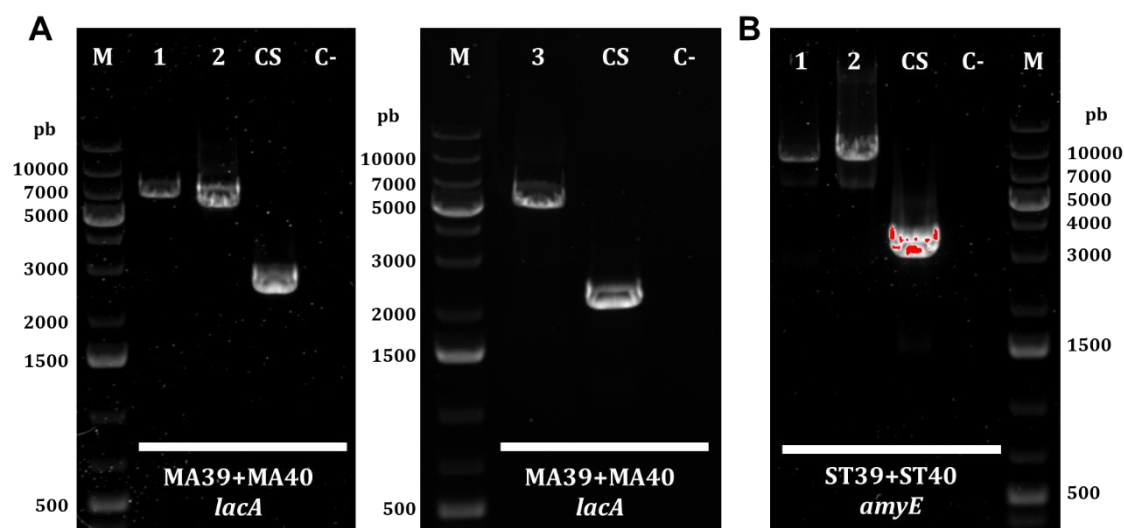
Diagrama de barras que muestra la eficiencia FRET promedio de células sin estímulo y con estímulo de PhrA 10 nM, como control, y de células estimuladas secuencialmente. Primero, se utilizó un estímulo de PhrA-M 20 µM (barra gris oscura), se lavó las células y se estimuló las mismas con PhrA 10 nM (barra café). Las células exhibieron una eficiencia FRET posterior al estímulo secuencial sin diferencia significativa con respecto al control de PhrA 10 nM de estímulo ( $p=0.302$ ). Es decir, el péptido competidor no influyó en la interacción de PhrA con su receptor en RapA. Las barras de error corresponden a la desviación estándar.

**Tiempo de estimulación:** 6 minutos. **Prueba estadística:** T-Student



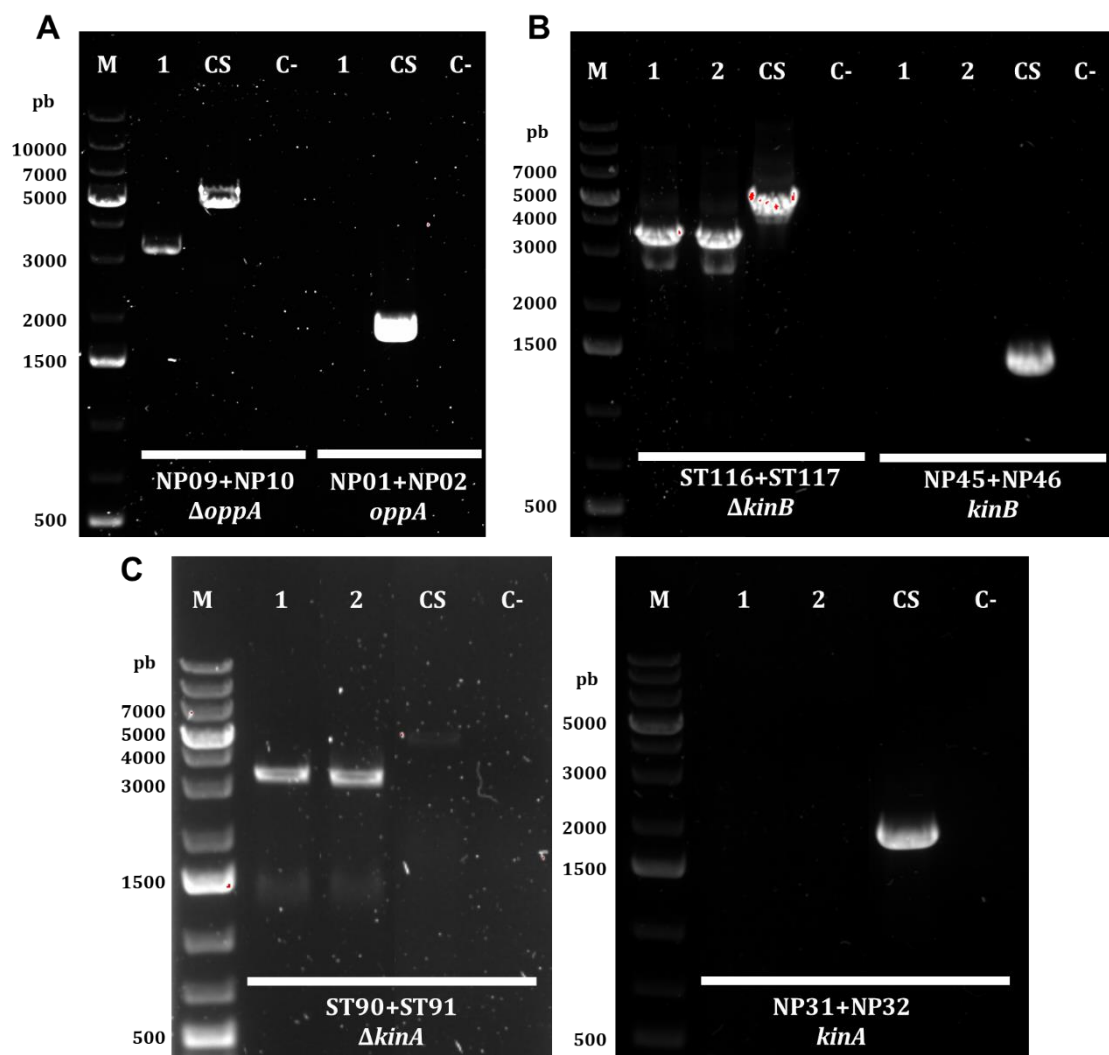
**Figura 21. Cuantificación de PhrA detectado en sobrenadantes de cultivos esporulantes de *Bacillus***

Diagrama de puntos que muestra la eficiencia FRET promedio de varias réplicas biológicas de cultivos esporulantes de tres cepas: *B. subtilis* W168, *B. subtilis* PhrA-deficiente, y *B. amyloliquefaciens*. Los puntos corresponden al tiempo de extracción del sobrenadante. El eje Y derecho muestra la concentración de PhrA en el sobrenadante calculada con el modelo. La concentración corresponde al límite de detección inferior porque existen otros péptidos competidores en el sobrenadante que impiden la acumulación intracelular de PhrA. La zona gris tenue denota la eficiencia FRET correspondiente a una concentración extracelular de PhrA de 0 nM. **Tiempo de estimulación:** 21 minutos



**Figura 22. Verificación de integración por recombinación homóloga de plásmidos integrativos**

**A:** Geles de electroforesis que indican la integración del plásmido pAX01 en el gen *lacA* dando como resultado un fragmento de ~ 6,800 pb. **1**, BIB-1553; **2**, BIB-1617; **3**, BIB-1612. **B:** Gel de electroforesis que indica la integración del plásmido pDR111 en el gen *amyE* dando como resultado un fragmento de ~ 8,900 pb. **1**, BIB-1618; **2**, BIB-625. **CS**, control de cepa silvestre sin modificación genética; **C-**, agua como control negativo; **pb**, pares de bases.



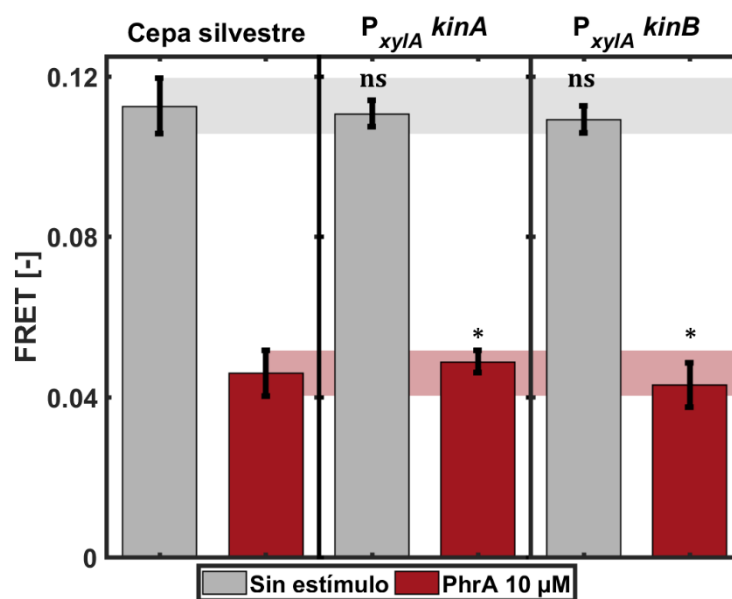
**Figura 23. Verificación de deleción limpia**

**A:** Gel de electroforesis que indica la deleción del gen *oppA*. Los cebadores de verificación amplificaron un fragmento de tamaño reducido (~ 3,000 pb). No se observa ningún fragmento con los cebadores específicos para *oppA*. **1**, BIB-1563. **B:** Gel de electroforesis que indica la deleción del gen *kinB*. Los cebadores de verificación amplificaron un fragmento de tamaño reducido (~ 3,500 pb). No se observa ningún fragmento con los cebadores específicos para *kinB*. **1**, BIB-1615; **2**, BIB-1616. **B:** Geles de electroforesis que indica la deleción del gen *kinA*. Los cebadores de verificación amplificaron un fragmento de tamaño reducido (~ 3,500 pb). No se observa ningún fragmento con los cebadores específicos para *kinA*. **1**, BIB-1554; **2**, BIB-1616. **CS**, control de cepa silvestre sin modificación genética; **C-**, agua como control negativo; **pb**, pares de bases.



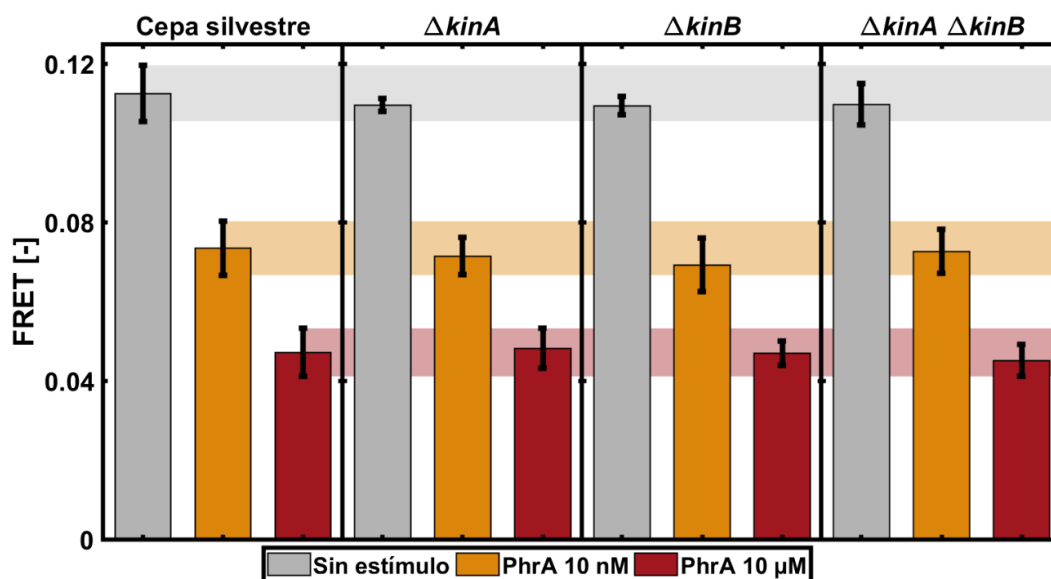
**Figura 24. Verificación de recombinación de sitio específico**

Gel de electroforesis que indica la ausencia de recombinación de sitio específico mediante la amplificación del gen *bla* propio de los plásmidos. No se observa ningún producto de amplificación en las cepas mutantes. **1**, BIB-1553; **2**, BIB-1554; **3**, BIB-1563; **4**, BIB-1612; **5**, BIB-1615; **6**, BIB-1616; **7**, BIB-1617; **8**, BIB-1618; **9**, BIB-625; **C+**, plásmido pAX01 como control positivo; **CS**, control de cepa silvestre sin modificación genética; **C-**, agua como control negativo; **pb**, pares de bases.



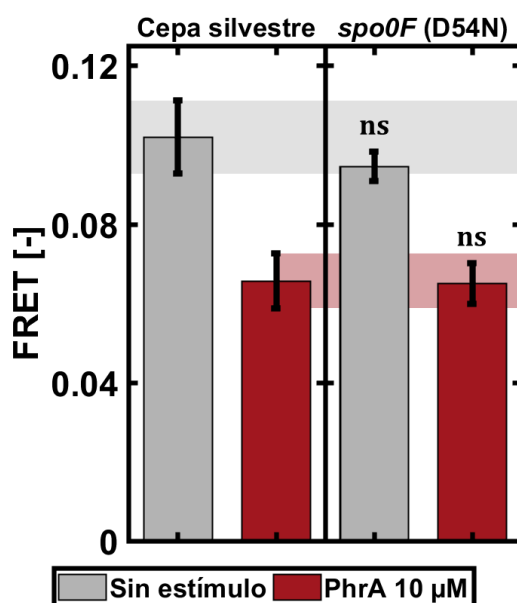
**Figura 25. Efecto de la sobreexpresión de quinasas KinA y KinB**

Diagrama de barras que muestra la eficiencia FRET promedio de células sin estímulo y con estímulo PhrA 10 μM correspondientes a tres cepas diferentes de *B. subtilis*: cepa silvestre, cepa de sobreexpresión de *kinA* y de sobreexpresión de *kinB*. En conjunto todas las cepas no presentan diferencias significativas en la eficiencia FRET sin estímulo ( $p=0.24$ ). No obstante, presentan diferencias significativas con un estímulo PhrA 10 μM ( $p=0.04$ ). Las franjas gris y roja indican el nivel de eficiencia FRET de la cepa silvestre. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. **Prueba estadística:** ANOVA de una vía



**Figura 26. Efecto de la ausencia de las quinasas KinA y KinB**

Diagrama de barras que muestra la eficiencia FRET promedio de células sin estímulo y con estímulo PhrA 10 nM y PhrA 10 μM correspondientes a cuatro cepas diferentes de *B. subtilis*: cepa silvestre, cepa KinA-deficiente, cepa KinB-deficiente y doble mutante KinA-KinB. En conjunto todas las cepas no exhiben diferencias significativas en la eficiencia FRET sin estímulo ( $p=0.39$ ), con estímulo PhrA 10 nM ( $p=0.82$ ) y PhrA 10 μM ( $p=0.47$ ). Las franjas gris, amarilla y roja indican el nivel de eficiencia FRET de la cepa silvestre. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. **Prueba estadística:** ANOVA de una vía



**Figura 27. Efecto en mutante resistente a la fosforilación**

Diagrama de barras que muestra la eficiencia FRET promedio de células sin estímulo y con estímulo PhrA 10 μM correspondientes a la cepa silvestre y cepa resistente a la fosforilación de Spo0F de *B. subtilis*. Las dos cepas no exhiben diferencias significativas en la eficiencia FRET sin estímulo ( $p=0.12$ ) y con estímulo PhrA 10 μM ( $p=0.43$ ). Las franjas gris y roja indican el nivel de eficiencia FRET de la cepa silvestre. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. **Prueba estadística:** T-Student

## 9 TABLAS

Tabla 1. Parámetros calculados experimentalmente

Parámetro	Valor
Número de células	$9.52 \times 10^7$
$V_e$ ( $\mu\text{L}$ )	500
$V_i$ (fL)	0.973

Tabla 2. Parámetros calculados en base al ajuste al modelo

Parámetro	Límite inferior <sup>1</sup>	Límite superior <sup>1</sup>	Mejor ajuste
$v_{\max}$ (amol/min)	0.15	0.64	0.30
$K_m$ (nM)	51.6	317.1	12.27
$EC_{50}$ ( $\mu\text{M}$ )	30.60	54.75	41.15
$FRET_0$	0.108	0.115	0.111
$\Delta FRET$	0.063	0.074	0.068

<sup>1</sup> Los límites superior e inferior corresponden a un intervalo de confianza del 95 %

Tabla 3. Cuantificación de PhrA extracelular en sobrenadantes de cultivos esporulantes de *Bacillus*

Cepa	Tiempo de extracción del sobrenadante (min)	Eficiencia FRET promedio (-)	PhrA extracelular estimado (nM) <sup>1</sup>
<i>B. subtilis</i> W168	0	0.1199	-0.23
	20	0.1054	0.20
	40	0.0756	2.31
	60	0.0784	1.97
	80	0.0803	1.76
	100	0.0817	1.62
	120	0.0832	1.48
	140	0.0829	1.51
	160	0.0897	0.98
	180	0.0996	0.44
	210	0.1078	0.12
	240	0.1034	0.28

**Tabla 3.** Continuación.

<b>Cepa</b>	<b>Tiempo de extracción del sobrenadante (min)</b>	<b>Eficiencia FRET promedio (-)</b>	<b>PhrA extracelular estimado (nM)<sup>1</sup></b>	
<i>B. subtilis</i> $\Delta phrA$	0	0.1177	-0.18	
	20	0.1236	-0.32	
	40	0.1192	-0.21	
	60	0.1244	-0.33	
	80	0.1152	-0.11	
	100	0.1238	-0.32	
	120	0.1149	-0.10	
	140	0.1237	-0.32	
	160	0.1127	-0.04	
	180	0.1225	-0.29	
	210	0.1147	-0.10	
	240	0.1202	-0.24	
	<i>B. amyloliquefaciens</i>	0	0.1227	-0.30
		20	0.1182	-0.19
40		0.1043	0.24	
60		0.0783	1.98	
80		0.0743	2.50	
100		0.0697	3.30	
120		0.0724	2.80	
140		0.0713	2.99	
160		0.0822	1.57	
180		0.0873	1.14	
210		0.0946	0.68	
240		0.0805	1.73	

<sup>1</sup> Todos los valores se estimaron a partir del modelo. No obstante, los valores negativos corresponden a una concentración de 0 nM.

Tabla 4. Cebadores utilizados en este trabajo

Código <sup>1</sup>	Secuencia (5'-3') <sup>2</sup>	Descripción <sup>3</sup>	Propósito	Referencia
NP04	CATCTGAATGAAGTCAGTTGcatgtgttttct gccccatattgc	<b>oppA corriente arriba</b> <i>Reverse</i> – región de unión	Clonación	
NP05	CAACTGACTTCATTTCAGATGctcaaggtat atggggagaaaag	<b>oppA corriente abajo</b> <i>Forward</i> - región de unión		
NP07	gcactgattggtgtatcatttcg	<b>pAX01</b> <i>Forward</i>	Verificación	
NP08	gtgtatttacttgagaggagacag	<b>pAX01</b> <i>Reverse</i>		
NP09	ggatcattcagagacatgatacgtg	<b>ΔoppA</b> <i>Forward</i>		
NP10	gcatctttccagagggaagg	<b>ΔoppA</b> <i>Reverse</i>		
NP11	TACGCGTTCGACgatataggcgacacactgcatc	<b>oppA corriente arriba</b> <i>Forward</i> - SalI + región homóloga	Clonación	Este trabajo
NP12	ATGGAAGATCTctaggctcctttctttgctttg	<b>oppA corriente abajo</b> <i>Reverse</i> - BglIII + región homóloga		
NP14	gttgatggataaacttgttcac	<b>pAX01</b> <i>Reverse</i> II	Verificación	
NP28	tgtgtcctaagatgttgccatc	<b>FRET</b> <i>Forward</i>		
NP29	gctatgtgcaagaacgcacg	<b>FRET</b> <i>Reverse</i>		
NP30	tattgaaaaaggaagagtgcg	<b>pAX01</b> <i>Forward</i> II		
NP31	gtggaacaggatacgcagcatg	<b>kinA</b> <i>Forward</i>		
NP32	gcaatgcagacgataaacaacg	<b>kinA</b> <i>Reverse</i>		

Tabla 4. Continuación...

Código <sup>1</sup>	Secuencia (5'-3') <sup>2</sup>	Descripción <sup>3</sup>	Propósito	Referencia
NP39	ttgtgctgttgAacatgaaaattcccggcatggacg	<i>spo0F</i> Forward (160G>A)	Mutagénesis	
NP40	atgtTcaacagcacaaggctcgggccgttctttgtc	<i>spo0F</i> Reverse (160G>A)		
NP45	TAACA <b>ACTAGTTAGGAGG</b> GAGAGGAAa tggaaattctaaaagactatcttctgc	<i>kinB</i> Forward - SpeI + RBS + región homóloga	Clonación	Este trabajo
NP46	TGATAG <b>GGATCC</b> tctgtcatcacctcgcatttattc	<i>kinB</i> Reverse - BamHI + región homóloga		
NP47	TAACA <b>ACTAGTTAGGAGG</b> GAGAGGAA gtgaaaggcacaagaaag	<i>pepF</i> Forward - SpeI + RBS + región homóloga	Clonación	
NP48	TGATAG <b>GGATCC</b> ttaagactgcttgactttcatcagc	<i>pepF</i> Reverse - BamHI + región homóloga		
ST39	ctggtcggagattgggatgatag	<i>amyE</i> Forward		(Trauth y Bischofs, 2014)
ST40	aatttccatgttgcgtaagtcag	<i>amyE</i> Reverse		
ST90	gatgaaattccattgtttctgagc	$\Delta$ <i>kinA</i> Forward		Este trabajo
ST91	gggtgtaaataatgggtaccttag	$\Delta$ <i>kinA</i> Reverse		
ST116	gctgtactcacttgccagacc	$\Delta$ <i>kinB</i> Forward	Verificación	
ST117	ccgaaacgatcagcaagcatg	$\Delta$ <i>kinB</i> Reverse		
ST126	atcatttatcaactcttttacac	pMAD Reverse		(Domínguez et al., 2014)
SonSeq 14	ctgatggctgctcatctacctgcc	pMAD Forward		
ST129	atgagtattcaacattccggtgc	<i>bla</i> Forward		(Trauth y Bischofs, 2014)
ST130	ttaccaatgcttaacagtgagg	<i>bla</i> Reverse		

**Tabla 4.** Continuación.

<b>Código<sup>1</sup></b>	<b>Secuencia (5'-3')<sup>2</sup></b>	<b>Descripción<sup>3</sup></b>	<b>Propósito</b>	<b>Referencia</b>
MA39	ttcattccgatggatttagac	<i>lacA Forward</i>		Este trabajo
MA40	acgtgcttctccttctcaatg	<i>lacA Reverse</i>		
SonSeq 18	atggcaagaacgttgctcga	<b>pDR111 Forward</b>	Verificación	(Mutlu et al., 2018)
SonSeq 19	tacgtacgatcttcagccg	<b>pDR111 Reverse</b>		

<sup>1</sup> La codificación de cada cebador corresponde a las iniciales del nombre del diseñador según la base de datos del laboratorio donde se llevó a cabo el trabajo.

<sup>2</sup> Codificación de letras: **verde**, nucleótidos añadidos de *novo*; **azul**, sitio de unión al ribosoma (RBS); **rojo**, sitio de restricción; **mayúsculas**, región no homóloga; **minúsculas**, región homóloga

<sup>3</sup> **Δ**, deleción limpia

**Tabla 5. Condiciones específicas de PCR para cada par de cebadores**

Cebadores	Fragmento diana	T <sub>a</sub> (° C) <sup>1, 2</sup>	Tiempo de elongación (sec) <sup>1, 2</sup>	Ciclos <sup>3</sup>
NP11+NP04	<i>oppA</i> corriente arriba	66.7	30	30
NP12+NP05	<i>oppA</i> corriente abajo	64.9	30	30
NP07+NP08	SCM de pAX01	- (48.6)	- (3 min)	30
NP09+NP10	<i>oppA</i> locus <i>oppA</i> unión	68.8 (52.7)	75 (5 min)	35
NP11+NP12	fragmentos corriente arriba y abajo	66.4	60	-
NP31+NP32	<i>kinA</i>	69.7	30	30
NP45+NP46	<i>kinB</i>	66.1	30	30
NP47+NP48	<i>pepF</i>	65.9	30	30
ST39+ST40	<i>amyE</i>	67.2 (53.6)	135 (11 min)	35
ST90+ST91	<i>kinA</i> locus	63.7 (48.9)	90 (5 min)	35
ST116+ST117	<i>kinB</i> locus	70.4 (53.7)	(5 min)	35
SonSeq 14+ST126	SCM de pMAD	- (41.7)	- (3 min)	30
ST129+ST130	<i>bla</i>	65.2	15	30
MA39+MA40	<i>lacA</i>	66.7 (51.3)	135 (9 min)	35

<sup>1</sup> Los valores colocados entre paréntesis corresponden a las condiciones de PCR utilizadas para la PCR de colonias

<sup>2</sup> Los guiones en dichas columnas representan que los cebadores no se utilizaron para una PCR con la polimerasa *Phire* o *Phusion*

<sup>3</sup> El guión de esta columna quiere decir que se utilizó un protocolo específico de PCR para la fusión de los fragmentos corriente arriba y abajo (véase Sección 4.9.2)

Tabla 6. Plásmidos utilizados en este trabajo

Código <sup>1</sup>	Nombre	Genotipo <sup>2</sup>	Referencia
EIB-4	pAX01	<i>lacA' ermB P<sub>xylA</sub> xylR 'lacA bla</i> ColE1-ori	(Härtl et al., 2001)
EIB-28	pMAD	<i>P<sub>clpB</sub> bgaB pE194<sup>ts</sup>-ori ermC bla</i> ColE1-ori	(Arnaud et al., 2004)
EIB-216	pMAD <i>kinA</i>	<i>kinA</i> corriente arriba y abajo <i>P<sub>clpB</sub> bgaB pE194<sup>ts</sup>-ori ermC bla</i> ColE1-ori	
EIB-217	pMAD <i>kinB</i>	<i>kinB</i> corriente arriba y abajo <i>P<sub>clpB</sub> bgaB pE194<sup>ts</sup>-ori ermC bla</i> ColE1-ori	Este trabajo
EIB-284	pDR111 FRET	<i>amyE' aad9 P<sub>hyper-spank-spo0F-yfp cfp-rapA lacI 'amyE bla</sub></i> ColE1-ori	
EIB-421	pAX01 <i>kinA</i>	<i>lacA' ermB P<sub>xylA</sub>-kinA xylR 'lacA bla</i> ColE1-ori	(De Jong et al., 2010)
EIB-527	pMAD <i>oppA</i>	<i>oppA</i> corriente arriba y abajo <i>P<sub>clpB</sub> bgaB pE194<sup>ts</sup>-ori ermC bla</i> ColE1-ori	
EIB-543	pAX01 <i>kinB</i>	<i>lacA' ermB P<sub>xylA</sub>-kinB xylR 'lacA bla</i> ColE1-ori	
EIB-543	pAX01 <i>pepF</i>	<i>lacA' ermB P<sub>xylA</sub>-pepF xylR 'lacA bla</i> ColE1-ori	Este trabajo
EIB-546	pDR111 FRET (D54N)	<i>amyE' aad9 P<sub>hyper-spank-spo0F(160G&gt;A)-yfp cfp-rapA xylR 'amyE bla</sub></i> ColE1-ori	

<sup>1</sup> La codificación de cada plásmido responde a la base de datos del laboratorio donde se llevó a cabo el trabajo. **E:** *E. coli*

<sup>2</sup> **gen'**, región corriente arriba; **gen**, región corriente abajo; **ts**, termosensible; **ori**, origen de replicación

Tabla 7. Cepas utilizadas en este trabajo

Código <sup>1</sup>	Nombre <sup>2</sup>	Genotipo <sup>3</sup>	Referencia
-	<i>E. coli</i> DH5α	<i>F- φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA- argF)U169 recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+) phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ-</i>	Invitrogen (Estados Unidos)
BIB-224	<i>Bacillus subtilis</i> W168 IA700	<i>trpC2</i>	(Burkholder y Giles, 1947)
BIB-275	<i>ΔphrA</i>	<i>trpC2 ΔphrA</i>	
BIB-415	<i>ΔrapAphrA Δspo0F</i>	<i>trpC2 ΔrapAphrA Δspo0F</i>	
BIB-625	Biosensor tipo FRET	<i>trpC2 ΔrapAphrA Δspo0F amyE::[aad9 P<sub>hyper-spank</sub>-spo0F-yfp cfp-rapA lacI]</i>	Este trabajo
BIB-1553	<i>kinA</i> sobreexpresión	<i>trpC2 ΔrapAphrA Δspo0F amyE::[aad9 P<sub>hyper-spank</sub>-spo0F-yfp cfp-rapA lacI] lacA::[ermB P<sub>xylA</sub> RBS kinA xylR]</i>	
BIB-1554	mutante <i>kinA</i>	<i>trpC2 ΔrapAphrA Δspo0F amyE::[aad9 P<sub>hyper-spank</sub>-spo0F-yfp cfp-rapA lacI] ΔkinA</i>	
BIB-1557	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	-	Donado por Leobardo Serrano (UNAM, México)
BIB-1563	mutante <i>oppA</i>	<i>trpC2 ΔrapAphrA Δspo0F amyE::[aad9 P<sub>hyper-spank</sub>-spo0F-yfp cfp-rapA lacI] ΔoppA</i>	Este trabajo
BIB-1612	<i>pepF</i> sobreexpresión	<i>trpC2 ΔrapAphrA Δspo0F amyE::[aad9 P<sub>hyper-spank</sub>-spo0F-yfp cfp-rapA lacI] lacA::[ermB P<sub>xylA</sub> RBS pepF xylR]</i>	

**Tabla 7.** Continuación.

<b>Código<sup>1</sup></b>	<b>Nombre<sup>2</sup></b>	<b>Genotipo<sup>3</sup></b>	<b>Referencia</b>
BIB-1615	mutante <i>kinB</i>	<i>trpC2 ΔrapAphrA Δspo0F amyE::[aad9 P<sub>hyper-spank-spo0F</sub>-yfp</i> <i>cfp-rapA lacI] ΔkinB</i>	
BIB-1616	mutante <i>kinA-kinB</i>	<i>trpC2 ΔrapAphrA Δspo0F amyE::[aad9 P<sub>hyper-spank-spo0F</sub>-yfp</i> <i>cfp-rapA lacI] ΔkinA ΔkinB</i>	Este trabajo
BIB-1617	<i>kinB</i> sobreexpresión	<i>trpC2 ΔrapAphrA Δspo0F amyE::[aad9 P<sub>hyper-spank-spo0F</sub>-yfp</i> <i>cfp-rapA lacI] lacA::[ermB P<sub>xylA</sub> RBS kinB xylR]</i>	
BIB-1618	<i>spo0F</i> D54N	<i>trpC2 ΔrapAphrA Δspo0F amyE::[aad9 P<sub>hyper-spank-</sub></i> <i>spo0F(150G&gt;A)-yfp cfp-rapA lacI]</i>	

<sup>1</sup> La codificación de cada cepa responde a la base de datos del laboratorio donde se llevó a cabo el trabajo. **B:** *Bacillus*

<sup>2</sup> Todas las cepas corresponden a derivadas de la *B. subtilis* W168, excepto que se indique lo contrario, y el nombre resalta su característica más importante

<sup>3</sup> **gen::[secuencia]**, integración de la secuencia en el gen específico; **Δ**, delección limpia

## 10 ANEXOS

### Anexo 1. Materiales y equipos

#### 1 Reactivos

- Bacto™ Tryptone (BD Biosciences, Alemania)
- Cloruro de sodio (Sigma-Aldrich, Alemania)
- BD Bacto™ Yeast Extract (BD Biosciences, Alemania)
- BD Bacto™ Agar (BD Biosciences, Alemania)
- Dihidrocloruro de espectinomicina pentahidratado (AppliChem, Alemania)
- Eritromicina (AppliChem, Alemania)
- Hidrocloruro de lincomicina (AppliChem, Alemania)
- D-(+)-Glucose (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Ácido morfolinopropano sulfónico (MOPS) (Serva, Alemania)
- L-Triptófano (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Hidrocloruro de tiamina (AppliChem, Alemania)
- Glutamato de potasio monohidratado (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Sulfato de hierro (II) heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Cloruro de manganeso (II) tetrahidratado ( $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Sulfato de magnesio heptahidratado ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Cloruro de zinc ( $\text{ZnCl}_2$ ) (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Cloruro de calcio ( $\text{CaCl}_2$ ) (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Fosfato de potasio monobásico ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Fosfato de potasio dibásico trihidratado ( $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) (Sigma-Aldrich, Alemania)
- 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-Gal) (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Hidrolisado de caseína (Carl Roth, Alemania)
- Citrato de sodio tribásico tetrahidratado (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Dihidrocloruro de espectinomicina pentahidratado (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Hidróxido de potasio (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Hidróxido de sodio (Sigma-Aldrich, Alemania)
- L-Glutamato (Sigma-Aldrich, Alemania)
- L-Alanina (Sigma-Aldrich, Alemania) (Sigma-Aldrich, Alemania)

- L-Asparagina monohidratada (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Cloruro de amonio ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Sulfato de sodio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Nitrato de amonio ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Cloruro férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Sulfato de manganeso (II) tetrahidratado ( $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Cloruro de magnesio hexahidratado ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )
- *Phire Hot Start II DNA Polymerase* (ThermoFisher Scientific, Alemania)
- *5X Phire Reaction Buffer* (ThermoFisher Scientific, Alemania)
- *Phusion Hot Start II DNA Polymerase* (ThermoFisher Scientific, Alemania)
- *5X Phusion HF Buffer* (ThermoFisher Scientific, Alemania),
- *Q5® Hot Start High-Fidelity DNA Polymerase* (New England BioLabs, Alemania)
- *5X Q5 Reaction Buffer* (New England BioLabs, Alemania)
- *5X Q5 High GC Enhancer* (New England BioLabs, Alemania)
- dNTP Mix (10 mM) (ThermoFisher Scientific, Alemania)
- Enzimas de restricción: DpnI, BamHI, SpeI, Sall, BglII (New England BioLabs, Alemania)
- *CutSmart® Buffer 10X* (New England BioLabs, Alemania)
- *T4 DNA Ligase* (New England BioLabs, Alemania)
- *T4 DNA Ligase Buffer 10X* (New England BioLabs, Alemania)
- *GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder* (ThermoFisher Scientific, Alemania)
- *PCR Master Mix 2X* (ThermoFisher Scientific, Alemania)
- *DNA Gel Loading Dye 6X* (ThermoFisher Scientific, Alemania)
- Tris-acetato EDTA (TAE) 10X
- Solución tamponadora de fosfato (PBS) 10X
- Agarosa ultrapura (Sigma-Aldrich, Alemania)
- *SYBR Safe* (Invitrogen, Estados Unidos)
- *QIAprep Spin Miniprep Kit* (Qiagen, Alemania)
- *NucleoSpin® Tissue* (Macherey-Nagel, Alemania)
- *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega, Estados Unidos)
- Lisozima de huevo de gallina (Sigma-Aldrich, Alemania)
- Etanol 99 % (Universidad de Heidelberg, Alemania)

## 2 Materiales

- Cajas Petri desechables de 20 mm
- Guantes desechables de látex
- Guantes desechables de nitrilo
- Cubetas de cuarzo
- Asas calibradas desechables de 10  $\mu\text{L}$
- Tubos de vidrio de 15 x 150 mm
- Puntas de pipeta desechables de 1000  $\mu\text{L}$
- Puntas de pipeta desechables de 20-200  $\mu\text{L}$
- Puntas de pipeta desechables con filtro de 1100  $\mu\text{L}$
- Puntas de pipeta desechables con filtro de 200  $\mu\text{L}$
- Puntas de pipeta desechables con filtro de 20  $\mu\text{L}$
- Puntas de pipeta desechables con filtro de 10  $\mu\text{L}$
- Membrana de Poliestersulfona (PES) de 0.2  $\mu\text{m}$  (VWR, Alemania)
- Jeringas desechables de 15 mL
- Tubos eppendorf de 1.5 y 2 mL
- Tubos para PCR con tapa plana
- Tubos de centrifuga desechables de 15 y 50 mL
- Matraz de vidrio de 100, 200 y 1000 mL
- Placas porta y cubre objetos

## 3 Equipos

- Centrifuga de trabajo *Alegro X-12R* (Beckman Coulter GmbH, Alemania)
- Microcentrifuga *Heraeus™ Pico™ 17* (ThermoFisher Scientific, Alemania)
- Termociclador *C1000 Touch™ Thermal Cycler* (Bio-Rad, Alemania)
- Microscopio de fluorescencia invertido *Olympus IX81* (Olympus, Japón)
- Microscopio de fluorescencia invertido *Olympus IX71* (Olympus, Japón)
- Incubadora con sistema de agitación *Multitron Standard* (Infors HT, Alemania)
- Incubadora *Heraeus 6000* (ThermoFisher Scientific, Alemania)
- *NanoDrop 1000c* (ThermoFisher Scientific, Alemania)
- Fotodocumentador *Gel Doc™ XR+ Gel Documentation System* (Bio-Rad, Alemania)
- *TKA GenPure UV-TOC* (ThermoFisher Scientific, Alemania)
- *Biometra TSI ThermoShaker* (Analytik Jena, Alemania)

- Balanza analítica *Sartorius® - CP124S* (Sartorius, Alemania)
- Turbidímetro *Ultrospec 10* (Biochrom, Alemania)
- Potenciómetro *Eutech pH 5+* (Eutech Instruments, Alemania)
- Vortex *Reax top* (Heidolph, Alemania)

## **Anexo 2. Composición de los medios de cultivo**

### **1 Medio de Lisogenia (LB)**

El caldo LB se preparó con 10 g de *Bacto™ Tryptone* (0.025 %), 5 g de *Bacto™ Yeast Extract* (0.2 %) y 10 g de cloruro de sodio que se disolvieron en 950 mL de agua grado reactivo tipo 1. Se corrigió el pH a 7 con NaOH 1 M y se añadió agua hasta alcanzar 1000 mL. Para el agar LB se añadió *BD Bacto™ Agar* en concentración 1.5 % (m/v). Ambos medios se autoclavaron por 30 minutos a 15 libras de presión y 121 °C (Cutting y Vander, 1990).

### **2 Medio mínimo S<sub>7.50</sub>**

El medio mínimo S<sub>7.50</sub> se preparó el mismo día de cada experimento a partir de soluciones estériles de cada componente. El medio consistió en solución tamponadora fosfato de potasio (4 mM), sulfato de amonio (8 mM), MOPS (50 mM), glucosa (1 %), glutamato de potasio (0.1 %), triptófano (50 µg/mL), cloruro de manganeso (II) tetrahidratado (50 µM), sulfato férrico heptahidratado (5 µM), sulfato de magnesio heptahidratado (2 µM), tiamina (2 µM), cloruro de zinc (1 µM) y cloruro de calcio (700 nM) (Vasantha y Freese, 1980).

### **3 Medio SpC**

El medio mínimo SpC se preparó el mismo día del experimento a partir de soluciones estériles de cada componente y se mantuvo a 37 °C hasta su inoculación. Este medio consistió en sulfato de amonio (15 mM), fosfato de potasio dibásico trihidratado (80 mM), fosfato de potasio monobásico (44 mM), citrato de trisodio dihidratado (3.4 mM), glucosa (0.5 %), sulfato de magnesio (0.018 %), *Bacto™ Yeast Extract* (0.2 %), *Bacto™ Tryptone* (0.025 %) y L-triptófano (20 µg/mL) (Cutting y Vander, 1990).

### **4 Medio SpII**

El medio mínimo SpII se preparó el mismo día del experimento a partir de soluciones estériles de cada componente y se mantuvo a 37 °C hasta su inoculación. Este medio

consistió en sulfato de amonio (15 mM), fosfato de potasio dibásico trihidratado (80 mM), fosfato de potasio monobásico (44 mM), citrato de trisodio dihidratado (3.4 mM), glucosa (0.5 %), sulfato de magnesio (0.084 %), cloruro de calcio (0.5 mM), *Bacto*<sup>TM</sup> *Yeast Extract* (0.1 %), *Bacto*<sup>TM</sup> *Tryptone* (0.01 %) y L-triptófano (20 µg/mL) (Cutting y Vander, 1990).

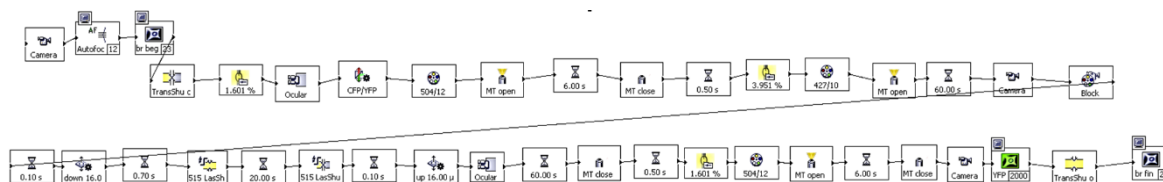
## 5 Medio de crecimiento

El medio definido de crecimiento (GM, por sus siglas en inglés) se preparó el mismo día del experimento a partir de soluciones estériles de cada componente. El medio consistió en hidrolisado de caseína (9.4 mg/mL), L-glutamato (25 mM), L-alanina (14 mM), L-asparagina (10.5 mM), fosfato de potasio monobásico (10 mM), cloruro de amonio (25 mM), sulfato de sodio (775 µM), nitrato de amonio (1.3 mM), cloruro férrico hexahidratado (37 µM), sulfato de magnesio heptahidratado (425 µM), cloruro de calcio (0.002 %), sulfato de manganeso (II) tetrahidratado (98 µM) y L-triptófano (20 µg/mL). El triptófano sólo se añadió para el cultivo de *Bacillus subtilis* W168 y las cepas derivadas de este (Nicholson y Setlow, 1990).

## 6 Medio de esporulación

El medio definido de esporulación (SM) se preparó el mismo día del experimento a partir de soluciones estériles de cada componente. El medio consistió en cloruro férrico hexahidratado (3 µM), cloruro de magnesio hexahidratado (37 µM), cloruro de manganeso (II) tetrahidratado (90 µM), cloruro de amonio (9 mM), sulfato de sodio (670 µM), fosfato de potasio monobásico (450 µM), nitrato de amonio (1 mM), L-glutamato (0.2 % m/v), cloruro de calcio (1 mM), sulfato de magnesio (40 mM) y L-triptófano (20 µg/mL). El triptófano sólo se añadió para el cultivo de *Bacillus subtilis* W168 y las cepas derivadas de este (Nicholson y Setlow, 1990).

### Anexo 3. Protocolo experimental de la plataforma XCellence



El protocolo de FRET-fotoblanqueo se aplicó en cada punto enfocado de la muestra (véase Sección 4.4)

#### Anexo 4. *Script* para cálculo de la eficiencia FRET

```

dataname='20180113b';
datap=load(dataname);
%% get points
time=datap(:,1);
data=[time,datap(:,2),datap(:,3)];
figure
plot(time,data(:,3),time,data(:,2))
[xm, ym] = getpts;
close
%%
inds(1)=1;
for i=2:(length(xm)+1)
    inds(i)=find(time>xm(i-1),1,'first');
end
inds(length(inds)+1)=length(time);
%% loop for fitting
line1s=[];
line2s=[];
meanb=[];
meana=[];
frets=[];
fitrange=[];
for i=2:length(inds)
    figure
    plot(time(inds(i-1):inds(i)),data(inds(i-1):inds(i),3))
    title(num2str(i-1));
    [x, y] = getpts; %get specified datapoints from graph
    close
    %choose data from the table and make two new ones
    x1=time(x(1)<=time & time<=x(2));
    y1=data(x(1)<=time & time<=x(2),3);
    x2=time(x(3)<=time & time<=x(4));
    y2=data(x(3)<=time & time<=x(4),3);

    line1=fliplr(robustfit(x1,y1)); %estimate the data with a line
    line2=fliplr(robustfit(x2,y2));
    meanb(end+1)=mean(y1);
    meana(end+1)=mean(y2);
    line1s=[line1s;line1];
    line2s=[line2s;line2];
    fitrange(:,end+1)=[x(1),x(2),x(3),x(4)];
    FRET=1-(line1(1)*x(3)+line1(2))/(line2(1)*x(3)+line2(2)); %calculate value of lines and fret
    frets=[frets;FRET];
% figure
% plot(x1,y1,x2,y2,x1,x1*line1(2)+line1(1),x2,x2*line2(2)+line2(1))
% title(files(i));
end
sprintf('your results:')
frets
line1s(:,1);
line1s(:,2);
line2s(:,1);
line2s(:,2);
% meanb'
% meana'
% fitrange
%% mean and standard desviation
FRETa=frets(1:2:end);

```

```

FRETb=frets(2:2:end);
if isequal(size(FRETA,1),size(FRETb,1))
    FRETd=[FRETA FRETb];
else
    FRETd=NaN(size(FRETA,1),2);
    FRETd(:,1)=[FRETA];
    FRETd(:,2)=[FRETb;NaN];
end
display(FRETd)
for j=1:size(FRETd,1)
    rows=FRETd(j,:);
    FRETstd(j,:)=nanstd(rows);
end
display(FRETstd);
for k=1:size(FRETd,1)
    rows=FRETd(k,:);
    FRETm(k,:)=nanmean(rows);
end
display(FRETm)
%% saving
save([dataname,'_results_v2'],
'line1s','line2s','meanb','meana','frets','fitrange','inds','datap','dataname','FRETd','FRETstd','FRETm')

```

## Anexo 5. Script para ajuste de resultados en base al modelo

```

%% Experimental parameters
cellf=1.19*10^8; % number of cells per mL*OD
nc=0.5*1.6*cellf; % number of cells in OD 1.6
vin=0.973 *10^-15; % intracellular volume
vex=500*10^-6; % extracellular volume
%% data
%phra --> PhrA concentration from dose response experiment
%phran --> PhrA concentration from competition experiment with 10 nM PhrA
%scrn --> SCR-PhrA concentration from competition experiment with 10 nM PhrA
%freta --> fret values from dose response experiment
%fretb --> fret values from intracellular phrA experiment
%fretc --> fret values from extracellular phrA experiment
%fretn --> fret values from competition experiment with 10 nM PhrA
%fretu --> fret values from competition experiment with 10 μM PhrA
% timev=[time intracellular, time extracellular, time dose response, time competition]
timev=[timei10,timee10,6*ones(size(phrad)),6*ones(size(phran)),6*ones(size(phrau))]; % experimental time
vector
% fretm=[intracellular, extracellular, dose response, competition nM, competition μM]
fretmv=[freti10m,frete10m,fretdm,fretnm,fretum]; % mean fret values vector
% phracv=[intracellular, extracellular, dose response, competition nM, competition μM]
phracv=[0.01*ones(size(timei10)),0.01*ones(size(timee10)),phrad,phran,phrau]; % PhrA concentration vector
% srcv=[intracellular, extracellular, dose response, competition nM, competition μM]
srcv=[zeros(size(timei10)),zeros(size(timee10)),zeros(size(phrad)),scrn,scru]; % SCR-PhrA concentration
vector
% ioev=[intracellular, extracellular, dose response, competition nM, competition μM]
ioev=[zeros(size(timei10)),ones(size(timee10)),zeros(size(phrad)),zeros(size(phran)),zeros(size(phrau))]; %
that allow to choose between intracellular or extracellular experiment
% extra vectors
vexv=vex*ones(size(timev)); % extracellular volume vector
timenv=6*ones(size(timev)); % time normalized vector
% vector compilation
X=[phracv;srcv;timev;vexv;timenv;ioev];
%% Parameters degradation rate
gammai=0;
gammae=0;
%% Full model

```

```

fullfit=@(x) (fretmv-fimportpeptide(X,vin,nc,[x(1).*10^-12 x(2) x(3) x(4:5) 0 0])); % this is the function to be
minimized data - modelvalues, x are the fitting parameters
options=optimset('Display','iter','Algorithm','levenberg-marquardt');
[xa,fval,exitflag,output,jacobian]=fsolve(@(x)fullfit(x),[0.01 0.01 20 0.11 0.06 0.09 0.05],options);
xa % estimated parameters
confi=nlparci(xa,fullfit(xa),'jacobian','jacobian'); % simple confidence interval estimate
figure;
hold on
bar([fretmv;fretmv-fullfit(xa)]);
legend('Data','Fitted Model');
hold off
%% Calculate Thresholds for F- Statistics
rssf=sum(fval.^2);
nex=size(X,2); % number of data points
np=size(xa,2); % number of parameters
flevel=icdf('f',0.95,np,nex-np).*np./(nex-np); % 95 % confidence level
flevel2=icdf('f',0.99,np,nex-np).*np./(nex-np); % 99% confidence level
Rssthr95=(flevel+1).*rssf; % 95 % confidence level RSS threshold
Rssthr99=(flevel2+1).*rssf; % 99 % confidence level RSS threshold
%% Estimate Parameter Confidence intervals based on F-Statistics
% each fitting parameters is sequentially minimized or maximized with the restriction that
% RSS < RSS Thr
inds=[1:5,1:5];
% xa = [0.176984172445485    0.071177222490470    43.015142177284815    0.108591052156039
0.067372050572998 0.0900000000000000 0.0500000000000000];
%   optsf=optimset('Algorithm','sqp',...
%       'MaxFunEvals',80000,'Display','iter');
%       optsf=optimset('Algorithm','interior-point',...
%           'MaxFunEvals',80000,'Display','iter');
%       optsf=optimset('Algorithm','active-set',...
%           'MaxFunEvals',80000,'Display','iter');
for i=1:10
    if i<=5
        minfun=@(x) ((x(inds(i)).^-1)) % this function is actually minimized
        fullfit=@(x) (fretmv-fimportpeptide(X,vin,nc,[x(1).*10^-12 x(2) x(3) x(4:5) 0 0])); % Fitting function
        gives the condition
        mycon=@(x) deal((sum(fullfit(x).^2)-Rssthr95),[]) % Calculate condition RSS < RSS thr
        [xfm,fval]=fmincon(@(x)minfun(x),xa,[],[],[],[],[0 0 0 0 0 0 0],[10^4 10^4 10^4 1 1 1
1],@(x)mycon(x),optsf) % Conditional minimization function
        xlo(i)=xfm(inds(i));
        xlos{i}=xfm;
        rssu(i)=sum(fullfit(xfm).^2);
    else
        minfun=@(x) ((x(inds(i)).^-1))
        fullfit=@(x) (fretmv-fimportpeptide(X,vin,nc,[x(1).*10^-12 x(2) x(3) x(4:5) 0 0]));
        mycon=@(x) deal((sum(fullfit(x).^2)-Rssthr95),[])
        [xfm,fval]=fmincon(@(x)minfun(x),xa,[],[],[],[],[0 0 0 0 0 0 0],[10^4 10^4 10^4 1 1 1
1],@(x)mycon(x),optsf)
        xlu(i-5)=xfm(inds(i));
        xlus{i-5}=xfm;
        rso(i-5)=sum(fullfit(xfm).^2);
    end
end
xlo % lower confidence boundary
xlu % upper confidence boundary
%%
save('fittedfret_pablo_v5_final.mat')

```

## Anexo 6. Especificidad del biosensor

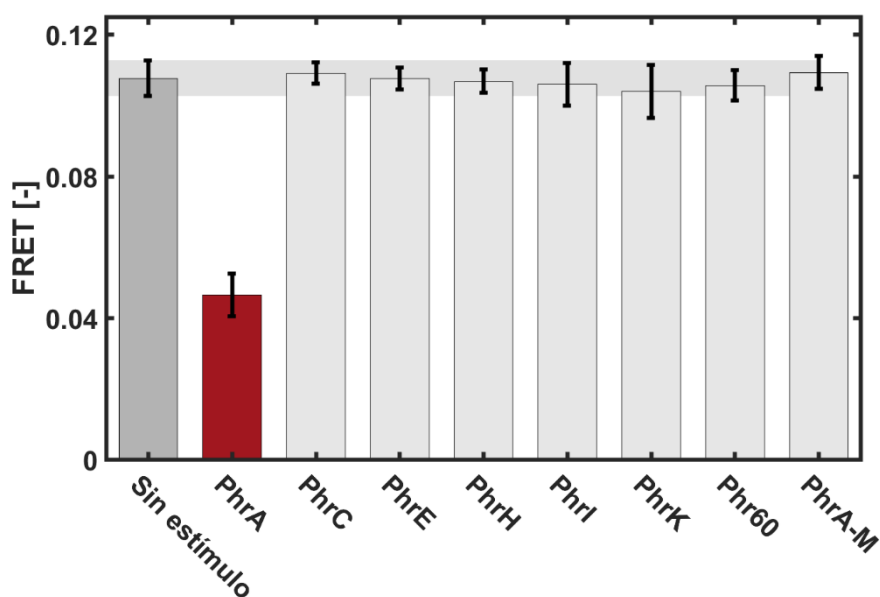


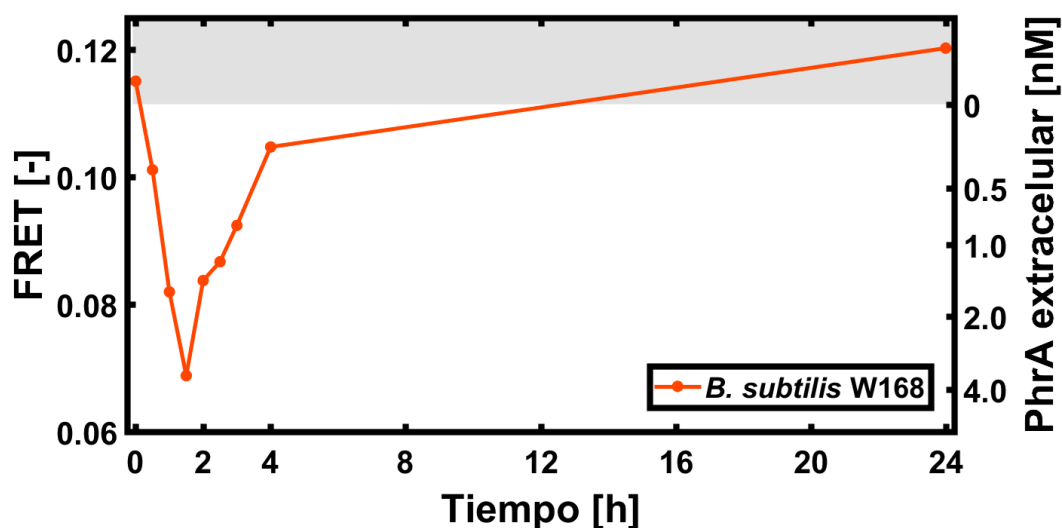
Diagrama de barras que muestra la eficiencia FRET promedio de células sin estímulo y estimuladas con diferentes oligopéptidos de la familia Phr. Todos los péptidos, a excepción de PhrA, no tuvieron efecto en la respuesta FRET pues mantuvieron el mismo nivel de las células sin estimulación. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. **Tiempo de estimulación:** 6 minutos (Figura donada por Heiko Babel).

## Anexo 7. Alineamiento de las secuencias de PhrA en el género *Bacillus*

Organismo	Proteína	Código de acceso	señal para exportación y procesamiento	PhrA
<i>Bacillus subtilis</i> W168	PhrA	NP_389126.1	M K S K W M S G L L L V A V G F S F T Q V M V H A G E T A N T E G K T F H I A A R N Q T	
<i>Bacillus halotolerans</i>	PhrA	WP_044156269.1	M K S K W M T G L L L V A V G F S F T Q V M V H A G E T A D A E G K T F H I A A R N Q T	
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> Y2	PhrA	AFJ61348.1	- - - - M S G L L L V A V G F S F T Q V I G H E S H L E N Q A D G T F H I A A R N Q T	
<i>Bacillus velezensis</i> FZB42	PhrA	ABS73609.1	M K S K L L S G L L L V A V G F S F T Q V I G H E S H L E N Q A D G T F H I A A R N Q T	
<i>Bacillus atrophaeus</i>	hypothetical protein	WP_088116973.1	M K S K L M T G L L L V A V G F S F T Q V M P H A G E T A D K T G N T F D I A A R N Q T	
<i>Bacillus licheniformis</i>	hypothetical protein	WP_075745493.1	M K S K W M S G L L L V A V G F S F T Q V M V H A G E T A D T E G K A F H I A A R N Q T	
<i>Bacillus tequilensis</i>	hypothetical protein	WP_024716407.1	M K S K W M S G L L L V A V G F S F T Q G M V H T G E T A G T D S N T F H I A A R N Q T R	
<i>Bacillus siamensis</i>	hypothetical protein	WP_016936467.1	M K S K L L S G L L L V A V G F S F T Q G I G H E S H L E N Q A D G T F H I A A R N Q T	
<i>Bacillus mojavensis</i>	hypothetical protein	WP_010333880.1	M K S K W M S G L L I V A V V F S F T Q E M V H A G E T A D T E G K T F H I A A R N Q T	
<i>Bacillus cereus</i>	hypothetical protein	CUB25558.1	M K S K W M S G L L L V A I G F S F T Q V M V H A G E T A D A E G K T F H I A A R N Q T	

Las secuencias se tomaron de la base de datos del NCBI (Estados Unidos). La porción funcional del pentapéptido está altamente conservada en varias especies del género *Bacillus*. No obstante, en muchos de ellos aún no se conoce la función exacta del péptido ni se ha asignado un nombre.

### Anexo 8. Cinética de producción de PhrA de *B. subtilis* W168



Diagra de puntos que muestra la eficiencia FRET promedio de dos réplicas biológicas de cultivos esporulantes de *B. subtilis* W168. El eje Y derecho muestra la concentración de PhrA en el sobrenadante calculada con el modelo. Posterior a la cuarta hora la producción de PhrA cesa completamente. La zona gris tenue denota la eficiencia FRET correspondiente a una concentración extracelular de PhrA de 0 nM. **Tiempo de estimulación:** 21 minutos

### Anexo 9. Cepa mutante OppA-deficiente

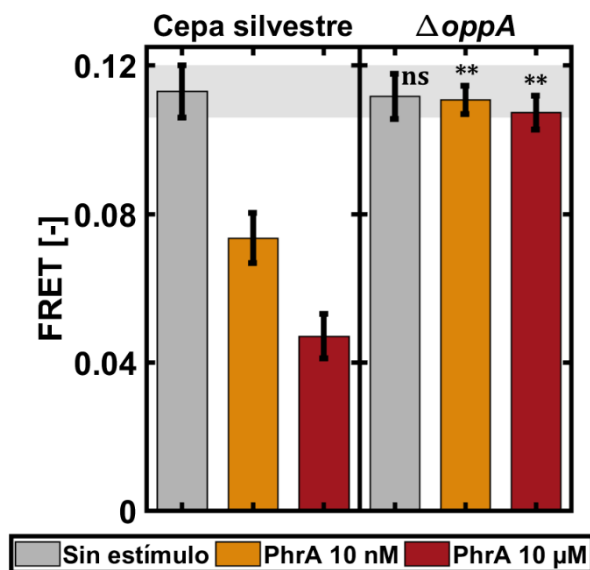


Diagrama de barras que muestra la eficiencia FRET promedio de células sin estímulo y estimuladas con PhrA 10 nM y PhrA 10 μM de dos cepas de *B. subtilis*: cepa silvestre y mutante OppA. La cepa mutante muestra resistencia a la estimulación con PhrA. Ambas cepas no exhiben diferencias significativas en la eficiencia FRET sin estímulo ( $p=0.58$ ). Por otro lado, las diferencias fueron altamente significativas al comparar la eficiencia FRET con estímulo PhrA 10 nM ( $p<0.01$ ) y PhrA 10 μM ( $p<0.01$ ) de ambas cepas. De la misma manera, al comparar la respuesta de la cepa silvestre sin estímulo y la cepa mutante con y sin estímulo no se hallaron diferencias significativas ( $p=0.06$ ). Las franjas gris, amarilla y roja indican el nivel de eficiencia FRET de la cepa silvestre. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. **Tiempo de estimulación:** 6 minutos. **Pruebas estadísticas:** T-Student, ANOVA de una vía

## Anexo 10. Sobreexpresión de la peptidasa PepF

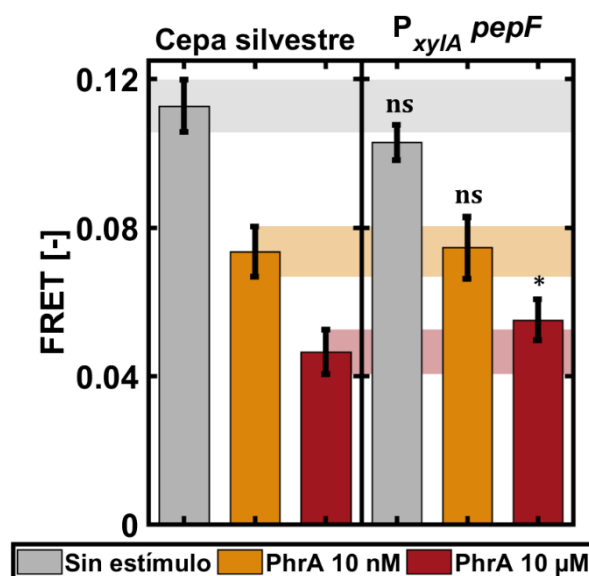


Diagrama de barras que muestra la eficiencia FRET promedio de células sin estímulo y estimuladas con PhrA 10 nM y PhrA 10 μM de dos cepas de *B. subtilis*: cepa silvestre y con sobreexpresión de *pepF*. Esta cepa exhibe una respuesta FRET ligeramente mayor al nivel de la cepa silvestre en la estimulación saturante de PhrA. Ambas cepas mostraron diferencias significativas en la eficiencia FRET con estímulo PhrA 10 μM ( $p=0.02$ ). Por otro lado, el nivel de las células sin estímulo y con estímulo PhrA 10 nM de ambas cepas fue el mismo ( $p>0.31$ ). Las franjas gris, amarilla y roja indican el nivel de eficiencia FRET de la cepa silvestre. Las barras de error corresponden a la desviación estándar. **Tiempo de estimulación:** 6 minutos. **Prueba estadística:** T-Student

## Anexo 11. Script para la cuantificación de PhrA en sobrenadantes de cultivos esporulantes

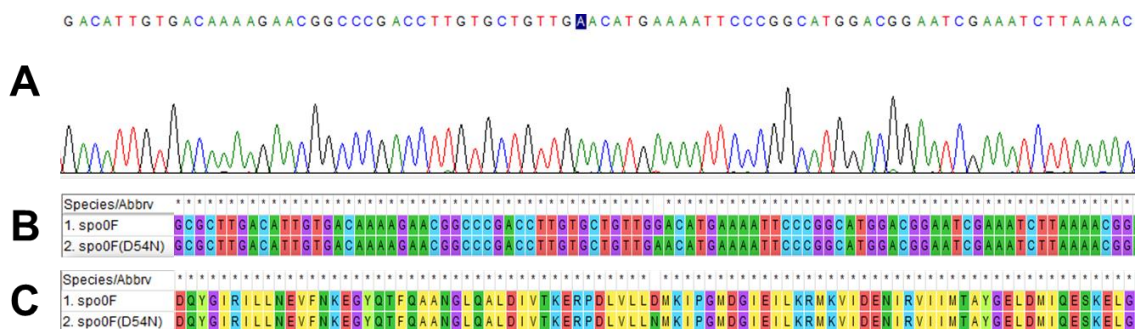
```
%% load parameters
data=load('fittedfret_pablo_v5_final','xa');
parameters=data.xa;
clear data
parameters(1)=parameters(1)*10^-12;
%% calculation of intracellular concentration
for i=1:length(fretamym)
syms x
eqn=fretamym(i) == parameters(4)-(parameters(5)*(x./(parameters(3)+x)));
solx=vpasolve(eqn,x);
ciaamy(i)=solx;
end
clear solx
for i=1:length(fretamym)
syms x
eqn=fretwtm(i) == parameters(4)-(parameters(5)*(x./(parameters(3)+x)));
solx=vpasolve(eqn,x);
ciawt(i)=solx;
end
clear solx
for i=1:length(fretamym)
syms x
eqn=fretphram(i) == parameters(4)-(parameters(5)*(x./(parameters(3)+x)));
solx=vpasolve(eqn,x);
ciaphra(i)=solx;
```

```

end
clear solx
%% calculation of extracellular concentration
vex=2000*10^-6;
cellf=1.19*10^8;
nc=0.5*1.6*cellf;
vin=0.973 *10^-15;
gammae=0;
gammai=0;
ceaamy=ec50(21,parameters(1),parameters(2),nc,vex,vin,ciamy);
ceawt=ec50(21,parameters(1),parameters(2),nc,vex,vin,ciawt);
ceaphra=ec50(21,parameters(1),parameters(2),nc,vex,vin,ciaphra);

```

## Anexo 12. Verificación de mutagénesis puntual dirigida (D54N)



**A:** Resultado de secuenciación del plásmido EIB-546. La base con la mutación deseada está encerrada en un cuadrado azul. **B:** Alineamiento de la secuencia de ADN nativa de Spo0F con la obtenida de la secuenciación. **C:** Alineamiento de la secuencia peptídica nativa de Spo0F con la secuencia peptídica predicha según el resultado de la secuenciación. La ausencia de asterisco (\*) denota la mutación deseada. Alineamientos realizados en el programa Mega7.





## Anexo 13. Continuación...

**Tabla 2. Resultados de la cinética intracelular.** Los datos corresponden a los experimentos realizados por Heiko Babel y Pablo Naranjo. La información se incluyó en la variable FRET<sub>i</sub>10 utilizada para el ajuste (**Anexo 5**)

Tiempo de estimulación (min)								
0	1	1.5	2	2.5	3	6	11	21
0.0983	0.0946	0.0826	0.0806	0.0715	0.0796	0.0705	0.0658	0.0631
0.1262	0.1018	0.0783	0.0870	0.0728	0.0819	0.0736	0.0695	0.0758
0.1170	0.1061	0.0794	0.0840	0.0802	0.0806	0.0730	0.0669	0.0702
0.1049	0.0949	0.0763	0.0746	0.0785	0.0709	0.0673	0.0664	0.0626
0.0940	0.0819	0.0977	0.0696		0.0663	0.0757	0.0666	0.0664
0.1060	0.0892	0.0949	0.0728		0.0700	0.0709	0.0742	0.0694
0.1101	0.0903		0.0812		0.0754	0.0721	0.0716	0.0717
0.1097	0.0927		0.0804		0.0784	0.0732	0.0709	0.0721
0.1045	0.0975		0.0855		0.0766	0.0622	0.0729	0.0717
0.1038	0.0957		0.0818		0.0757	0.0626	0.0613	0.0725
0.1054	0.0922		0.0735		0.0688	0.0712	0.0604	0.0599
0.1054	0.0944		0.0714		0.0699	0.0701	0.0625	0.0616
0.0985	0.0941		0.0717		0.0802	0.0767	0.0705	0.0642
0.1029	0.0889		0.0737		0.0750	0.0722	0.0700	0.0647
0.1200	0.1060		0.0850		0.0789	0.0817	0.0715	0.0604
0.1203	0.1062		0.0833		0.0790	0.0814	0.0769	0.0598
0.1177	0.1076		0.0842		0.0869		0.0750	0.0704
0.1168	0.1060		0.0835		0.0858			0.0754
0.1192	0.1083		0.0919					
0.1180	0.1096		0.0923					

**Tabla 3. Resultados de la cinética extracelular.** Los datos corresponden a los experimentos realizados por Heiko Babel y Pablo Naranjo. La información se incluyó en la variable FRET<sub>e</sub>10 utilizada para el ajuste (**Anexo 5**)

Tiempo de extracción del sobrenadante (min)						
0	1	2	3	6	11	21
0.0763	0.0819	0.0956	0.0885	0.0935	0.1004	0.1072
0.0828	0.0838	0.0985	0.0921	0.1028	0.1147	0.1045
0.0697	0.0660	0.0972	0.0808	0.0941	0.0984	0.1090
0.0814	0.0839	0.0986	0.1014	0.1097	0.1186	0.1167
0.0618	0.0843	0.0882	0.0979	0.1004	0.1011	0.1034
0.0660	0.0828	0.0881	0.0953	0.0991	0.0980	0.1030
0.0833	0.0848	0.1016	0.1007	0.1030	0.1010	0.1066
0.0820	0.0767	0.0997	0.0970	0.1027	0.1020	0.1005
0.0796	0.0728	0.0961	0.0941	0.0982	0.0990	0.1056
0.0809	0.0748	0.0976	0.0923	0.1006	0.0984	0.1093
	0.0878		0.1069	0.1114	0.1163	0.1189
	0.0845		0.1068	0.1125	0.1125	0.1195
	0.0828		0.1019	0.1035	0.0943	0.1152
	0.0830		0.1012	0.1026	0.1119	0.1159

## Anexo 13. Continuación.

**Tabla 4. Resultados del experimento de competición a nivel de internalización con PhrA 10 nM.** Los datos corresponden a los experimentos realizados por Pablo Naranjo. La información se incluyó en la variable FRETn utilizada para el ajuste (**Anexo 5**)

PhrA mutado [ $\mu$ M]										
0	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10	20	50	100
0.0659	0.0657	0.0762	0.0703	0.0898	0.0947	0.1097	0.1020	0.1045	0.1082	0.1111
0.0670	0.0647	0.0736	0.0702	0.0836	0.0914	0.1094	0.1033	0.1024	0.1081	0.1091
0.0732	0.0761	0.0758	0.0767	0.0890	0.1000	0.1078	0.1072	0.1080	0.1109	0.1101
0.0750	0.0771	0.0793	0.0761	0.0887	0.0962	0.1047	0.1095	0.1073	0.1099	0.1101
0.0736	0.0780	0.0805	0.0682	0.0927	0.0836	0.1164	0.1110	0.1018	0.1137	0.1066
0.0714	0.0772	0.0805	0.0664	0.0895	0.0808	0.1159	0.1112	0.0979	0.1172	0.1071
0.0802	0.0698	0.0772	0.0811	0.0855	0.1002	0.1098	0.1060	0.1121	0.1137	0.1192
0.0801	0.0668	0.0748	0.0811	0.0883	0.0992	0.1078	0.1028	0.1117	0.1151	0.1178
0.0632	0.0788	0.0793	0.0830	0.0940	0.0991	0.1138	0.1145	0.1137	0.1090	0.1163
0.0612	0.0755	0.0794	0.0779	0.0825	0.0982	0.1117	0.1086	0.1129	0.1098	0.1180
0.0760	0.0797						0.1129			0.1165
0.0787	0.0773						0.1101			0.1124
0.0769										
0.0736										
0.0764										
0.0759										
0.0792										
0.0749										
0.0786										
0.0800										

**Tabla 5. Resultados del experimento de competición a nivel de internalización con PhrA 10  $\mu$ M.** Los datos corresponden a los experimentos realizados por Pablo Naranjo. La información se incluyó en la variable FRETu utilizada para el ajuste (**Anexo 5**)

PhrA mutado [ $\mu$ M]						
0	0.01	0.1	1	10	20	100
0.0442	0.0418	0.0440	0.0430	0.0449	0.0429	0.0419
0.0452	0.0462	0.0459	0.0440	0.0431	0.0436	0.0433
0.0447	0.0487	0.0430	0.0363	0.0435	0.0479	0.0523
0.0427	0.0475	0.0395	0.0411	0.0421	0.0418	0.0519
0.0438		0.0479	0.0455	0.0504	0.0443	0.0430
0.0461		0.0452	0.0448	0.0498	0.0452	0.0475
0.0509		0.0479	0.0522	0.0532	0.0489	0.0494
0.0472		0.0513	0.0529	0.0465	0.0500	0.0482
0.0478		0.0445	0.0478	0.0476	0.0444	0.0498
0.0464		0.0508	0.0460	0.0455	0.0467	0.0506

#### Anexo 14. Valores de eficiencia FRET utilizados para las figuras

**Tabla 1. Resultados de especificidad y sensibilidad.** A partir de estos datos de eficiencia FRET se calculó el promedio y la desviación estándar que se muestran en la **Figura 13**.

Sin estímulo	Estímulo		
	PhrA 10 nM	PhrA 10 $\mu$ M	PhrA-M 20 $\mu$ M
0.1069	0.0676	0.0434	0.1086
0.1218	0.0777	0.0443	0.1057
0.0986	0.0549	0.0261	0.1076
0.1147	0.0768	0.0381	0.1050
0.1097	0.0813	0.0478	0.1155
0.1100	0.0688	0.0424	0.1162
0.1231	0.0903	0.0657	0.1210
0.1139	0.0699	0.0422	0.1189
0.1126	0.0708	0.0379	0.1176
0.1006	0.0677	0.0377	0.1156
0.1112	0.0600	0.0459	0.1165
0.1237	0.0752	0.0431	0.1158
0.1006	0.0749	0.0562	0.1183
0.1106	0.0725	0.0504	0.1147
0.0917	0.0762	0.0565	0.1121
0.1046	0.0808	0.0389	0.1084
0.1073	0.0639	0.0457	0.1112
0.1092	0.0604	0.0432	0.1077
0.1143	0.0783	0.0457	0.1165
0.1108	0.0776	0.0433	0.1161
0.1124	0.0754	0.0421	
0.1118	0.0757	0.0395	
0.1117	0.0705	0.0517	
0.1099	0.0736	0.0485	
0.1145	0.0730	0.0450	
0.1131	0.0673	0.0504	
0.1215	0.0757	0.0441	
0.1203	0.0709	0.0442	
0.1193	0.0721	0.0458	
0.1156	0.0732	0.0437	
0.1208	0.0622	0.0433	
0.1181	0.0626	0.0446	
0.1198	0.0712	0.0504	
0.1188	0.0701	0.0504	
0.1166	0.0767	0.0519	
0.1187	0.0722	0.0499	
0.0983	0.0817	0.0492	
0.1262	0.0814	0.0531	
0.1170	0.0763	0.0562	
0.1049	0.0828	0.0543	
0.0940	0.0697	0.0466	
0.1060	0.0814	0.0502	
0.1101	0.0618	0.0515	
0.1097	0.0660	0.0522	

**Anexo 14.** Continuación...**Tabla 1.** Continuación...

Sin estímulo	Estímulo		
	PhrA 10 nM	PhrA 10 $\mu$ M	PhrA-M 20 $\mu$ M
0.1045	0.0833	0.0442	
0.1038	0.0820	0.0452	
0.1054	0.0796	0.0447	
0.1054	0.0809	0.0427	
0.0985	0.0659	0.0438	
0.1029	0.0670	0.0461	
0.1200	0.0732	0.0509	
0.1203	0.0750	0.0472	
0.1177	0.0736	0.0478	
0.1168	0.0714	0.0464	
0.1192	0.0802		
0.1180	0.0801		
0.1056	0.0632		
0.1103	0.0612		
0.1036	0.0760		
0.1131	0.0787		
0.1117	0.0769		
0.1194	0.0736		
0.1259	0.0764		
0.1227	0.0759		
0.1148	0.0792		
0.1200	0.0749		
0.1088	0.0786		
0.1123	0.0800		
0.1126			
0.1084			
0.1115			
0.1145			
0.1133			
0.1085			
0.1057			
0.1100			
0.1191			
0.1150			
0.1172			
0.1227			
0.1209			
0.1202			
0.1203			
0.1168			
0.1174			
0.1205			
0.1071			
0.1081			
0.1095			

## Anexo 14. Continuación...

Tabla 1. Continuación.

Sin estímulo	Estímulo		
	PhrA 10 nM	PhrA 10 $\mu$ M	PhrA-M 20 $\mu$ M
0.1126			
0.1241			
0.1126			
0.1143			
0.1181			
0.1103			
0.1105			

**Tabla 2. Resultados de estimulación del biosensor con sobrenadantes** A partir de estos datos de eficiencia FRET se calculó el promedio y la desviación estándar que se muestran en la **Figura 15**. Los mismos datos del control se exhiben en la **Figura 16**.

Control		<i>B. subtilis</i> W168		<i>B. subtilis</i> $\Delta$ phrA		<i>B. amyloliquefaciens</i> s	
Sin estímulo	PhrA 10 $\mu$ M	0 min	80 min	0 min	80 min	0 min	80 min
0.1279	0.0538	0.1249	0.0890	0.1172	0.1147	0.1203	0.0826
0.1282	0.0531	0.1165	0.0908	0.1165	0.1138	0.1246	0.0825
0.1131	0.0533	0.1194	0.0745	0.1189	0.1172	0.1241	0.0638
0.1234	0.0555	0.1240	0.0713	0.1183	0.1150	0.1279	0.0677
0.1173	0.0536	0.1182	0.0781			0.1157	0.0748
0.1181	0.0554	0.1161	0.0797			0.1234	0.0760
0.1069	0.0414		0.0788				0.0722
0.0981	0.0416		0.0802				0.0744
0.1084	0.0525						
0.1174	0.0527						
0.1208	0.0546						
0.1224	0.0543						
0.1186	0.0537						
0.1228	0.0544						
0.1259	0.0529						
0.1252	0.0524						
0.1025	0.0370						
0.1056	0.0394						
0.1006	0.0350						
0.1006	0.0378						
0.1201	0.0498						
0.1232	0.0513						
0.1134	0.0528						
0.1205	0.0496						
0.1169	0.0491						
0.1205	0.0467						
0.1190	0.0478						
0.1222	0.0480						

## Anexo 14. Continuación...

Tabla 2. Continuación.

0.1188	0.0506
0.1251	0.0508
0.1177	0.0509
0.1194	0.0556

**Tabla 3. Resultados de cinética de producción de PhrA en cultivos esporulantes.** A partir de cada par de datos de eficiencia FRET se calculó el promedio de cada réplica biológica. Las réplicas biológicas se muestran en la **Figura 16**.

Tiempo de extracción del sobrenadante											
0	20	40	60	80	100	120	140	160	180	210	240
<i>B. subtilis</i> W168											
0.1161	0.1123	0.0686	0.0921	0.0890	0.0876	0.0916	0.0802	0.0735	0.1058	0.1084	0.0978
0.1249	0.0908	0.0871	0.0928	0.0908	0.0847	0.0932	0.0938	0.0691	0.0914	0.1059	0.0978
0.1249	0.1123	0.0871	0.0693	0.0745	0.0855	0.0651	0.0753	0.0735	0.1115	0.1056	0.0978
0.1165	0.1211	0.0924	0.0702	0.0713	0.0816	0.0683	0.0704	0.0691	0.0914	0.1059	0.1078
0.1194	0.0971	0.0699	0.0739	0.0781	0.0767	0.0843	0.0802	0.1022	0.0914	0.1111	0.0959
0.1240	0.0908	0.0704	0.0697	0.0797	0.0721	0.0895	0.0844	0.0979	0.0899	0.1084	0.0978
0.1182	0.1076	0.0654	0.0802	0.0788	0.0773	0.0867	0.0933	0.0992	0.1115	0.1059	0.1078
0.1161	0.1033	0.0686	0.0787	0.0802	0.0881	0.0867	0.0938	0.0963	0.1058	0.1056	0.1119
<i>B. subtilis</i> $\Delta$ phrA											
0.1172	0.1261	0.1202	0.1243	0.1147	0.1288	0.1150	0.1274	0.1040	0.1262	0.1120	0.1219
0.1165	0.1231	0.1167	0.1298	0.1138	0.1271	0.1096	0.1255	0.1067	0.1214	0.1136	0.1220
0.1189	0.1246	0.1216	0.1257	0.1172	0.1223	0.1194	0.1205	0.1197	0.1230	0.1176	0.1209
0.1183	0.1205	0.1183	0.1178	0.1150	0.1169	0.1156	0.1215	0.1205	0.1194	0.1155	0.1161
<i>B. amyloliquefaciens</i>											
0.1203	0.1204	0.1186	0.0922	0.0826	0.0810	0.0858	0.0797	0.0950	0.0937	0.0897	0.0767
0.1246	0.1218	0.1146	0.0866	0.0825	0.0860	0.0866	0.0843	0.0836	0.0837	0.1013	0.0837
0.1203	0.1218	0.0838	0.0757	0.0638	0.0729	0.0575	0.0657	0.0725	0.0937	0.1005	0.0790
0.1157	0.1204	0.1186	0.0736	0.0677	0.0694	0.0567	0.0604	0.0726	0.0839	0.1013	0.0767
0.1241	0.1131	0.1103	0.0660	0.0748	0.0619	0.0702	0.0710	0.0836	0.0839	0.0897	0.0790
0.1279	0.1084	0.1198	0.0684	0.0760	0.0577	0.0697	0.0695	0.0809	0.0837	0.0870	0.0767
0.1157	0.1235	0.0786	0.0841	0.0722	0.0657	0.0770	0.0677	0.0950	0.0937	0.1005	0.0827
0.1234	0.1218	0.0838	0.0796	0.0744	0.0630	0.0757	0.0719	0.0884	0.0879	0.1013	0.0837

Anexo 14. Continuación...

**Tabla 4. Resultados de la curva dosis-respuesta.** Cada juego de datos corresponde a una réplica biológica tal como se muestra en la **Figura 17**.

PhrA [nM]														
0	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10	50	100	500	1000	5000	10000	10 <sup>6</sup>
0.1082	0.1121	0.1083	0.1057	0.1036	0.1013	0.0816	0.0749	0.0486	0.0513	0.0433	0.0509	0.0423	0.0457	0.0395
0.1125	0.1097	0.1068	0.1044	0.1014	0.0990	0.0796	0.0725	0.0453	0.0509	0.0434	0.0523	0.0435	0.0432	0.0414
0.1121	0.1104	0.1151	0.1052	0.1102	0.1043	0.0970	0.0762	0.0545	0.0474	0.0405	0.0458	0.0505	0.0457	0.0502
0.1108	0.1095	0.1167	0.1069	0.1135	0.1002	0.0955	0.0808	0.0549	0.0472	0.0521	0.0491	0.0489	0.0433	0.0500
0.1138	0.1116	0.1167	0.0994	0.1091	0.0899	0.0893	0.0639	0.0490	0.0425	0.0488	0.0421	0.0469	0.0421	0.0448
0.1209	0.1033	0.1160	0.0996	0.1103	0.0834	0.0885	0.0604	0.0494	0.0467	0.0476	0.0390	0.0470	0.0395	0.0466
0.1175	0.1121	0.1186	0.1134	0.1158	0.1061	0.0976	0.0783	0.0564	0.0516	0.0535	0.0512	0.0545	0.0517	0.0489
0.1194	0.1171	0.1181	0.1140	0.1156	0.1028	0.0992	0.0776	0.0554	0.0551	0.0559	0.0534	0.0509	0.0485	0.0477
0.1193	0.1178	0.1151	0.1087	0.1132	0.1059	0.0968	0.0754	0.0457	0.0481	0.0468	0.0490	0.0476	0.0450	0.0445
0.1176	0.1145	0.1113	0.1120	0.1159	0.1062	0.0921	0.0757	0.0482	0.0515	0.0484	0.0509	0.0489	0.0504	0.0461



**Anexo 14.** Continuación...**Tabla 6.** Continuación.

<b>PhrA mutado [<math>\mu\text{M}</math>] - PhrA 10 <math>\mu\text{M}</math></b>						
<b>0</b>	<b>0.01</b>	<b>0.1</b>	<b>1</b>	<b>10</b>	<b>20</b>	<b>100</b>
0.0442	0.0418	0.0440	0.0430	0.0449	0.0429	0.0419
0.0452	0.0462	0.0459	0.0440	0.0431	0.0436	0.0433
0.0447	0.0487	0.0430	0.0363	0.0435	0.0479	0.0523
0.0427	0.0475	0.0395	0.0411	0.0421	0.0418	0.0519
0.0438		0.0479	0.0455	0.0504	0.0443	0.0430
0.0461		0.0452	0.0448	0.0498	0.0452	0.0475
0.0509		0.0479	0.0522	0.0532	0.0489	0.0494
0.0472		0.0513	0.0529	0.0465	0.0500	0.0482
0.0478		0.0445	0.0478	0.0476	0.0444	0.0498
0.0464		0.0508	0.0460	0.0455	0.0467	0.0506

**Tabla 7. Resultados del experimento de competición a nivel de receptor.** A partir de estos datos de eficiencia FRET se calculó el promedio y la desviación estándar que se muestran en la **Figura 20**. El número 1 y 2 indica el orden de estimulación.

<b>Sin estímulo</b>	<b>PhrA 10 nM</b>	<b>PhrA-M 20 <math>\mu\text{M}</math> (1)</b>	<b>PhrA 10 nM (2)</b>
0.1216	0.0715	0.1153	0.0782
0.1181	0.0757	0.1119	0.0761
0.1103	0.0665	0.1121	0.0766
0.1115	0.0662	0.1120	0.0762
0.1182	0.0667	0.1119	0.0735
0.1155	0.0646	0.1190	0.0769
0.1021	0.0743	0.1123	0.0618
0.1138	0.0719	0.1122	0.0623

**Tabla 8. Resultados de estimulación del mutante OppA.** A partir de estos datos de eficiencia FRET se calculó el promedio y la desviación estándar que se muestran en el **Anexo 9**. Los datos del control exhibidos en dicho anexo corresponden a los datos de la **Tabla 1** de este anexo.

<b>Sin estímulo</b>	<b>PhrA 10 nM</b>	<b>PhrA 10 <math>\mu\text{M}</math></b>
0.1174	0.1141	0.1098
0.1215	0.1112	0.1107
0.1049	0.1128	0.1109
0.1049	0.1128	0.1109
0.1139	0.1156	0.1113
0.1174	0.1136	0.1084
0.1045	0.1045	0.1045
0.1067	0.1067	0.1067
0.1133	0.1084	0.0989
0.1121	0.1069	0.1004

**Anexo 14.** Continuación...

**Tabla 9. Resultados de estimulación de la cepa que sobreexpresa *pepF*.** A partir de estos datos de eficiencia FRET se calculó el promedio y la desviación estándar que se muestran en el **Anexo 10**. Los datos del control exhibidos en dicho anexo corresponden a los datos de la **Tabla 1** de este anexo.

Sin estímulo	PhrA 10 nM	PhrA 10 $\mu$ M
0.1062	0.0832	0.0572
0.1075	0.0796	0.0617
0.0973	0.0703	0.0496
0.1006	0.0649	0.0516

**Tabla 10. Resultados de estimulación de cepas que sobreexpresan *kinA* y *kinB*.** A partir de estos datos de eficiencia FRET se calculó el promedio y la desviación estándar que se muestran en la **Figura 25**. Los datos del control exhibidos en dicha figura corresponden a los datos de la **Tabla 1** de este anexo.

Sobreexpresión <i>kinA</i>		Sobreexpresión <i>kinB</i>	
Sin estímulo	PhrA 10 $\mu$ M	Sin estímulo	PhrA 10 $\mu$ M
0.1124	0.0494	0.1115	0.0433
0.1122	0.0512	0.1099	0.0378
0.1079	0.0455	0.1086	0.0503
0.1100	0.0504	0.1089	0.0484
0.1104	0.0521	0.1053	0.0457
0.1053	0.0520	0.1040	0.0457
0.1152	0.0503	0.1145	0.0349
0.1146	0.0447	0.1112	0.0376
0.1155	0.0452		
0.1136	0.0453		
0.1123	0.0462		
0.1104	0.0475		
0.1054	0.0521		
0.1080	0.0512		
0.1077	0.0494		

**Tabla 11. Resultados de estimulación de cepas mutantes de *kinA* y *kinB*.** A partir de estos datos de eficiencia FRET se calculó el promedio y la desviación estándar que se muestran en la **Figura 26**. Los datos del control exhibidos en dicha figura corresponden a los datos de la **Tabla 1** de este anexo.

Mutante <i>kinA</i>			Mutante <i>kinB</i>			Mutante <i>kinA kinB</i>		
Sin estímulo	PhrA 10 nM	PhrA 10 $\mu$ M	Sin estímulo	PhrA 10 nM	PhrA 10 $\mu$ M	Sin estímulo	PhrA 10 nM	PhrA 10 $\mu$ M
0.1118	0.0787	0.0457	0.1071	0.0662	0.0429	0.1099	0.0750	0.0458
0.1102	0.0738	0.0479	0.1063	0.0662	0.0434	0.1076	0.0747	0.0459
0.1093	0.0676	0.0425	0.1107	0.0623	0.0494	0.1016	0.0652	0.0398
0.1070	0.0653	0.0445	0.1093	0.0655	0.0499	0.1107	0.0665	0.0407
0.1091	0.0705	0.0531	0.1109	0.0787	0.0485	0.1176	0.0786	0.0489
0.1102	0.0730	0.0552	0.1121	0.0769	0.0478	0.1110	0.0759	0.0497

**Anexo 14.** Continuación.

**Tabla 12. Resultados de estimulación de la cepa resistente a fosforilación.** A partir de estos datos de eficiencia FRET se calculó el promedio y la desviación estándar que se muestran en la **Figura 27**.

<b>Cepa silvestre</b>		<b>Spo0F (D54N)</b>	
<b>Sin estímulo</b>	<b>PhrA 10 <math>\mu</math>M</b>	<b>Sin estímulo</b>	<b>PhrA 10 <math>\mu</math>M</b>
0.1049	0.0644	0.0953	0.0603
0.1074	0.0752	0.0931	0.0670
0.1070	0.0642	0.0936	0.0614
0.1089	0.0588	0.0926	0.0712
0.0846		0.1017	
0.0987		0.0914	

**Tabla 13. Resultados de cinética de producción de PhrA en *B. subtilis* W168.** Estos corresponden al promedio y concentración de PhrA estimada que se muestran en el **Anexo 8**. Los valores en números negativos corresponden a una concentración de 0 nM.

<b>Tiempo de extracción del sobrenadante (min)</b>	<b>Eficiencia FRET promedio (-)</b>	<b>PhrA extracelular estimado (nM)</b>
0	0.1150	-0.11
30	0.1011	0.37
60	0.0820	1.59
90	0.0688	3.49
120	0.0837	1.43
150	0.0867	1.19
180	0.0924	0.81
240	0.1047	0.23
24 horas	0.1202	-0.24