



03088  
Universidad Nacional Autónoma <sup>3</sup> de México

UACPyP · CCH

EXPRESION DEL GEN *lacZ*  
DE *Escherichia coli*  
INTEGRADO EN EL CROMOSOMA  
DE *Bacillus subtilis*

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA  
P R E S E N T A:

MIBB MIGUEL SALVADOR FIGUEROA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1994

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

UNAM



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

**EXPRESION DEL GEN *lacZ*  
DE *Escherichia coli*  
INTEGRADO EN EL CROMOSOMA  
DE *Bacillus subtilis***

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA  
PRESENTA EL  
MIBB MIGUEL SALVADOR FIGUEROA**

**1994**

**DEDICO ESTE TRABAJO A:**

**Maria de Lourdes Adriano Anaya**

Por tú apoyo y por que decidiste compartir conmigo tu vida.

**Ana Lourdes Salvador Adriano y**

**Miguel Salvador Adriano**

Que su sonrisa siempre ilumine mi vida

**Mamá y Papá**

Gracias por la vida que me otorgaron

**A todos mis hermanos**

Por su apoyo

## **AGRADECIMIENTOS**

**AL COMITE DE ASESORES Y EN ESPECIAL AL Dr. RODOLFO  
QUINTERO DIRECTOR DE ESTE TRABAJO.**

**AL Dr FERNANDO VALLE, MAS QUE POR SU APOYO, POR SU  
AMISTAD**

**DE MANERA DESINTERESADA AGRADEZCO A TODAS AQUELLAS  
PERSONAS QUE DE UNA U OTRA MANERA APOYARON LA  
REALIZACION DEL PRESENTE TRABAJO.**

**Que los obstaculos que la vida te ponga no te Impidan llegar a la meta,  
siempre confia en ti. Recuerda que hay que hablar de lo adecuado  
en el momento oportuno y no hablar toda la vida de  
intracendencias y callar cuando se te requiere.  
Nunca te envanezcas de lo que eres,  
siempre se humilde.**

## INDICE

RESUMEN.....	3
INTRODUCCION.....	4
REGULACION DE LA EXPRESION GENETICA EN <i>B. subtilis</i> .....	5
EL ROL DE LOS FACTORES $\sigma$ EN <i>B. subtilis</i> .....	7
EXPRESION DE GENES HETEROLOGOS EN <i>B. subtilis</i> .....	9
USO DE PLASMIDOS REPLICATIVOS.....	10
INESTABILIDAD SEGREGACIONAL.....	11
INESTABILIDAD ESTRUCTURAL.....	12
USO DE VECTORES INTEGRATIVOS.....	14
MECANISMO DE INTEGRACION.....	14
ORIGEN DE LOS VECTORES DE INTEGRACION UTILIZADOS EN <i>B. subtilis</i> .....	16
AMPLIFICACION GENETICA.....	16
ESTABILIDAD DE PLASMIDOS INTEGRATIVOS Y DE SUS ESTRUCTURAS AMPLIFICADAS.....	18
NIVELES DE EXPRESION DE GENES HETEROLOGOS INTEGRADOS EN EL CROMOSOMA DE <i>B. subtilis</i> .....	18
MOTIVOS PARA LA REALIZACION DE ESTE ESTUDIO.....	19
ANTECEDENTES	
USO DE <i>lacZ</i> EN <i>B. subtilis</i> .....	20
REGULACION DEL GEN <i>aprE</i> .....	21
OBJETIVO.....	24
HIPOTESIS.....	24
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	25
RESULTADOS Y DISCUSION.....	26
CONCLUSIONES.....	34
PERSPECTIVAS.....	35
BIBLIOGRAFIA.....	37
ANEXO.....	45

## RESUMEN

Se estudió la expresión del gen *lacZ* de *Escherichia coli* en una cepa de *Bacillus subtilis* que porta el plásmido pAprlac2 integrado en el cromosoma. Para transcribir el gen *lacZ* se utilizó la región reguladora del gen de subtilisina, esta proteína se expresa cuando el crecimiento de *B. subtilis* alcanza la fase estacionaria. Asimismo se utilizó el alelo *sacU32*(Hy) para incrementar la expresión de la  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal). La fusión transcripcional/traducciona fue integrada al cromosoma de *B. subtilis* mediante un evento de recombinación simple. Dicho evento ayuda para la selección de organismos mejores productores de  $\beta$ -gal cuando la concentración de cloranfenicol (Cm) se incrementa en el medio de cultivo. La expresión de la  $\beta$ -gal se incrementó seis veces cuando la concentración de Cm fue aumentada de 5 a 80 mg/l, tanto en la cepa con el alelo *sacU32*(Hy), BIBT-10, como en la cepa silvestre, BIBT-1. La cepa BIBT-10 expresa 30 veces más  $\beta$ -gal que la cepa BIBT-1. Por otro lado, la velocidad de crecimiento de los microorganismos, así como la biomasa producida, decrece conforme la concentración del Cm se incrementa. Ninguna de las cepas fue capaz de crecer en presencia de 100 mg de Cm/l. La expresión de  $\beta$ -gal se mantuvo constante por al menos 50 generaciones cuando la cepa BIBT-10 se creció en lotes secuenciales en ausencia de Cm. La expresión de  $\beta$ -gal no se afectó cuando la cepa BIBT-10 se cultivó en fermentador de 14 litros en ausencia de Cm. La cepa adaptada en 5 y 20 mg de Cm/l tiene una copia del plásmido, mientras que la cepa adaptada a 40 y 60 mg de Cm/l tiene dos copias del plásmido

## SUMMARY

The expression of *lacZ* gene from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis* strain, carrying plasmid pAprlac2 integrated into the chromosome was investigated. *B. subtilis* produces the  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) when the culture reaches the stationary phase. The regulatory region of the gene coding for subtilisin was used to transcribe the *E. coli lacZ* gene. A *sacU32*(Hy) allele was utilized to increase gene expression. The transcriptional/translational fusion was inserted into the *B. subtilis* chromosome by a single cross-over event to allow the selection for better  $\beta$ -gal producers. The insertion was selected by isolating cells that could grow in higher chloramphenicol (Cm) concentrations. When the Cm concentration was increased from 5 to 80 mg/l,  $\beta$ -gal expression increased six-fold in BIBT-1 and BIBT-10 strains and the specific growth rate and biomass production decreased. The BIBT-10 strain consistently produced 30 times more  $\beta$ -gal than the BIBT-1 strain. Both strains were unable to grow in the presence of 100 mg of Cm/l. When the BIBT-10 strain was grown in the absence of Cm,  $\beta$ -gal expression was maintained constant for at least 50 generations. The  $\beta$ -gal expression was not affected when the BIBT-10 strain was cultured in a 14-l fermentor. We found that the BIBT-10 strains selected in 5, 10 and 20 mg of Cm/l carried one copy of the plasmid. The BIBT-10 strains selected in 40 and 60 mg of Cm/l carried two copies of the plasmid.

## INTRODUCCION

*Bacillus subtilis* es una bacteria gram-positiva del suelo, que oxida una amplia variedad de compuestos orgánicos simples y crece rápidamente (con tiempos de duplicación del orden de 20 minutos, en medios de cultivo ricos, hasta una hora o más, en medios mínimos a 37 °C), siendo un microorganismo aerobio estricto (Harwood y Archivald, 1990).

*B. subtilis*, como todos los miembros del género *Bacillus*, se diferencia en una spora resistente al calor, a la desecación y a la radiación, bajo condiciones de crecimiento desfavorables. (p. ej. limitación de nutrientes) (Seaward, et al., 1976). La spora y el proceso multietapa mediante el cual se desarrolla, ha sido objeto de intensos estudios, como un ejemplo de diferenciación celular.

El conocimiento de la biología molecular de este organismo es el más avanzado entre las bacterias gram-positivas y solo es superado por el de *Escherichia coli* en toda la microbiología (Harwood y Archivald, 1990).

Con el continuo desarrollo de la tecnología del DNA recombinante (Ferrari y Hoch, 1989), y el de una gran variedad de sistemas hospedero-vector (Mountain, 1989), la importancia académica e industrial de *B. subtilis* continúa en crecimiento. Adicionalmente, *B. subtilis* está reconocido como de "uso seguro", un estatus atractivo si se le utiliza para producir materiales diseñados para el consumo humano (Priest, 1989).

La evolución de *B. subtilis* para persistir en el suelo, donde los

nutrimentos son escasos y el crecimiento es lento, ha equipado a este microorganismo con un amplio espectro de respuestas para impedir las limitaciones nutricionales. Estas respuestas incluyen la derrepresión de enzimas involucradas en el incremento de las funciones catabólicas, la respuesta estricta, la competencia, la quimiotaxis, la movilidad asociada y la producción de antibióticos y de varias enzimas hidrolíticas.

La derrepresión de las enzimas requeridas para incrementar las funciones catabólicas incluyen a sistemas tales como el del ciclo de los ácidos tricarbónicos (Hanson y Cox, 1967) y los sistemas enzimáticos para la utilización de nitrógeno (Fisher y Sonenshein, 1991). La respuesta estricta es una reacción global para la limitación de aminoácidos que reprime la síntesis de RNA, incrementa la velocidad de reutilización de las proteínas unidos a una amplia variedad de ajustes metabólicos (Freese y Heinze, 1984). La competencia se refiere a la habilidad de *B. subtilis* para tomar DNA exógeno y ser genéticamente transformada (Dubnau, 1991). La quimiotaxis y el desarrollo flagelar facilitan la búsqueda de nutrientes (Ordal, et al., 1985). La producción y excreción de antibióticos sirve para limitar la competencia por los nutrientes de otros microorganismos. Mientras que la excreción de varias enzimas hidrolíticas pueden catalizar la hidrólisis, en unidades más pequeñas y más fácilmente metabolizables, de nutrientes poliméricos.

La línea divisoria entre adaptación y diferenciación, en una spora, es muy nebulosa y puede ser considerada como un continuo de

respuestas celulares ó mecanismos dirigidos a escapar tanto de la limitación de nutrimentos como de la formación de la espora. Por lo tanto, se puede considerar al proceso de adaptación como un punto crítico para la productividad ya que es en este período y antes de la diferenciación que muchos productos son elaborados (Priest, 1989).

La diferenciación de *B. subtilis* en una espora después de la limitación por nutrimentos ha servido a la biología para estudiar los fenómenos de diferenciación celular (Losick y Stragier, 1992). La esporulación se ha dividido en siete etapas, basadas en los cambios citológicos que ocurren durante la formación de la espora. Las etapas son numeradas utilizando números romanos, 0 - VII.

Cuando *B. subtilis* se crece en medio rico, el proceso de esporulación requiere entre seis y ocho horas y es equivalente al tiempo, en horas, en que el cultivo alcanza la fase estacionaria. La figura 1 muestra el ciclo de vida de *B. subtilis*. Como se puede ver, las células vegetativas se septan y dividen centralmente, para producir dos células más o menos idénticas. En contraste, en el período temprano de esporulación ocurre una forma modificada de división celular, donde la septación ocurre cerca de un polo de la célula y cada compartimento recibe un cromosoma (Errington y Wake, 1991).

Entre la etapa 0 y la etapa II ocurren muchos de los eventos de la respuesta adaptativa. Si esta estrategia tiene éxito, el crecimiento vegetativo continúa, si no es así, la diferenciación continúa.

En la transición de la etapa II a la etapa III, la célula madre engulle a la

proespora, para formar lo que es esencialmente, una célula dentro de otra célula. La direccionalidad de ambas membranas es opuesta. Las membranas pueden tener comunicación intercompartamental específica (Higgins y Piggot, 1992).

La etapa III es considerada como la etapa donde el proceso de esporulación es inminente, ya que el enriquecimiento del medio de cultivo en este punto no revierte el proceso. Más allá de la etapa III, distintos programas de expresión genética ocurren tanto en la célula madre como en la espora en desarrollo (Losick y Stragier, 1992), culminando con la lisis de la célula madre y la liberación de la espora (Freese y Heinze, 1984).

#### REGULACION DE LA EXPRESION GENETICA EN *B. subtilis*.

La regulación de la expresión genética bacteriana ocurre a nivel de la transcripción y el modelo del operón ha servido como paradigma apropiado para este fin. El concepto de operón se ha ampliado para incluir los controles positivo y negativo de la iniciación de la transcripción, la atenuación de la transcripción, la antiterminación y el control post-transcripcional.

Los reguladores de la iniciación de la expresión genética que actúan positivamente se pueden dividir en dos grupos: aquéllos que se enlazan a la polimerasa de RNA ( $RNA_{pol}$ ), los factores sigma ( $\sigma$ ) y aquellas proteínas que se enlazan a secuencias específicas del DNA. Sin embargo, los  $\sigma$  tienen contacto secuencia específica con el DNA y los activadores que enlazan al

DNA probablemente contacten a la  $RNA_{pol}$ . Por otro lado, los reguladores negativos de *B. subtilis* que se han caracterizado son proteínas que se enlazan a secuencias específicas del DNA.

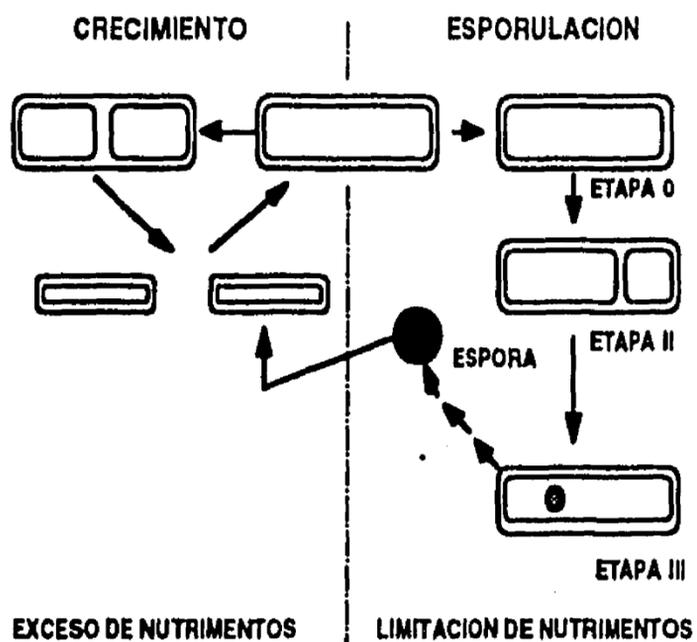


Figura 1. Ciclo de vida de *Bacillus subtilis*.

La  $RNA_{pol}$  de *B. subtilis*, como la de otras bacterias, está compuesta por varias subunidades proteicas. Dos unidades  $\alpha$ , una  $\beta$  y una  $\beta'$ , estructurando lo que se conoce como el corazón ("core") de la  $RNA_{pol}$ . La asociación de un  $\sigma$  con el corazón de la  $RNA_{pol}$  forma lo que se conoce como holoenzima. Los  $\sigma$  gobiernan la especificidad de la interacción  $RNA_{pol}$ -promotor; por tanto cada tipo de  $\sigma$  dirige a la holoenzima a diferentes promotores.

El corazón de la  $RNA_{pol}$  se enlaza al DNA en forma no específica. Sin

embargo, con la formación de la holoenzima, el enlace se efectúa en el promotor, en una secuencia de nucleótidos que reconoce  $\sigma$ . En muchos casos la secuencia nucleotídica de los promotores que reconoce la misma holoenzima son similares en dos regiones bien definidas. Estas regiones, de cinco a ocho pares de bases (pb) están centradas alrededor de la base 10 y de la base 35, arriba del sitio de iniciación de la transcripción. Las secuencias consenso para los promotores que son utilizados por cada holoenzima de *B. subtilis* se muestran en la Tabla I.

TABLA I. Secuencias consenso utilizadas por las diferentes holoenzimas en *B. subtilis*\*

Holoenzima	Función	Secuencia Consenso	
		-35	-10
$RNA^A_{pol}$	Crecimiento	TTGACA	TATAAT
$RNA^B_{pol}$	Desconocido	AGGNTT	GGNATTGNT
$RNA^C_{pol}$	Desconocido	AAATC	TANTGNTTN
$RNA^D_{pol}$	Síntesis de flagelo	CTAAA	CCGATAT
$RNA^E_{pol}$	Etapa II esporulación	GAANAANT	CATATT
$RNA^F_{pol}$	Etapa II esporulación	DESCONOCIDO	
$RNA^G_{pol}$	Específico		
$RNA^H_{pol}$	endoespora Etapa 0	YGHATR	CAHWHTA
$RNA^K_{pol}$	esporulación Celula madre	CAGGA	GATTWWT
		DESCONOCIDO	

H=A, C o T; R= A o G; W= A o T; Y= C o T

\*Fuente: Moran, C.1992.

Ya que estas secuencias gobiernan la utilización de esos promotores por formas de  $RNA_{pol}$ , que difieren únicamente en su  $\sigma$ , Losick y Pero (1991)

proponen que el  $\sigma$  realiza contacto secuencia específica en esas dos regiones del promotor. Observaciones recientes, mediante la sustitución de un aminoácido en un  $\sigma$  que afecta la especificidad de la holoenzima, soportan esta hipótesis (Zuber et al., 1989).

### EL ROL DE LOS FACTORES $\sigma$ EN *B. subtilis*.

Nueve  $\sigma$  se han aislado en *B. subtilis*.  $\sigma^A$  dirige la transcripción de muchos de los genes necesarios para el crecimiento de *B. subtilis* y es el factor más homólogo a  $\sigma^{70}$  de *E. coli*. (Git, et al., 1985).  $\sigma^A$  es esencial para el crecimiento ya que mutaciones que cambian su especificidad son letales dominantes (Kenney, et al., 1989).  $\sigma^A$  también juega un papel muy importante al inicio del proceso de diferenciación celular. El promotor para el operón *spoIIG* se activa 30 minutos después del inicio de la esporulación (Kenney y Moran, 1987). La secuencia nucleotídica de este promotor es similar a la de los promotores utilizados por  $\sigma^A$  (Kenney, et al., 1988). La mayor evidencia de que  $\sigma^A$  interactúa con este promotor *in vivo* la proveen los estudios de supresión realizados por Kenney, et al (1989).

Al igual que el operón *spoIIG*, el operón *spoIIE* contiene un promotor con secuencias que reconoce  $\sigma^A$  y su transcripción se realiza después del inicio de la esporulación (Guzmán, et al., 1988). Experimentos de supresión con *spoIIE* producen resultados similares a los encontrados con *spoIID* (Moran, et al., 1992). Por lo tanto los

promotores *spoIID* y *spoIIE* representan una clase de promotores que son utilizados por  $\text{RNA}_{\text{pol}}$  conteniendo  $\sigma^A$  después del inicio de la esporulación.

$\sigma^H$  es un factor esencial para el inicio de la esporulación ya que mutaciones en el gen estructural, *spo0H*, interrumpen el proceso antes de que ocurra la septación asimétrica (Dubnau, et al., 1988). Varios promotores que son utilizados por la  $\text{RNA}_{\text{pol}}$  se han identificado. La transcripción de algunos de estos promotores es esencial para la diferenciación celular, pero no para las etapas tempranas de la esporulación.

Se ha encontrado que  $\sigma^H$  es activa antes del inicio de la esporulación. El gen de la fumarasa, *citG*, es transcrito durante la fase exponencial tardía por  $\sigma^H$ . Es probable que  $\sigma^H$  dirija la transcripción de uno o varios genes necesarios para el inicio de la esporulación, en la etapa preestacionaria del crecimiento.

La transcripción de *spo0H* y *spo0E* es parcialmente dependiente de  $\text{RNA}_{\text{pol}}$  (Yamashita, et al., 1986).  $\text{RNA}_{\text{pol}}$  es necesaria para la transcripción de *spoV*. La transcripción de este gen es activada a etapas tempranas del inicio de la esporulación sin embargo, el producto de *spoVG* no se requiere para el desarrollo de la espora sino hasta sus últimos estadios (Rosenbluh, et al., 1981).

El operón *spoIIA* probablemente también sea activado por  $\text{RNA}_{\text{pol}}$  (Wu, et al., 1989).  $\text{RNA}_{\text{pol}}$  también está involucrada en el desarrollo de competencia ya que cepas mutadas en *spo0H* son menos eficientes para ser transformadas (Albano, et al., 1987).

$\sigma^D$  es un factor que dirige la transcripción de algunos genes necesarios para la movilidad. Helman, et al (1988), demostraron que la interrupción del gen estructural de  $\sigma^D$  impide el desarrollo de movilidad aunque no afecta la esporulación. Los promotores de *hag*, el gen estructural de la flagelina (Mirel y Chamberlin, 1989) y un promotor dentro del operón *che* (Zuber, et al., 1989) son promotores que utiliza  $\sigma^D$ .

$\sigma^E$  es esencial para la formación de la endoespora, ya que mutaciones en el gen estructural, *sigE* interrumpen la esporulación en la etapa II. La etapa II de esporulación esta caracterizada por la formación de un septo asimétrico, el cual parte al esporangio en dos células desiguales. Sin  $\sigma^E$ , la célula completa la septación pero no la formación del protoplasto sumergido, conocido como proespora, característico de la etapa III.  $\sigma^E$  se produce dos horas después del inicio de la esporulación.

Solamente unos cuantos genes que transcribe  $RNA^{E}_{pol}$  han sido identificados (Rong, et al., 1986). El producto de uno de esos genes, *spoIID*, es necesario para el desarrollo de la etapa II. *spoIID* no se transcribe en ausencia de  $\sigma^E$  (Rong, et al., 1986). Algunos de los genes que transcribe  $RNA^{E}_{pol}$  contienen promotores múltiples, lo que implica una regulación de su expresión en forma diferencial (que requieran factores proteicos auxiliares o que esten sujetos a represión). Se ha demostrado que *spoIIID*, utilizado por  $RNA^{E}_{pol}$ , es activo exclusivamente en el compartimiento de la célula madre del esporangio

(Kunkel, et al, 1988).

Ya que la producción de  $\sigma^E$  activa varios genes, su transcripción está altamente regulada. El gene estructural para  $\sigma^E$ , *sigE*, es parte del operón *spoIIG* (Kenney y Morgan, 1987). Un segundo gen esencial para la esporulación *spoIIGA* se localiza entre *sigE* y el promotor de este operón. El promotor de *spoIIG* se activa 30 minutos después del inicio de la esporulación y es utilizado por  $RNA^{A}_{pol}$ .

La expresión de  $\sigma^E$  no solo está regulada a nivel transcripcional, sino también a nivel postraduccional (LaBel, et al., 1987). El producto primario de *sigE* es una forma inactiva, conocida como P-31 o pro- $\sigma^E$ . 29 aminoácidos de la terminal amino de pro- $\sigma^E$  son removidos proteolíticamente para dar  $\sigma^E$ .

$\sigma^F$  se produce en las primeras dos horas del desarrollo de la endoespora (Sun, et al., 1989). Es necesario para el procesamiento proteolítico de pro- $\sigma^E$  (Jonas y Handelwang, 1989). Sin embargo, poco se conoce de los genes que transcribe  $RNA^{F}_{pol}$ . El gen estructural para  $\sigma^F$ , *spoIIAC*, es el tercer gen del operón *spoIIA*.

El operón *spoIIA*, que codifica para  $\sigma^F$  y el operón *spoIIG*, que codifica para  $\sigma^E$ , son transcritos al mismo tiempo durante la esporulación. No se conoce por que la célula utiliza dos nuevos  $\sigma$  al mismo tiempo durante la esporulación.

$\sigma^G$  se produce exclusivamente en la proespora después de que ésta es engullida por la célula madre en la etapa III. La  $RNA^{G}_{pol}$  transcribe los genes *ssp* (pequeñas proteínas solubles en ácido),

el gen *gdh* (glucosa dehidrogenasa) y probablemente el gen 0.3. La transcripción de *spoIIIG*, el gen estructural de  $\sigma^G$ , está dirigida por la  $\text{RNA}^{\text{G}}_{\text{pol}}$  (Zheng y Losick, 1990). La expresión autocatalítica de  $\sigma^G$  parece ser una función de la concentración de  $\sigma^G$ . Dos modelos se han propuesto para explicar como se establece la síntesis de  $\sigma^G$ . *spoIIIG* está localizado abajo del operón *spoIIG*. Bajo ciertas condiciones la transcripción de *spoIIG* puede alargarse hasta *spoIIIG* (Karmazyn-Campelli, et al., 1989) y establecer la producción de  $\sigma^G$ . El otro modelo indica que la expresión de *spoIIIG* está regulada por  $\sigma^F$ . No se conoce cómo la expresión de *spoIIIG* se restringe a la proespora.

$\sigma^K$  se sintetiza exclusivamente en el compartimiento de la célula madre. La  $\text{RNA}^{\text{K}}_{\text{pol}}$  transcribe varios genes *cot* (proteínas de cobertura).  $\sigma^K$  juega un papel importante después de la maduración de la espora. La regulación de  $\sigma^K$  está a varios niveles. La expresión de  $\sigma^K$  requiere de un rearrreglo en el DNA (Stragier, et al., 1989). Una pérdida ("deletion") de 42 kilobases de DNA une las regiones que codifican la mitad de la terminal amino, codificado por *spoVCB*, a la mitad que codifica para la terminal carboxílica, codificada por *spoIID* de  $\sigma^K$  (Kunkel, et al., 1990). Un gen dentro de la región deletada, *spoIIC*, codifica una función que es necesaria para esta recombinación sitio específica. Al igual que  $\sigma^E$ ,  $\sigma^K$  es proteolíticamente procesada de un precursor pro- $\sigma^K$ . No se conoce si este proceso juega un rol en la compartimentalización de la función de

$\sigma^K$ . La expresión de  $\sigma^K$  es autocatalítica (Kroos, et al., 1989).

$\sigma^B$  y  $\sigma^C$ , son factores cuyas funciones son desconocidas aunque se han aislado en forma independiente y tienen alguna actividad *in vitro*.

### EXPRESION DE GENES HETEROLOGOS EN *B. subtilis*.

*B. subtilis* es un hospedero apropiado para expresar genes heterólogos. Su capacidad para exportar muchas proteínas hacia el medio de cultivo y las facilidades con que los procesos pueden ser escalados son las razones que soportan la aseveración anterior.

Una gran variedad de vectores se han desarrollado para introducir genes heterólogos en *B. subtilis*. Muchos de esos vectores están basados en replicones derivados de especies como *Staphylococcus aureus*, *B. cereus* y *Streptococcus pneumoniae* y muy pocos son originarios de *B. subtilis*.

La expresión de genes heterólogos en *B. subtilis* puede ser clasificada en expresión directa o expresión de fusión, dependiendo de la configuración de la construcción del gen recombinante. También se puede dividir como expresión intracelular y extracelular, dependiendo de la localización del producto génico. Como resultado, existen por lo menos cuatro diferentes formas de expresión de genes heterólogos en *B. subtilis* (Tabla IIa y IIb).

Una de las razones del porqué *B. subtilis* es un hospedero apropiado para la expresión de genes heterólogos es el conocimiento de su arreglo

cromosomal, el cual ha permitido el desarrollo de un buen sistema genético de transformación, el cual hace fácil la introducción y mantenimiento de genes exógenos. En muchos casos los genes pueden ser introducidos en *B. subtilis* por transformación de células competentes (Dubnau, et al., 1988). Sin embargo, ciertas cepas que portan marcadores genéticos apropiados, como *spo0A*, *sacU<sup>h</sup>*, etc., son difíciles de transformar (Wang, et al., 1989).

Recientemente, la introducción de genes heterólogos, en *B. subtilis* difíciles de transformar, se ha realizado utilizando técnicas de electroporación (Brigidi, et al., 1990), por transducción (Lovett y Ambulos, 1989) o por co-conjugación (Koheler y Thorne, 1987).

#### USO DE PLASMIDOS REPLICATIVOS.

Genes heterólogos pueden clonarse, mantenerse y expresarse desde un plásmido de alto número de copias. La mayor ventaja de utilizar plásmidos como vectores de clonación es su facilidad de manipulación, aunado a la gran variedad de vectores existentes con propósitos de expresión.

Uno de los primeros problemas encontrados en experimentos de recombinación de DNA en *B. subtilis* fué la inestabilidad. Muchos grupos de investigación se han avocado a estudiar los mecanismos que causan dicha inestabilidad. Factores tales como el tipo de vector, el origen de replicación y secuencia del DNA, tamaño del inserto y tipo de hospedero, se han citado como posibles contribuidores a los problemas de inestabilidad. Dos diferentes formas de inestabilidad se han identificado: segregacional, la cual corresponde a la

TABLA IIa. Proteínas heterólogas expresadas en *B. subtilis*. (de procariotes)\*

Proteína Expresada	Forma de Clonación	Origen
$\alpha$ -amilasa	IC	<i>B. amyloliquefaciens</i>
Proteasa alcalina	PI	
Proteasa neutral	PI	
Proteína de membrana	PI	<i>B. brevis</i>
Hemolisina	PI	<i>B. cereus</i>
$\beta$ -lactamasa	PI	
$\alpha$ -amilasa	PI	<i>B. licheniformis</i>
$\alpha$ -amilasa	IC	
Penicilinasas	PI	
CAT-86	PI	<i>B. pumilus</i>
Penicilino V amidasa	PI	<i>B. sphaericus</i>
$\alpha$ -amilasa	PI	<i>B. stearothermophilus</i>
Proteasa neutra (nprT)	PI	
Proteasa neutra (nprM)	PI	
Endoglucanasa A	IC	<i>Clostridium</i>
Endoglucanasa A	PI	
Producto de <i>hisG</i>	PI	<i>E. coli</i>
Producto de <i>ompA</i>	PI	
Producto de <i>ompF</i>	PI	
Fosfatasa alcalina	PI	
CAT	PI	
$\beta$ -lactamasa	PI	
Producto de <i>trp</i>	PI	
Producto de <i>recA</i>	PI	
Producto de <i>xilE</i>	PI	<i>Pseudomonas</i>
Amilomaltosa	PI	
Proteína A	IC	<i>Staphylococcus</i>
Proteína A	PI	
Nucleasa	PI	
Estafilocinasas	PI	
$\beta$ -lactamasa	PI	

IC Integrado en cromosoma; PI Plásmido replicativo

\*Fuente: Wang y Doi, 1992.

pérdida del plásmido por la célula; y estructural la cual está caracterizada por rearrreglos estructurales del plásmido, que muy frecuentemente conllevan a la pérdida del plásmido via deleciones.

**TABLA IIb. Proteínas heterólogas expresadas en *B. subtilis* (de eucariotes)\*.**

Proteína Expresada	Forma de Clonación	Origen
Factor A natriurico	PI	Humano
Reductasa de dihidrofolato	IC	
Hormona del crecimiento	PI	
Interferón $\alpha 2$	PI	
Interferón $\beta$	PI	
Interleucina 1 $\beta$	PI	
Proinsulina	PI	
Lisozima	PI	
Albúmina sérica	PI	
$\alpha$ -amilasa salival	PI	
TPA	PI	
Urogastrona	PI	
Proquimosina bovina	PI	Bovino
Ribonucleasa pancreatica	PI	
Antígeno de la fiebre aftosa	PI	
Antígeno de hepatitis B	PI	
Reductasa de hidrofolato de ratón	PI	Ratón
Interferón $\alpha 7$ de ratón	PI	
Interferón $\beta$ de ratón	PI	
Proinsulina de rata	PI	Rata
Glicoproteína E1 SFV	PI	
Glicoproteína G VSV	PI	

IC Integrado en cromosoma; PI Plásmido replicativo.

\* Fuente: Wang y Doi, 1992.

### INESTABILIDAD SEGREGACIONAL.

La inestabilidad segregacional se puede deber a diversos factores, entre los que se

incluye al tipo de vector, al origen, tamaño y orientación de inserto de DNA; el número de copias del plásmido; el genotipo de la cepa hospedera y las condiciones de cultivo. Estos estudios se han realizado más en *E. coli* que en *B. subtilis* y es posible que los factores que influyen en la inestabilidad segregacional sean comunes.

Jones, et al., (1980) demostraron que plásmidos híbridos, derivados de ColE-1, ColK y RP1, se mantienen en forma estable en cultivo continuo en ausencia de antibiótico, mientras que después de 30 generaciones encontraron células segregantes cuando utilizaban plásmidos derivados del pBR322 y del pHB9. Por otro lado, Noak, et al., (1981) reportaron que plásmidos derivados del pBR322 se mantenían en forma estable en cultivo continuo, bajo limitación de glucosa y amonio, mientras que plásmidos derivados del pBR325 son segregados preferentemente bajo limitación de glucosa.

Muchos plásmidos de *S. aureus*, *B. cereus* y *B. stearothermophilus* se han aislado e introducido en *B. subtilis*, donde se han mantenido en forma estable. Sin embargo, derivados más complejos muestran inestabilidad segregacional. Grandi, et al., (1981) reportaron que aunque los plásmidos pC194 y pS194 se mantenían establemente en *B. subtilis*, ocurría una recombinación entre ellos. El plásmido resultante, pCS194, se perdió a una velocidad de 10% por generación en ausencia de presión de selección.

Después de insertar diferentes tamaños de DNA homólogo y heterólogo en derivados del plásmido pUB110, Bron y Luxen (1985)

demonstraron que su estabilidad estuvo relacionada en forma negativa al tamaño del inserto en *B. subtilis* pero no en *E. coli*. La interferencia de los sitios de enlace a membrana de grandes plásmidos o un requerimiento de más sitios de enlace son algunas de las razones que estos autores dan para explicar la dependencia de la estabilidad con el tamaño del plásmido.

Por otro lado, la orientación del inserto puede afectar la segregación. En ausencia de presión de selección, derivados del pBR322 o del pACYC184 conteniendo el operón *trp* de *E. coli* mostraron varios grados de inestabilidad, dependiendo de la orientación de *trp* y del medio de cultivo utilizado (Skogman, et al., 1983).

El mantenimiento estable de plásmidos de bajo número de copias requiere de un mecanismo apropiado de partición del replicón. En *E. coli* esta función se ha localizado en el locus *par*. Un locus similar a *par* probablemente exista en *B. subtilis*. Chang, et al., (1982) estabilizaron un plásmido bifuncional, *E. coli*-*B. subtilis*, después de introducirle un fragmento de DNA del plásmido de *B. subtilis* pLS11. Los autores interpretaron estos resultados como la estabilización del plásmido por una función *par* normal de *B. subtilis*.

Alonso y Trautner (1985) identificaron un gen, *seg*, que está involucrado en el mantenimiento estable de pC194. Mutaciones en ese gen causan inestabilidad segregacional en el plásmido.

Ya que la inestabilidad segregacional es más crítica en plásmidos de bajo número de copias que en plásmidos de alto número de copias, el control del número es un factor

importante cuando se considera la estabilidad. En plásmidos del tipo ColE el número de copias está regulado negativamente por una molécula de RNA (Cesareni y Banner, 1985). Ano, et al., (1986) estudiaron el control del número de copias del pRBH1 de *B. subtilis*. La secuencia de DNA de la región de replicación de este plásmido es igual al pUB110 excepto en una base. Esta región contiene cuatro promotores, P<sub>1</sub> a P<sub>4</sub>, y una región invertida de 64 pb arriba del gen *repB*. Por analogía con el control de replicación de ColE1, propusieron que una molécula de RNAI, transcrita desde P<sub>1</sub>, actúa como primero para la síntesis de DNA pero es reprimido en el sitio del repetido directo por una molécula de RNAIII, transcrita en la dirección opuesta desde P<sub>3</sub>. Este proceso ("kissing") es estabilizado por la proteína RepB. La sustitución de una base en la estructura de tallo formada por el repetido invertido, ocasiona un incremento, de 42 a 134, en el número de copias de pRBH1.

### INESTABILIDAD ESTRUCTURAL

En contraste con los reportes limitados de la inestabilidad segregacional en *B. subtilis*, el fenómeno de inestabilidad estructural de plásmidos en este hospedero está ampliamente reconocido. El DNA heterólogo es particularmente susceptible a eventos de pérdida. Trabajando con vectores lanzadera *E. coli*-*B. subtilis*, se ha demostrado que el DNA extraño se pierde preferentemente en *B. subtilis*. (Grandi, et al., 1981; Goebel, et al., 1979; Kreft, et al., 1982). Regiones definidas del inserto y regiones que lo flanquean son

frecuentemente expulsados, formando distintas clases de derivados por delección (Grandi, et al., 1981).

Entre los factores que influyen en la estabilidad estructural se encuentran la fuerza del promotor, los rearrreglos durante la replicación del plásmido, via intermediarios de DNA de cadena sencilla y la influencia de secuencias repetidas.

Una clase de evento de pérdida está asociado con la clonación de insertos que portan promotores fuertes. Este fenómeno se ha reportado tanto para *B. subtilis* como para *E. coli*. La inestabilidad asociada con la presencia de promotores fuertes se puede deber a: la transcripción incontrolada de copias multiples de genes que codifican para productos dañinos o letales para la célula (Yang, et al., 1983) y a la ausencia de señales fuertes de terminación (Gentz, et al., 1981).

teRiele, et al., (1986) encontraron que muchos plásmidos, en los que están basados los vectores de *B. subtilis*, se replican via intermediarios de cadena sencilla. Postularon que el DNA de cadena sencilla puede estimular la recombinación y así prevenir la oligomerización de dichos plásmidos. Especularon que la generación de DNA de cadena sencilla se da durante la replicación por un mecanismo de circulo rotatorio similar a la de fagos de DNA de cadena sencilla, como el M13, ó puede ser formado por la replicación tipo asa-D. Así, la inhibición de la síntesis de la cadena retrasada fué dilatada y los concatémeros resultantes fueron resueltos por una topoisomerasa en moléculas de cadena doble y sencilla. Alternativamente, especularon en una tercera opción, que la segregación de una

cadena específica de la molécula doble generan DNA de cadena sencilla, pero no se conocen ejemplos previos.

Gruss, et al., (1987) reportaron que la región requerida para la conversión de DNA de cadena sencilla a doble cadena del plásmido pC194, es una secuencia palindrómica, *palA*. Pérdidas en esta región reducen el número de copias del plásmido incrementándose el número de moléculas de cadena sencilla.

Otra clase de eventos de pérdida ocurre en regiones de DNA flanqueadas por secuencias repetidas (Flock, et al., 1984; Lopez, et al., 1984) y estos rearrreglos son independientes de *recE* (Uhlen, et al., 1981).

Aproximadamente la mitad de las perdidas en la región del promotor de *malM-malX* examinadas por Lopez, et al., (1984) ocurren entre secuencias de repetidos directos de 3 a 13 pb y todas las uniones de esta categoría tienen repetidos directos cercanos adicionales. Los autores sugieren que la secuencia de 11 pb puede ser reconocida por una enzima, parecida a topoisomerasa, que produce las pérdidas.

Albertini, et al., (1985) localizaron pérdidas de 700 a 1000 pb de longitud en un sistema de fusión *lacI-Z* de *E. coli*. La frecuencia de pérdida correlacionó con el tamaño de homología y la mayor pérdida corresponde a la homología más grande (14 de 17 pb). Alterando una base en la región de homología, se reduce la incidencia de pérdidas en un orden de magnitud.

En *B. subtilis*, los eventos de pérdida fueron asociados con una estructura de tallo-asa en el plásmido por Alonso y Trautner (1985) y son independientes de la preferencia de

recombinación del hospedero. Dichos autores llamaron a estas estructuras "generadoras de eventos de pérdida de información genética" y demostraron que regiones de homología entre 1,000 y 3,000 pb estaban involucradas en el evento.

### USO DE VECTORES INTEGRATIVOS.

Recientemente se ha reportado que la integración a cromosoma de genes heterólogos, seguido por amplificación genética, puede ser una alternativa para mantener y expresar genes heterólogos (Fahnestock, et al., 1986; Kalio, et al., 1988; Petit, et al., 1990). En principio, el DNA que se integra puede ser portado en un bacteriófago temperado, como parte de un transposón o como un plásmido integrativo. Sin embargo, muy pocos fagos (con la excepción del fago  $\mu$ ) son apropiados para este propósito, ya que normalmente se integran en un número limitado de sitios en el genoma.

Por otro lado, el uso de plásmidos integrativos ha mostrado ser una herramienta flexible para la construcción y estudio de cepas de *B. subtilis*. Para que un plásmido pueda ser utilizado en forma integrativa se requiere que éste tenga las siguientes características:

- no tener un origen de replicación funcional en el organismo blanco;
- portar una secuencia de DNA homóloga a secuencias en el cromosoma blanco;
- portar un marcador genético de selección, generalmente los genes de resistencia a un antibiótico, funcional en el organismo blanco;

-tener un origen de replicación reconocido por un organismo diferente al organismo blanco, donde se pueda propagar (generalmente *E. coli*), y

-portar un gen de resistencia utilizado para seleccionar en el hospedero de propagación.

Si un vector, teniendo esas propiedades, se utiliza para transformar un organismo blanco, es posible seleccionar transformantes resistentes al antibiótico, las cuales han emergido por que el vector se ha integrado por recombinación homóloga (simple o doble) en el cromosoma hospedero.

Los plásmidos integrativos se han utilizado en muchas bacterias (Gutterson y Kochland, 1983; Mejean, et al., 1981), levaduras (Struhl, 1983; Hinnen, et al., 1978) y en células de mamíferos (Lin, et al., 1985). En los dos primeros grupos de organismos la recombinación se realiza por recombinación homóloga, mientras que en los últimos la recombinación homóloga es menos frecuente.

La frecuencia de transformación está afectada por la frecuencia de entrada del plásmido y por la frecuencia de integración. Sin embargo, la longitud de la secuencia homóloga juega un papel muy importante. O'Kane, et al., (1986) encontró que el número de transformantes por integración variaba considerablemente con el tamaño del fragmento cromosomal utilizado en la ligación.

### MECANISMO DE INTEGRACION.

Varios reportes de literatura involucran eventos de cruce sencilla o doble entre el plásmido y el cromosoma de *B. subtilis*. Duncan, et al., (1978),

Haldenwang, et al., (1980), Niaudet, et al., (1982), Ferrari, et al., (1982), Ferrari, et al., (1983) y Piggot, et al., (1984) demostraron que el evento de recombinación entre el plásmido y el cromosoma ocurre por un mecanismo tipo Campbell y es dependiente de *recE* (Haldenwang, et al., 1980).

El mecanismo tipo Campbell fué postulado primeramente para la integración del fago  $\lambda$  en el cromosoma de *E. coli*. El resultado de un evento de cruza simple es la linearización del DNA de  $\lambda$  dentro del punto de ruptura en el sitio de cruza (*attP*) y la ruptura del DNA de *E. coli* en la misma posición (*attB*). Después de la integración, la secuencia de homología se presenta en dos copias, cada una parcialmente derivada del fago y parcialmente derivada del DNA hospedero. De manera similar, la integración de plásmidos dentro del cromosoma de *B. subtilis* da como resultado la duplicación de la región de homología.

Por otro lado, eventos de doble cruzamiento también pueden realizarse. Young (1983), transformando con una mezcla de ligación, localizó que una gran proporción de transformantes se explicaban mejor mediante un evento de cruza doble, con el consecuente remplazamiento del material cromosomal por el del plásmido. Ferrari, et al., (1983) observaron transformantes que emergían de un evento de cruza doble. Sin embargo, en este caso no hubo pérdida del material cromosómico ya que el plásmido solo tenía una región de homología, y por que las transformantes se crecieron para un evento de remplazamiento genético y no para la resistencia al antibiótico.

La alta frecuencia de cruza dobles obtenidas por Young (1984) y Ferrari, et al., (1983) son importantes, ya que es esperable que los eventos de doble cruza ocurran a una baja frecuencia. Por otro lado, si los sitios de homología no son adyacentes, este tipo de cruza causa pérdida en el cromosoma hospedero y dichas pérdidas pueden ser letales o desventajosas.

Las células competentes de *B. subtilis* tienen actividad de endonucleasa que rompe el DNA transformante en forma aleatoria. Cuando el DNA se internaliza en la célula, lineal o circular, es atacado por las endonucleasas produciendo moléculas linearizadas. Dentro de la célula, una porción del DNA es recircularizado. No se conoce cuanto plásmido permanece en forma lineal después de la internalización. Ya que el DNA lineal puede integrarse por un evento de doble cruza, los datos de Young (1984) y Ferrari, et al., (1983) sugieren una alta relación entre el DNA lineal y el DNA circular dentro de la célula.

Niaudet, et al., (1985) han realizado el único estudio sistemático del mecanismo de inserción de plásmidos integrativos en el cromosoma de *B. subtilis*. Ellos estudiaron la integración de moléculas lineales conteniendo una región central heteróloga flanqueada por regiones homólogas al cromosoma. Demostraron que estas dos regiones deben de tener la misma orientación relativa a las localizadas en el cromosoma. La integración por doble cruzamiento repercutía en una pérdida en el cromosoma y propusieron que la pérdida de un gen(es) esencial produce

una célula merodiploide por la reintegración del gen(es) esencial más el plásmido, en un segundo cromosoma.

#### ORIGEN DE LOS VECTORES DE INTEGRACION UTILIZADOS EN *B. subtilis*.

Los primeros reportes del uso de plásmidos integrativos en *B. subtilis* fueron los de Ehrlich, et al., (1976) y Duncan, et al., (1977), los cuales demostraron que el gen que codifica para la timidilato sintetasa puede integrarse directamente en el cromosoma de ese microorganismo, cuando el gen fue propagado en un plásmido incapaz de replicarse en *B. subtilis*.

Los vectores de integración utilizados en *B. subtilis* se han derivado del pBR322, con la adición de genes de resistencia a antibióticos (usualmente los genes para resistencia a Cm y Km de los plásmidos de *Staphilococcus aureus* pC194 y pUB110) seleccionables en este hospedero. Ferrari, et al., (1982) ligaron el gen *cat* del pC194 en el pBR322, generando el plásmido pJH101. Este plásmido se replica en *E. coli* pero no en *B. subtilis*. Las transformantes pueden seleccionarse por su resistencia a Amp, Tc y Cm en *E. coli* y para Cm en *B. subtilis*. El plásmido pOK4 (O'Kane, et al., 1986) también se derivó como el pJH101 portando además el gen sin promotor de  $\alpha$ -amilasa (*amyE*).

#### AMPLIFICACION GENETICA.

La duplicación y amplificación del material genético se ha identificado

tanto en procariotes como en eucariotes, En *B. subtilis*, se han reportado dos ejemplos de amplificación natural. Uno de ellos está asociado con la producción de protoplastos y la regeneración de colonias de bacilos. En estos experimentos, Wilson y Morgan (1985) aislaron cuatro colonias resistentes a tetraciclina (Tc). Después del tratamiento con enzimas de restricción y de la electroforésis de los fragmentos producidos, encontraron secuencias de DNA amplificadas en tres de los cuatro aislados. Así mismo, analizaron el DNA de 24 colonias regeneradas de protoplastos en ausencia de Tc y no localizaron secuencias amplificadas. Los tres aislados Tc<sup>R</sup>, portando amplificaciones, mostraron inestabilidad después de 30 generaciones de crecimiento en ausencia de Tc. Las células revertantes mostraron pérdida de la secuencia amplificada.

El segundo ejemplo de amplificación natural en *B. subtilis* ocurre en el locus *tmrA*, el cual está asociado a la resistencia a tunicamicina (Tm<sup>R</sup>) e hiperproducción de  $\alpha$ -amilasa (Hashiguchi, et al., 1986). Las observaciones iniciales demostraron que la mutación *tmrA7* fue transferible a células recipientes, mediante transformación, mediada por DNA (Nomura, et al., 1988). Si la selección se realiza para un marcador genético cercano (*arol+*), mas que para *tmrA7*, se observó que algunas de las transformantes, que también heredaban *tmrA7*, producían dos veces más  $\alpha$ -amilasa que la cepa silvestre. Después de exponer a las transformantes a Tm, se observó un aumento de diez veces en la producción de  $\alpha$ -amilasa, con respecto a

la cepa silvestre. La cepa con fenotipo hiperproductor fué inestable ya que después de tres subcultivos la producción de  $\alpha$ -amilasa decayó seis veces. Mediante análisis tipo Southern, demostraron que la región responsable del incremento de resistencia a Tm y del aumento de *amyE* se aumentaba diez veces en las células expuestas a Tm.

Por otro lado, la integración de vectores por el mecanismo tipo Campbell da como resultado una estructura en la que el(los) gen(es) que codifica(n) para el marcador de selección y el(los) gen(es) heterólogo(s) se encuentran flanqueados por repeticiones directas. Si una célula que porta este tipo de estructura se crece en la presencia de concentraciones de antibiótico mayores a las que puede tolerar con una copia del gen, se seleccionan aquéllas que han amplificado dicho gen. Este evento se puede realizar por entrecruzamiento desigual entre las secuencias repetidas en las terminales del DNA integrado. La frecuencia de emergencia de dichas células es de  $10^{-4}$  a  $10^{-6}$  (Jannière, et al., 1985). Las copias múltiples del gen se arreglan en forma secuencial en esas cepas.

Desde la aparición del primer reporte de amplificación de plásmidos integrativos en *B. subtilis* (Saito, et al., 1983), este fenómeno se ha reconocido ampliamente. Saito, et al., (1983) utilizaron el plásmido pUBHA31, compuesto por el pUB110 y un segmento de DNA de *B. subtilis* que forma parte del locus *hisA*. Cuando el plásmido se utilizó para transformar recipientes *hisA1*, algunas de las transformantes, resistentes a Km,

fueron His<sup>+</sup>. El DNA de una de las transformantes fué purificado por gradiente de sacarosa, roto con *EcoRI* y analizado por el método de Southern. Se observaron grandes bandas de hibridación correspondientes a los dos fragmentos del pUBHA31 digerido también con *EcoRI* y un valor del orden de 40 copias fue sugerido por análisis densitométrico.

Young (1983, 1984) reportó la integración y amplificación del plásmido integrativo derivado del pMB9 el cual porta un segmento de DNA que transforma a recipientes *nic38* y *pheA1* de *B. subtilis*. Cuando el DNA de las transformantes fue digerido con enzimas que cortan en la unión del vector y el DNA del hospedero o dentro de la secuencia del hospedero, se estimó un valor entre ocho y nueve copias del vector, en arreglo secuencial.

Albertini y Galizzi (1985), investigaron el comportamiento de un plásmido integrativo (pRHA39, Cm<sup>R</sup>), portando el gen *amyE* de *B. subtilis*. Al igual que los autores anteriores, fueron capaces de demostrar que las transformantes, Cm<sup>R</sup>, fueron fenotípicamente Amy<sup>+</sup>. Sin embargo, una proporción considerable de las transformantes resultaron Amy<sup>-</sup> e hipotetizaron que había ocurrido una conversión génica. Estos autores también demostraron que conforme existe un aumento en el número de copias del gen *amyE*, la cantidad de Amy extracelular también se incrementaba.

Jannière, et al., (1985) estudiaron las propiedades de una colección de cepas de *B. subtilis*, portadoras del plásmido integrativo, que contiene el gen *cat* del pC194 y la resistencia a kanamicina del pUB110. Los plásmidos

fueron integrados en la región *thyB*. Cuando los genes de resistencia no fueron flanqueados por repetidos directos, estos no se amplificaron. En el caso en el que los genes estaban flanqueados por repetidos directos de diferentes longitudes, las estructuras se amplificaron. Cuando la Km se utilizó como agente de selección, se observaron hasta 30 copias de la estructura, obteniendo un posterior incremento hasta 50 copias (7.5% del genoma), cuando la cepa se creció en presencia de amikacina. Cuando el Cm se utilizó como agente de selección, se observaron hasta siete copias de la estructura. Sin embargo, otros investigadores (Sargent y Bennett, 1985) observaron una mayor amplificación (de 1 a 20 copias) cuando la cepa se crece en 5 y 20 mg/l de Cm, respectivamente.

#### **ESTABILIDAD DE PLASMIDOS INTEGRATIVOS Y DE SUS ESTRUCTURAS AMPLIFICADAS.**

Muchos investigadores han comentado la estabilidad de amplificaciones que ellos han estudiado y un amplio espectro de opiniones se han expresado. Sin embargo, hasta muy recientemente, se cuenta con las herramientas analíticas apropiadas para analizar la variación en el número de copias de una región amplificada. Así, existe un hueco de datos analíticos que refuerzan muchas de las conclusiones que se han externado. Después de comparar diversos reportes, la última impresión es de confusión y en algunos de los casos la estabilidad ó inestabilidad de regiones de DNA amplificadas parece ser más una confusión semántica.

Aunque en los plásmidos

replicativos es posible distinguir tanto la inestabilidad estructural como la segregacional, ésta es menos clara en las secuencias amplificadas secuencialmente dentro del cromosoma. La inestabilidad estructural para este tipo de secuencias puede ser definida como un rearrreglo de las secuencias, mientras que la inestabilidad segregacional es definida como el cambio en el número de copias de una secuencia repetida. La inestabilidad estructural no ha sido reportada para *B. subtilis*, portadores de secuencias heterólogas insertadas en el cromosoma, ni para sus amplificaciones.

Por otro lado, aunque las secuencias amplificadas parecen ser inestables, Jannière, et al., (1985) reportaron que una amplificación que porta la resistencia a Km fue mantenida, en un número aproximado de 50 copias por genoma, por 150 generaciones cuando el microorganismo es crecido en un medio no selectivo. Dichos autores reportan una velocidad de segregación de sus cepas de  $10^{-3}$  por generación.

Young (1984) estudió el efecto de la mutación *recE4* en la estabilidad de cepas amplificadas. Los resultados muestran que dicha mutación no afectó la estabilidad, ya que la aparición de segregantes en las cepas con y sin la mutación fué la misma.

#### **NIVEL DE EXPRESION DE GENES HETEROLOGOS INTEGRADOS EN EL CROMOSOMA DE *B. subtilis*.**

Petit, et al., (1990) reportaron la expresión, a niveles altos, de la endoglucanasa A (EGA) de *Clostridium thermocelum* en *B. subtilis*. La unidad de expresión se construyó fusionando la

secuencia del promotor y el péptido señal del gen *sacB*, el gen estructural para la levansacarasa extracelular de *B. subtilis*, con la secuencia que codifica para la EGA madura. La fusión se integró en el cromosoma de *B. subtilis*, flanqueada por secuencias repetidas del pBR322. El plásmido pE194 se insertó adyacente a uno de los repetidos. La amplificación se realizó en dos etapas por selección en alta temperatura (51 °C) y alta concentración de Cm e inducción a 37 °C en ausencia del antibiótico. Bajo esas condiciones la unidad de expresión-amplificación fué amplificada a un nivel de 250 veces por genoma (55 % del cromosoma). Cuando la EPA se indujo con 2 % de sacarosa, se obtuvieron 3.6 unidades de EPA por ml. Este nivel corresponde a un aumento de cuatro veces sobre un sistema de expresión utilizando un plásmido de alto número de copias.

Kalio, et al., (1987) mostraron que una cepa de *B. subtilis*, portando dos copias del gen *amyE* integrado en el cromosoma, produjo la misma cantidad de Amy que una cepa portando el mismo gen en el plásmido pUB110 a 40 copias por células. Sin embargo, la cinética de producción fué diferente, ya que la acumulación de Amy fue más lenta en la cepa con integración, pero su producción duro más tiempo.

Fahnestock, et al. (1986) demostraron que era posible expresar a un alto nivel la proteína A de *Staphylococcus aureus*, cuando se integraba en copia única al cromosoma de *B. subtilis*, siempre y cuando el promotor, la secuencia de unión a ribosoma (Shine-Delgarno), y la secuencia de terminación del gen *spa*, fueran reemplazadas por señales del gen

*amyE*, en caso contrario la construcción resultó inestable.

#### MOTIVOS PARA LA REALIZACION DE ESTE ESTUDIO

La producción de proteínas heterólogas, primordialmente en *E. coli*, ha sido el objetivo de muchos grupos de investigación en el mundo. Los sistemas de expresión utilizando plásmidos replicativos han alcanzado una sofisticación no imaginada hace 10 años. Por otro lado la necesidad de entender el comportamiento de estos sistemas de expresión, en los procesos de crecimiento microbiano, ha impulsado a la tecnología de fermentación para realizar dicho crecimiento con un control mucho más estricto que los procesos que utilizan organismos silvestres o seleccionados por métodos de genética clásica, así como para la generación de sistemas novedosos de crecimiento. El Instituto de Biotecnología de la UNAM no ha estado ajeno a esta corriente de investigación. En los 12 años de vida de este Instituto, un gran esfuerzo se ha realizado para clonar, expresar y producir la hormona insulina humana. De hecho se ha desarrollado toda una estrategia para poder realizar el proceso hasta un volumen de 14 litros. Sin embargo, las cepas recombinantes que se han construido con vectores replicativos han mostrado diferentes grados de inestabilidad.

El proyecto surgió como una alternativa de expresión de genes heterólogos, utilizando la integración a cromosoma y a *B. subtilis* como hospedero, a la clásica vía del uso de vectores replicativos y como organismo

a *E. coli*.

$\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) de *E. coli* fué la proteína seleccionada. La estructura, la secuencia de aminoácidos, las constantes cinéticas y la regulación de la expresión genética de esta proteína son ampliamente conocidas. Así mismo, el ensayo metodológico para determinar la actividad de la enzima es de uso común en el laboratorio.

La selección de *B. subtilis* como un hospedero alternativo a *E. coli* para la producción de proteínas recombinantes se basó en el amplio conocimiento de su sistema genético y en el conocimiento de los sistemas de crecimiento y producción de proteínas nativas. Sin embargo, el principal problema que el uso de *B. subtilis* plantea es que este microorganismo produce una gran variedad de proteasas tanto extra- como intracelularmente lo cual puede limitar la producción de la proteína heteróloga.

Por otra parte, el locus que se utilizó para expresar  $\beta$ -gal en *B. subtilis* fué el de subtilisina (*aprE*.) Este locus se utilizó por ser uno de los más estudiados y por que se activa al inicio del proceso de diferenciación celular de *B. subtilis*. Este gen no requiere la presencia de inductor o de la aplicación de condiciones específicas de proceso para iniciar su transcripción. Ya que la expresión de este gen inicia en la fase preestacionaria del crecimiento, es posible seleccionar una estrategia adecuada para que el microorganismo alcance altas concentraciones celulares en el fermentador y así poder obtener una alta productividad del sistema.

## ANTECEDENTES

### USO DE *lacZ* EN *B. subtilis*..

El gen *lacZ* de *E. coli* se ha utilizado como gen reportero para estudiar la regulación de la expresión de genes específicos de la esporulación, dado que muchos de ellos no muestran una actividad detectable (Zuber y Losick 1983; Stephens, et al., 1984; Piggot, et al., 1985; Ferrari, et al., 1985) Dos tipos de fusión de *lacZ* se han empleado: fusiones traduccionales y fusiones transcripcionales (Errington 1986). La fusión traduccional se construye por unión, en fase, de una forma truncada de *lacZ*, la cual no tiene una parte que codifica para el amino terminal de  $\beta$ -gal, a una región codificadora de un gen de interés. La fusión resultante produce, generalmente, una  $\beta$ -gal activa, cuya actividad es utilizada como un indicador de la traducción del gen blanco.

La fusión transcripcional se construye por la inserción del gen *lacZ*, sin su promotor, en la unidad de transcripción del gen de interés. En este caso, la actividad de  $\beta$ -gal se utiliza como un indicador de la transcripción del gen blanco. Sin embargo este tipo de fusiones requiere de una eficiente traducción. Se ha demostrado que la secuencia Shine-Delgarno (SD) de *lacZ* tiene una baja homología con el 3' del RNA ribosomal 16S (Moran, et al., 1982; Donnelly y Sonenshein 1984) de *B. subtilis*, por lo que la traducción del mensajero es ineficiente. Este problema se ha solucionado mediante el reemplazo del SD del gen *lacZ* por derivados de otros genes que son traducidos eficientemente por *B.*

*subtilis*. Algunos de estos tipos de vectores son derivados de los construidos por Donnelly y Sonenshein (1984), los cuales utilizan las señales de inicio de traducción del gen *trpA* de *E. coli*. Otros son derivados de los vectores construidos por Errington (1984), los cuales contienen las señales de inicio de transcripción del gen *spolIA* de *B. subtilis* y otros más de los vectores construidos por Zuber and Losick (1983) que utilizan las señales de inicio de la traducción del gen *spoVG* (Youngman, et al., 1989).

Por otro lado, Errington (1986) desarrolló un método para integrar en forma directa los genes en secuencia *lacZ-cat* en el cromosoma de *B. subtilis*, utilizando el plásmido pGMO23 y sus derivados. Con estos vectores Errington y colaboradores investigaron la regulación de la expresión de varios operones de esporulación (Errington y Mandelstam, 1986a; Errington y Mandelstam, 1986b; Turner, et al., 1986).

Ya que los vectores construidos por Errington y colaboradores estaban flanqueados por regiones de homología con el DNA hospedero, éstos se integran en forma de copia única, pudiendo destruir la función del gen blanco. Por lo que se requiere que el sistema *lacZ-cat* se integre en el cromosoma en sitios que no afecten la función celular normal.

Para resolver la problemática planteada por los vectores de Errington, Shimotsu y Henner (1986) desarrollaron un nuevo vector de integración para *B. subtilis*. Este vector contiene una fusión *lacZ* y el gen *cat*, flanqueada por fragmentos de DNA que contienen, respectivamente, el 3' y el 5' del gen *amyE*. Este tipo de vector resultó ser útil para estudiar genes de regulación

compleja, como la esporulación y el desarrollo de competencia.

El uso de fusiones transcripcionales, con *lacZ* como reportero, son las de mayor éxito, ya que gracias a ellas se conoce la regulación de muchos de los genes involucrados en la diferenciación celular de *B. subtilis*.

#### REGULACION DEL GEN *aprE*.

*B. subtilis* produce la subtilisina E (SE), cuya secuencia de aminoácidos (aa) es homóloga en un 85% de la subtilisina BPN' de *B. amyloliquefaciens* (Stahl y Ferrari, 1984) y la secuencia del gen estructural tiene un 80% de homología con la proteasa BPN' (Wells, et al., 1983).

La producción de SE inicia en conjunción con el arranque del proceso de diferenciación celular; sin embargo se ha demostrado (Stahl y Ferrari, 1984) que su producción no se requiere para el proceso de esporulación. El traslape de la regulación de estos procesos ha dado como resultado que la transcripción de *aprE* se utilice como modelo para analizar la red regulatoria que establece *B. subtilis* en el proceso de diferenciación (Valle y Ferrari, 1989).

La producción de SE está regulada por represión/supresión catabólica de carbono y nitrógeno (Hanlon, et al., 1982). Se ha demostrado que la producción de SE es mayor cuando la fuente limitante es el nitrógeno (Frankena, et al., 1986). Estos resultados sugieren que la represión por nitrógeno es más fuerte que la represión por carbono. Adicionalmente se ha demostrado el efecto positivo y negativo de la adición de aminoácidos al proceso de producción de SE (Votruba, et al., 1987).

Ya que la producción de SE inicia cuando el microorganismo crece a baja velocidad, se ha demostrado en cultivo continuo (Frankena, et al., 1986) que a bajas tasas de dilución la producción de SE es máxima. Dichos autores postulan que la producción de SE esta bajo control energético.

La esporulación y la producción de SE inician en forma simultánea, por lo que se ha sugerido que un mismo metabolito esta implicado en ambos fenómenos. Freese, et al., (1985) estudiaron las condiciones que conllevan al proceso de esporulación y en todos los casos estudiados encontraron una disminución en los niveles de GTP. El(Los) factor(s) que interactua(n) con GTP aún es(son) desconocido(s), aunque se ha implicado al producto de *spoO* debido al descubrimiento de una proteína que enlaza GTP (Obg) abajo del promotor *spoOB* (Trach y Hoch, 1989). Sin embargo, cuando a un cultivo en fase exponencial de *B. subtilis* se le adiciona decoyinina, un inhibidor de la síntesis de GTP, el cultivo pasa rápidamente a la etapa de esporulación pero, la producción de SE es muy baja (Vasanth y Freese, 1980), demostrando de esta manera que la esporulación no es suficiente para promover la producción de SE.

El gen *aprE* ha sido clonado, mapeado y secuenciado (Stahl y Ferrari, 1984) y se ha demostrado que se transcribe como un péptido "pre pro" (Power, et al., 1986). La secuencia de la SE madura, 275 aa, esta precedida por una región "pro" de 77 aa y una región "pre" de 22 aa. La región "pre" tiene una estructura típica de secuencia de exportación (Stahl y Ferrari, 1984). La

secuencia "pro" estabiliza la proteína y facilita el doblado adecuado (Ohta y Inouye, 1990). Una etapa de autoprosesamiento transforma a la pro-SE en su forma activa y la libera de la membrana celular (Egnell y Flock, 1991).

La región reguladora del gen *aprE* se ha estudiado con gran detalle (Ferrari, et al., 1986; Henner, et al., 1988a). Contiene una secuencia consenso reconocida por RNAA<sub>pol</sub> (Park, et al 1989). Dicha secuencia no es muy diferente a la de otros promotores asociados al crecimiento reconocidos por RNAA<sub>pol</sub>, sugiriendo la necesidad de otros factores para el reconocimiento eficiente del promotor de *aprE* en la fase de esporulación (Park, et al., 1989).

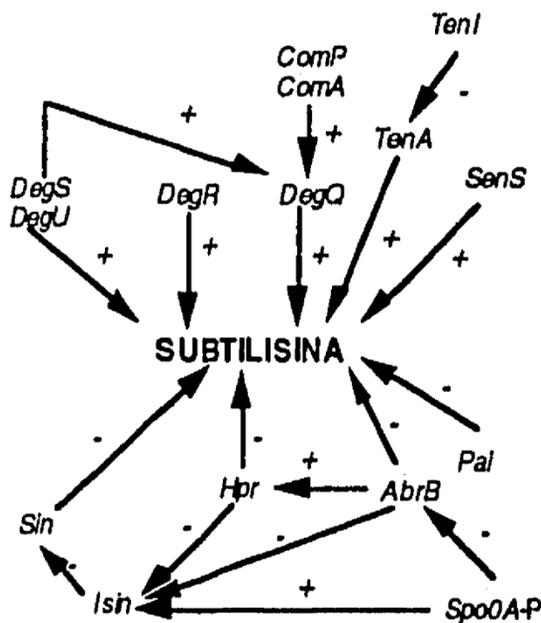


Fig. 2. Control de la expresión de subtilisina. Los efectores negativos están indicados por (-); los efectores positivos están indicados por (+).

Se ha demostrado que la transcripción de *aprE* se ve afectada por el producto de otros genes. Valle y Ferrari (1989) han caracterizado a *aprE* como un gen temporal regulado

redundantemente. Al menos el producto de nueve genes, *abrB*, *hpr*, *sin*, *degU*, *degS*, *degR*, *degQ* y *pai*, afectan la transcripción de *aprE* (Figura 2).

AbrB es una proteína que regula negativamente la transcripción de *aprE* en dos formas: por enlace en la región reguladora de *aprE* y por activación de la transcripción de *hpr*, que a su vez es un regulador negativo de *aprE* (Strauch y Hoch, 1992). AbrB es producida durante la fase de crecimiento de *B. subtilis* (Strauch, et al., 1989). Sin embargo, en la fase adaptativa, entre el crecimiento y la diferenciación celular, la transcripción de *abrE* es reprimida por el producto fosforilado del gen *spo0A* (Perego, et al., 1988). Spo0A fosforilada es el último eslabón de la cadena de fosforilación responsable de que *B. subtilis* inicie el proceso de diferenciación celular, aunque el metabolito que dispara esta cadena aún es desconocido. (Burbulys, et al., 1991; Grossman, 1991).

Hpr regula negativamente la transcripción de *aprE* y, como se mencionó anteriormente, esta regulación depende de la presencia de AbrB. Mediante experimentos de protección al ataque de DNAasa se ha demostrado que Hpr se enlaza a cuatro regiones separadas de la secuencia reguladora de *aprE* (Kalio, et al., 1991). Dos de estos sitios están localizados en una región arriba del promotor de -324 a -295 y de -292 a -267 pb y las otras dos traslapan el promotor, de -79 a -59 y de -25 a -14 pb (Strauch y Hoch, 1992). Curiosamente los sitios de enlace de Hpr en el promotor se localiza dentro de las áreas que enlaza AbrB.

Strauch y Hoch (1992) reportaron que en una mutante *hpr* la producción de SE se incrementó, sin embargo la

producción se mantuvo bajo el control temporal normal. Este resultado implica la presencia de otros reguladores negativos, como AbrB. Por otro lado Henner, et al., (1988) mostraron que una pérdida entre -244 y -200 pb, en la región reguladora de *aprE*, libera el fenotipo Hpr, observándose un incremento de tres veces en la expresión de *aprE*.

Cuando el gen *sin* se encuentra en plásmido multicopia inhibe la esporulación y la producción de SE (Guar, et al., 1991). Kalio, et al., (1991) demostraron que Sin se enlaza a la región -263 a -216 en la secuencia reguladora de *aprE*. Se ha demostrado (Gaur, et al., 1988) que Sin se expresa en forma constante durante el crecimiento y la esporulación de *B. subtilis*, por lo que se hipotetiza que la regulación del gen *sin* ocurre a nivel postranscripcional. Sin embargo aún no es claro el modo de acción de Sin.

Los genes *degS* - *degU* (anteriormente *sacU*) son los activadores de *aprE* que mayor atención han tenido (Valle y Ferrari, 1989). Las proteínas DegS y DegU son miembros de la familia del sistema de reguladores de dos componentes, ampliamente conservada en procariotes (Henner, et al., 1988b; Kunst, et al., 1988), donde un miembro (DegS) funciona como sensor y el otro (DegU) como regulador. Los resultados de Msadek, et al., (1991), Dahl, et al., (1992), Mukai, et al., (1990) y Tanaka, et al., (1991) sugieren que los productos de los genes *degS* y *degU* son requeridos para la síntesis de SE y que la proteína DegS funciona como una cinasa, que se autofosforila, la cual transfiere su grupo fosfato a DegU, en respuesta a alguna señal del medio ambiente. La proteína DegU fosforilada

se enlaza a la región reguladora de *aprE*, promoviendo su transcripción.

Los genes *degQ* y *degR* (anteriormente *sacQ* y *prtR*), que codifican para proteínas de 46 y 60 aa, cuando están presentes en plásmidos multicopia incrementan la producción de SE (Yang, et al., 1987). Sin embargo, ninguna es necesaria para la producción de SE (Nagami y Tanaka, 1986).

Henner, et al., (1988a) demostraron que la región de -164 a -141 de la secuencia reguladora de *aprE* estaba involucrada en la actividad de DegU y DegQ. También encontraron un incremento de diez veces en la expresión de *aprE* (medido como  $\beta$ -gal) para las mutaciones *degU(Hy) [sacU(Hy)]* y *degQ(Hy) [sacQ(Hy)]*.

Las proteínas Pai y SenS se han implicado en la regulación de la expresión de genes de estado de transición. Se ha demostrado que *pai* en plásmido multicopia inhibe la producción de SE (Honjo, et al., 1990), y que *senS*, también en plásmido multicopia, estimula la producción de SE (Wang y Doi, 1990). Sin embargo, se requieren más estudios para determinar, a nivel región regulatoria su acción.

Basados en el uso de vectores integrativos, utilizando como reportero al gen *lacZ*, y en la plétora de investigación concerniente a la regulación de la expresión del gen *aprE* el OBJETIVO CENTRAL de esta investigación fué:

**EVALUAR EXPERIMENTALMENTE LA EXPRESION DEL GEN *lacZ* DE *E. coli* INTEGRADO EN EL CROMOSOMA DE *B. subtilis*.**

con los objetivos particulares:

-Determinar la relación entre la resistencia a la presión de selección y la expresión del gen *lacZ*,

-Determinar la relación entre el grado de amplificación de la secuencia integrada y el grado de expresión del gen *lacZ*,

-Determinar la estabilidad de la secuencia integrada,

-Determinar si la expresión del gen *lacZ* se modifica en condiciones controladas de crecimiento.

Para cumplir con los objetivos planteados, las preguntas fundamentales que se tienen que responder son:

-¿Cuál es el límite de la amplificación?

-¿Que relación existe entre la concentración de antibiótico y el grado de amplificación?

-¿Que relación existe entre el grado de amplificación y el grado de expresión del gen *lacZ*?

-¿La construcción es estable?

-¿La expresión de *lacZ* se modifica cuando se controlan los parámetros de fermentación?

**HIPOTESIS DE TRABAJO**

La integración a cromosoma y la expresión de información heteróloga es una alternativa al uso de plásmidos replicativos para evitar los problemas de pérdida de información heteróloga en microorganismos recombinantes. Por otro lado, la dosis genética heteróloga puede ser manipulada más fácilmente cuando se integra por recombinación sencilla y se induce el fenómeno de duplicación y, posteriormente, el de amplificación genética, que cuando se

utilizan plásmidos replicativos. Asimismo, el uso de un promotor que no requiere de inductor y/o condiciones especiales de fermentación redundarán en un proceso de producción más sencillo que los que utilizan promotores inducibles. Por otra parte es esperable que la mutación seleccionada incremente la producción de la proteína recombinante. No se descarta el hecho de que las proteasas producidas por el microorganismo hospedero puedan influir en los resultados ya que éstas inician su expresión en el mismo período de crecimiento en que inicia la producción de la proteína heteróloga.

#### ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para cubrir los objetivos plantados la estrategia experimental desarrollada fue la siguiente:

a) Construcción de una cepa de *B. subtilis* recombinante en el cromosoma con el gen *lacZ* de *E. coli*, bajo control del promotor de subtilisina. Mediante el uso de la técnica de PCR y con primers específicos se aisló un fragmento de 660 pares de bases (pb) que contiene el promotor de subtilisina, el sitio de enlace a ribosoma y las primeras 24 bases del gen estructural *aprE*. El fragmento, después de su purificación, fue ligado al sitio *EcoRI-BamHI* del plásmido pJF751. Después de transformar a *E. coli* JM101, se seleccionó el plásmido pAprlac2. Con el pAprlac2 se transformó a *B. subtilis* BG125, seleccionando a las transformantes en medio con Cm y X-gal. Una transformante, BIBT-1, fue utilizada para integrarle la mutación *sacU32(Hy)* mediante el uso de PBS1, seleccionando posteriormente a la cepa

BIBT-10.

b) Para seleccionar microorganismos resistentes a mayor concentración de Cm, ya que la cepa BIBT-10 fue seleccionada en 5 mg de Cm/l, se realizó un diseño experimental con incremento geométrico en la concentración de Cm (5, 10, 20, 40 y 80 mg/l).

c) Después de obtener diferentes microorganismos resistentes a distintas concentraciones de Cm, su capacidad para producir  $\beta$ -gal fue determinada. Los microorganismos fueron crecidos en medio rico, 37 °C y 200 rpm en matraces de 500 ml. El crecimiento, la proteína y la actividad de  $\beta$ -gal fue determinada cada hora.

d) Una vez determinado que la producción de  $\beta$ -gal fue diferente en las diversas selecciones, la estabilidad de éstas fue ensayada. Los microorganismos fueron crecidos por 50 generaciones, en fermentaciones tipo lote secuencial, en ausencia del antibiótico y su estabilidad se determinó en función de la capacidad de producción de  $\beta$ -gal y en la determinación del fenotipo mediante plaqueo en medio rico y posterior picado de 200 colonias en medio rico suplementado con Cm y X-gal.

e) Para determinar la producción de  $\beta$ -gal en un ambiente más controlado, se realizaron fermentaciones a nivel de 14 litros con medio de cultivo sin Cm.

f) La dosis genética de *lacZ* para los organismos adaptados a diferentes concentraciones de Cm fue determinada mediante el uso de la técnica de Southern, utilizando el plásmido pSG35.1, el cual contiene el gen *lacZ* interrumpiendo el gen *amyE*, el gen de

resistencia a Cm y el origen de replicación y la resistencia a Ap del pBR322, como sonda molecular. El DNA de *B. subtilis* fué digerido con *KpnI*-*BamHI*. Alternativamente se utilizó una cepa que contiene una copia del gen *lacZ*, y que es incapaz de amplificar, como indicadora del grado de amplificación de la cepa BIBT-10.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. CONSTRUCCION DE CEPAS, SELECCION DE COLONIAS RESISTENTES A ALTAS CONCENTRACIONES DE CLORANFENICOL Y CINETICA DE CRECIMIENTO Y PRODUCCION DE $\beta$ -GALACTOSIDASA

Los resultados y la discusión de esta sección se encuentran ubicados en el artículo "Overproduction of  $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*", de M. Salvador, R Quintero y F. Valle, el cual se ha aceptado para su publicación en la revista: Asian-Pacific Molecular Biology and Biotechnology (ver Anexo), por lo que en esta sección solo se destacarán los resultados más importantes. Asimismo los resultados y la discusión de los datos no incluidos en dicho artículo se presentan en secciones posteriores.

Para obtener la cepa de trabajo, un fragmento de 660 pb, obtenido por síntesis con PCR (contiene la región reguladora, el sitio de unión a ribosomas y los primeros ocho codones del gen estructural de subtilisina), fué ligado al fragmento del plásmido pJF751 que contiene el gen *lacZ* de *E. coli*.

Después de transformar a la cepa

de *E. coli* JM101 se seleccionó un plásmido con las características deseadas. El plásmido, llamado pAp<sub>rlac2</sub>, se utilizó para transformar a la cepa BG125 de *B. subtilis*, obteniéndose de esta manera la cepa BIBT-1.

La construcción de la cepa BIBT-10 de *B. subtilis* fue realizada mediante transducción, con PBS1, del alelo *degU32* (Hy), anteriormente *sacU32*(Hy), y selección para el fenotipo His<sup>+</sup>, de la cepa BIBT-1. El genotipo de la cepa BIBT-10 así obtenida es: Cm<sup>R</sup>, *lacZ*, *degU32*(Hy). Para más detalles consultar el Anexo.

Cuando la producción de  $\beta$ -gal y la cinética de crecimiento de las cepas BIBT-1 y BIBT-10, crecidas en presencia de 5 mg de Cm por litro (condición de selección de las transformantes), fué determinada se encontró que la cepa portadora del alelo *degU32*(Hy) producía 30 veces más  $\beta$ -gal que la cepa sin esa mutación. Por otra parte, la velocidad de crecimiento y la concentración celular fueron similares en ambas cepas, mostrando, de esta manera, el efecto de la presencia del alelo *degU32*(Hy) en la transcripción del gen utilizado. Aunque se sabe que la presencia del alelo *degU32*(Hy) afecta a otras funciones, la competencia, la esporulación y la transformación entre otras (Kunts, et al., 1974), dichos efectos no fueron corroborados.

Ya que las cepas BIBT-1 y BIBT-10 portan el plásmido pAp<sub>rlac2</sub> flanqueado por repetidos directos integrado en el cromosoma, se planteó una estrategia para seleccionar individuos que portaran duplicación y/o amplificación del vector (Ver estrategia experimental).

Cuando las cepas BIBT-1 y BIBT-10, seleccionada en 5 mg de Cm/l, fueron

crecidas en 10, 20, 40 y 80 mg de Cm/l e incubadas por 12 horas a 37 °C, solamente se encontró desarrollo de colonias en la concentración de 10 mg de Cm/l.

Este resultado indujo al cambio de estrategia de selección. Para lograr el crecimiento de las cepas BIBT-1 y BIBT-10 en concentraciones de Cm mayores, el cultivo de las cepas se realizó mediante el sembrado de colonias desarrolladas en la concentración de adaptación en medio de cultivo con la concentración de Cm inmediatamente superior. Con esta estrategia se logró obtener crecimiento de las cepas hasta en 80 mg de Cm/l. Ya que el diseño experimental contemplaba el aumento geométrico de la concentración de Cm, la siguiente etapa de adaptación sería en 160 mg de Cm/l. Sin embargo, cuando las cepas, adaptada a 80 mg de Cm, se sembraron en dicha condición no se detectó crecimiento (Tabla 1 del Anexo). A pesar de que la concentración de Cm se disminuyó no se logró que las cepas crecieran a concentraciones superiores a 80 mg de Cm/l.

Los resultados encontrados indican que las cepas requieren de un período de adaptación al antibiótico para lograr crecer en altas concentraciones de Cm indicando, de esta manera, que el fenómeno de duplicación y/o amplificación de secuencias flanqueadas por repetidos directos no es un proceso que ocurra con alta frecuencia, de hecho se sabe que el fenómeno de amplificación ocurre a frecuencias del orden de  $10^{-7}$  o menores.

Por otro lado, el que las cepas no puedan crecer en concentraciones de Cm mayores a 80 mg/l implicaría que el fenómeno de amplificación genética

tiene un límite probablemente delimitado por el hospedero o por el tipo de locus involucrado en la recombinación. Sin embargo, se han reportado amplificaciones genéticas en *B. subtilis* que representan hasta el 55% del genoma de dicho organismo (Petit, et al., 1990). Por otro lado, F. Valle (1993) trabajando en *E. coli* con un vector integrativo portando el gen de resistencia a Cm encontró solamente el fenómeno de duplicación del vector aunque el microorganismo pudo desarrollarse hasta en 500 mg de Cm/l. Asimismo, D. Romero (1993) ha encontrado solamente la duplicación de un inserto, que confiere resistencia a Km, en el plásmido simbiótico D de *Rizhobium etli*.

La ausencia de crecimiento en concentraciones de Cm superiores a 80 mg/l, puede, asimismo, ser un efecto de que la concentración de antibiótico en el interior del microorganismo sea tan alta que aunque tenga el sistema enzimático para inactivarlo no logre evitar su efecto y/o que el metabolito necesario para la inactivación del Cm sea un limitante. Es conocido (Shaw 1983) que el Cm actúa a nivel de síntesis de proteínas. Se le considera como un antibiótico del tipo bacteriostático, por lo que se supone que al eliminarse del medio, el organismo puede reiniciar su crecimiento. Sin embargo dada la concentración elevada de uso y su alta estabilidad en medios acuosos redundan en una permanencia temporal muy alta, por lo que se espera que el organismo expuesto a Cm finalmente muera, muy probablemente por acción autoproteolítica. En el caso de organismos que puedan producir la enzima acetiltransferasa de Cm (Cat) es probable la existencia de una limitación

en la producción de acetil-coenzima A y/o en el flujo de energía (una discusión más formal se presenta en párrafos posteriores), sean las causas de la alta permanencia temporal del Cm, intracelularmente, y por lo tanto de su efecto bactericida.

Cuando la producción de  $\beta$ -gal, la velocidad de crecimiento y la producción de biomasa para las cepa BIBT-10, adaptada a diferentes concentraciones de Cm, fué determinada, se encontró que la población adaptada a 80 mg de Cm/l producía seis veces más  $\beta$ -gal que la población adaptada a 5 y 10 mg de Cm/l (Tabla 2 y Figura 2A del Anexo). Por otro lado, la cepa BIBT-1 incrementó la producción de  $\beta$ -gal de 90 U/ mg de proteína, crecida en presencia de 5 y 10 mg de Cm/l hasta 520 U/ mg de proteína (Tabla III B), crecida en presencia de 80 mg de Cm/l, lo que implica un aumento de seis veces en la producción de la enzima.

Comparando los resultados de la producción de  $\beta$ -gal para ambas cepas en las diferentes concentraciones de Cm se encontró que se conservaba el que la cepa BIBT10 produjera 30 veces más  $\beta$ -gal que la cepa BIBT-1. Estos resultados indican que la presencia del alelo *degU32(Hy)* sólo afecta la capacidad de traducción de la cepa que lo porta.

Por otra parte, las diferentes poblaciones seleccionadas de la cepa BIBT-10 mostraron una producción de  $\beta$ -gal estable a lo largo de 50 generaciones de crecimiento, en lotes secuenciales, en ausencia de Cm (Tabla IIIA). Similar resultado se encontró con las poblaciones seleccionadas de la cepa BIBT-1 (Tabla IIIB).

Se ha reportado (Janniére, et al.,

1985; Young y Ehrlich 1989) que los vectores integrativos son estables cuando el microorganismo recombinante se crece en ausencia de presión de selección. Los resultados de este trabajo corroboran la aseveración anterior ya que la producción se mantuvo estable y no se encontró la presencia de organismos que perdieran el genotipo cuando se sembraron 200 colonias al final del experimento, de cada una de las condiciones, para verificar las características de resistencia a Cm y la emergencia de colonias de color azul.

Tabla III A. Actividad específica de  $\beta$ -gal producida por la cepa BIBT-10 en crecimiento tipo lote secuencial<sup>a</sup>.

Generación	Cm (mg/l)			
	5	20	40	80
6	3150	5918	12220	18300
18	2970	6120	12200	18148
30	3074	5970	12105	17932
54	3187	6049	12150	18190

<sup>a</sup> Una colonia de cada sub-cepa fué cultivada en medio SM, conteniendo la misma concentración de Cm de mantenimiento, por 14 horas y utilizada como inóculo en fermentaciones sin Cm. En todos los lotes el inóculo fué tomado del cultivo previo antes de que la cepa llegara a la fase estacionaria de crecimiento.

\* Promedio de tres experimentos.

Por otro lado, se sabe que cuando un microorganismo recombinante, con plásmido replicativo, es crecido bajo condiciones más controladas, en un

fermentador, los problemas de inestabilidad de la información heteróloga se ven incrementados, dando como resultado la búsqueda de alternativas de control de proceso más estricto.

Para analizar el comportamiento de las cepas BIBT-1 y BIBT-10 en un ambiente más controlado se realizaron fermentaciones en un bioreactor de 14 litros operado a condiciones estandar, utilizando cada una de las poblaciones seleccionadas en diferentes concentraciones de Cm. La figura 3B del Anexo muestra el perfil de crecimiento y producción de la cepa BIBT-10 adaptada a 10 mg de Cm/l crecida en ausencia de Cm. En estos experimentos, tanto la producción como la cinética de  $\beta$ -gal no se vió alterada, sin embargo, el tiempo de fermentación se redujo.

**Tabla III B.** Actividad específica de  $\beta$ -gal producida por la cepa BIBT-1 en crecimiento tipo lote secuencial<sup>a</sup>.

Generación	5	Cm (mg/l)		
		20	40	80
6	95	198	372	530
18	90	202	385	548
30	94	197	400	532
54	87	204	380	560

<sup>a</sup> Una colonia de cada sub-cepa fué cultivada en medio SM, conteniendo la misma concentración de Cm de mantenimiento, por 14 horas y utilizada como inóculo en fermentaciones sin Cm. En todos los lotes el inóculo fué tomado del cultivo previo antes de que la cepa llegara a la fase estacionaria de crecimiento.

\* Promedio de tres experimentos.

Comportamientos similares se encontraron para las demas poblaciones, tanto de la cepa BIBT-10 como de la cepa BIBT-1.

Los resultados encontrados en los experimentos en fermentador de 14 litros, muestran que la integración a cromosoma de información heteróloga puede ser una alternativa muy interesante para la producción de proteínas recombinantes, ya que se demostró que la población conserva el genotipo. Si comparamos estos resultados con lo reportado para el crecimiento, en fermentador, de hospederos con plásmido replicativo son claras las ventajas que este sistema mostró.

Desde el punto de vista de productividad volumétrica de  $\beta$ -gal el sistema aquí empleado es 10 veces más productivo que lo reportado recientemente por Honjuchi, et al., (1993) utilizando un vector replicativo multicopia y modificando la temperatura y el pH del proceso de fermentación. Estos autores reportan una productividad volumétrica de 200 U/ml h, mientras que el sistema aquí empleado tiene una productividad volumétrica de 2000 U/ml h.

## 2. DETERMINACION DEL NUMERO DE COPIAS DEL VECTOR

Para determinar el número de copias del vector en la cepa BIBT-10 de *B. subtilis*, dos alternativas fueron analizadas. Comparar la producción de  $\beta$ -gal de una cepa que porta una copia del gen y mediante análisis del DNA.

La cepa de comparación fue la JHI2464, la cual porta el plásmido

pSG35.1 con una copia del gen *lacZ* y no es amplificable, la cual es capaz de crecer en presencia de hasta 10 mg/l de Cm. Cuando esta cepa fue crecida en 5 y 10 mg/l de Cm, produjo una cantidad de  $\beta$ -gal similar a la producida por la cepa BIBT-10. Por otro lado, la cepa JH12464 fue incapaz de crecer en presencia de 20 mg/l de Cm. Con este resultado, el número de copias del gen *lacZ* que porta la cepa BIBT-10 puede ser inferido. Como se ha reportado (Mueller y Sonenshein, 1992), la producción de una proteína heteróloga se incrementa conforme el número de copias del gen, siempre y cuando esta no sature los sistemas de transcripción y/o traducción del hospedero. De acuerdo con esto, la cepa BIBT-10 puede tener hasta seis copias del gen *lacZ* cuando se cultiva en 80 mg de Cm por litro.

Asimismo, la actividad de Cat no puede ser utilizada como un indicador del número de copias, ya que su síntesis es inducida por Cm (el gen *cat* en el plásmido pAprlac2 fue derivado del plásmido pC194 de *Staphylococcus aureus*) y el mecanismo de inducción de CAT tanto en células en estado vegetativo como en estado de esporulación es complejo (Shaw, 1983).

Para determinar si el incremento en la producción de  $\beta$ -gal fue un resultado de un incremento en la dosificación genética, se obtuvo DNA cromosomal de la cepa BIBT-10 crecida en diferentes concentraciones de Cm. Entre los diferentes métodos para cuantificar el número de copias de un gen la densitometría y el método de dilución (Albertini y Galizzi, 1985), son de uso común. En estos métodos, después del análisis tipo Southern, la intensidad de la señal de varias

diluciones de la muestra es visualmente comparada con la generada por el ensayo de referencia. El mayor problema cuando se utilizan estos métodos es la precisión, ya que necesitan usar exactamente la misma cantidad de DNA en todas las pruebas. Asimismo, la cuantificación de DNA por espectrometría y/o por gel no es exacta. Por lo tanto, se decidió utilizar un acercamiento alterno, en el cual el número de copias fuera independiente de la concentración del DNA. El DNA fue cortado fuera de la secuencia del vector utilizando enzimas de restricción apropiadas. Primeramente se utilizó *KpnI*, la cual corta cerca del promotor de subtilisina (dentro de *aprE*) pero fuera del vector. Por otro lado, no se conocía la distancia de corte arriba del promotor. Después de varios ensayos con diferentes combinaciones de enzimas, el sistema *KpnI-BamHI* dió el fragmento menor (aprox. 10 kb). Por lo tanto si la cepa tiene de una a seis copias del vector, se esperaban fragmentos de 10, 18, 26, 34, 42 y 50 Kb. En la figura 3 se muestra el resultado del ensayo tipo Southern del DNA de la cepa BIBT10 crecida en 5, 20, 40 y 60 mg/l de Cm.

Sorpresivamente, cuando la cepa BIBT-10 se crece en 5 y 10 mg de Cm/l solo presenta una copia del vector, mientras que cuando se crece en 40 y 60 mg/l de Cm la cepa contiene dos copias del vector (Figura 3) y como ya se ha mencionado, en todos los casos la producción de  $\beta$ -gal fue diferente. De acuerdo con los resultados obtenidos con la cepa JH12464, se esperaban 1, 2, 4 y 6 copias del vector.

El resultado encontrado no explica el incremento en la producción de la enzima, por lo tanto varias

explicaciones pueden ser propuestas: (1) el uso de colonias heterogéneas, en otras palabras que la población estuviera constituida por diferentes microorganismos que portaran diferente número de copias del vector; (2) que la presión de selección determine cierta sincronización en el crecimiento del microorganismo, dando como resultado que un número diferencial de organismos llegen al estado estacionario y por lo tanto se encuentren diferentes perfiles de producción de  $\beta$ -gal; (3) que la población al final del crecimiento exponencial estuviera constituida por individuos genotípicamente diferentes; (4) que exista una expresión alterada del gen *lacZ* debido a algún cambio en la secuencia del vector o a una desregulación en la transcripción y/o traducción.

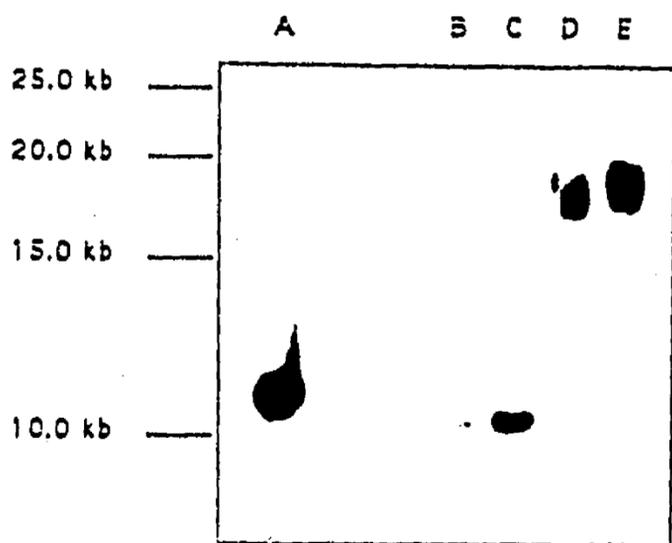


Figura 3. Autorradiografía del DNA de *B. subtilis* BIBT-10 digerido con *KpnI* y *BamHI*, crecido en diferentes concentraciones de Cm. A) Plásmido pSG35.1; B) Cepa crecida en 5 mg de Cm/l; C) Cepa crecida en 20 mg de Cm/l; D) Cepa crecida en 40 mg de Cm/l; E) cepa crecida en 60 mg de Cm/l.

Las hipótesis 1 y 3 pueden ser excluidas ya que, contrariamente a lo reportado por Albertini y Galizzi (1985) y Piggot y Curtis (1987), donde ellos mostraron que colonias independientes tienen diferentes cantidades de información heteróloga, el resultado de la hibridación indica que la población es homogénea. Por otro lado, cuando las características fenotípicas de la población fueron corroboradas al final del crecimiento (sembrando placas de agar sin Cm y sin X-gal y posterior resembrado en cajas con estos dos marcadores), toda la población probada mantenía la capacidad de crecer en Cm y producir colonias de color azul.

Cuando la producción de fosfatasa alcalina (AP), una enzima utilizada como marcador genético de la fase II de esporulación en la cepa silvestre, fue determinada en la cepa BIBT-10 crecida en diferentes concentraciones de Cm, no fue posible observar diferencias entre las diversas condiciones de crecimiento. Mas aún, la actividad de AP fue detectada desde el inicio de la fermentación y esta permaneció constante hasta el final del crecimiento vegetativo cuando se incrementó dos veces (un posible efecto de la presencia del alelo *degU32*).

Cuando el número de individuos que entran a la fase de esporulación fue determinado (empleando la tinción con verde de malaquita), no se detectó una diferencia estadísticamente significativa. Debido a esto, la hipótesis 2 fue desechada.

Ya que fué imposible explicar el aumento de la actividad de  $\beta$ -gal sin un incremento proporcional en el número de copias del gen, tanto fenotípicamente

como bioquímicamente, se puede pensar que algún fenómeno a nivel regulatorio, aún no contemplado, está ocurriendo.

Se ha reportado que algunos genes acoplados a *lacZ*, bajo control de *spoO* e integrados a cromosoma en tres o cuatro copias, pueden evadir el control de *spoO* (Zuber, 1983; Piggot. et al., 1985). El mecanismo mediante el cual múltiples copias de esta región escapa al control de *spoO* es desconocido (Ferrari, et al., 1986).

Por otro lado el que F. Valle (1993) y D. Romero (1993) hayan encontrado solamente la duplicación del material genético heterólogo en otras cepas indica que muy probablemente éste sea el fenómeno universal y que lo que se ha reportado como amplificación sean el resultado de la poco nivel cuantitativo que las técnicas para cuantificar dosis genética tienen *per se*. Esta problemática fué comentada ampliamente en la introducción de este trabajo.

Asímismo, el fenómeno de incremento en la actividad de ciertas enzimas, incluyendo a la  $\beta$ -gal, por el crecimiento de *E. coli* en presencia de concentraciones sub-letales de Cm fué reportada por Ford y Switser (1975) y Paigen (1963). Estos estudios muestran que el Cm puede afectar la síntesis enzimática en forma selectiva.

A pesar de los resultados encontrados en este estudio y los reportados por Ford y Switser (1975) y Paigen (1963) no se tiene una explicación científicamente fundamentada al fenómeno de incremento de actividad de la enzima  $\beta$ -gal.

### 3. ANALISIS DEL FLUJO DE CARBONO Y ENERGIA EN PRESENCIA DE CLORANFENICOL.

Cuando *B. subtilis* crece en medio rico, la fuente de carbono y energía son los hidrolizados de proteínas. De aquí, que después de la proteólisis que sufren, para dar como producto aminoácidos (Fig. 4), estos hidrolizados son metabolizados hasta ácidos orgánicos y así incorporados a las rutas de producción de energía, principalmente hacia el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Para el caso del análisis aquí presentado, dos son los ácidos que se analizarán: el pirúvico (Pir) y el acético (Ace). El Pir y el Ace se transforman en acetil-coenzima A (AcCoA), el cual es utilizado, por un lado, en el TCA para producir isocitrato, y por otro lado para producir intermediarios de la envoltura celular (Figura 5). Asímismo, el AcCoA puede utilizarse como precursor de aminoácidos.

Por otro lado, cuando en el medio de cultivo se encuentra presente el Cm y el microorganismo posee la enzima para acetilarlo (Cat), el AcCoA presente en la célula también debe derivarse hacia esa función. Shaw (1967) demostró que la acetilación enzimática del Cm primariamente se realizaba en la posición tres del anillo bencénico y posteriormente se llevaba a cabo una segunda acetilación en la posición uno del mismo anillo. El mismo autor encontró una  $K_m$  de  $1.5 \times 10^{-5}M$  para el Cm en la Cat de *E. coli*, utilizando extractos protéicos.

Dado que para *B. subtilis* muchas de las concentraciones de precursores y de compuestos celulares estructurales no se conocen, se han desarrollado

modelos en función de lo reportado para *E. coli*. El más reciente (Goel, et al., 1993) hace el análisis de flujo metabólico en cultivo lote y continuo del crecimiento de *B. subtilis* en medio mínimo. Utilizando una matriz de 32 ecuaciones y las velocidades globales de reacción calcula la concentración, a un tiempo dado, de los precursores involucrados. Sin embargo, para este modelo, la concentración de Pir y de Ace son cero para cualquier tiempo, implicando de esta manera que no existe acumulación de estos metabolitos.

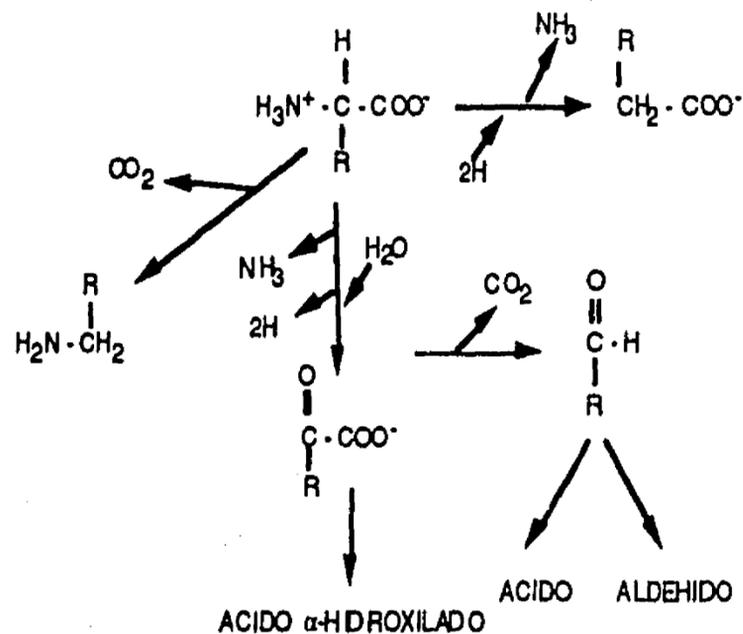


Figura 4. Metabolismo de aminoácidos

Por otro lado, Jeong, et al. (1990) desarrollaron un modelo matemático para simular el crecimiento y la esporulación de *B. subtilis* en medio mínimo. El modelo está representado por 39 ecuaciones no lineales y acopladas a ecuaciones diferenciales conteniendo cerca de 200 parámetros. Este modelo utiliza las velocidades máximas de reacción así como las

constantes enzimáticas  $K_m$  y las constantes de inhibición. Con este modelo se puede calcular la concentración de cualquier metabolito a un tiempo dado. Así se tiene que, en *B. subtilis*, la concentración de Pir es de 5.6 mM, de acCoA es de 200 mM y de isocitrato es de 600 mM. Con el uso de este modelo, es posible calcular la reducción en el flujo de metabolitos cuando al medio de cultivo se le agrega Cm. Sin embargo se requieren las constantes de velocidad máxima y la  $K_m$  para la acetiltransferasa de *Staphylococcus*, las cuales no se encuentran reportadas en la literatura.

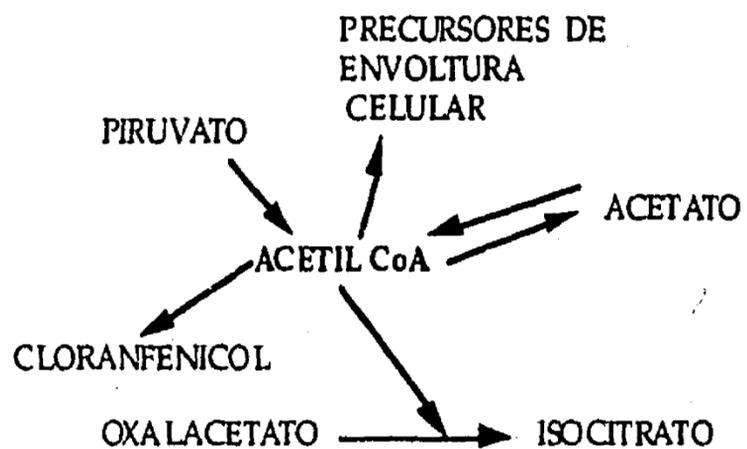


Figura 5. Producción y consumo de acetil-CoA.

Ya que por la vía de los modelos de crecimiento para *B. subtilis* no se puede encontrar el efecto del Cm en la biomasa producida, se utilizó como alternativa un balance de masa en cultivo continuo. El comportamiento de la cepa BIBT-10 en cultivo continuo fue reportado por Rincón, et al. (1994). En este artículo se muestra que la biomasa producida decrece en un 9% cuando la

cepa BIBT-10 fue crecida inicialmente por quince generaciones en ausencia de Cm y posteriormente se le adiciona en el medio de alimentación 20 mg/l de Cm, creciéndose por igual número de generaciones. Realizando un balance de masa para el Cm y la biomasa producida para la tasa de dilución empleada, se encuentra que existe un consumo de 10.07 mM de Cm por gramo de célula, lo que, de acuerdo a la cinética de acetilación del Cm, representaría un gasto máximo de 20.14 mM de AcCoA por gramo de célula. Goel, et al. (1993) reportaron que se requieren 1400 mM de AcCoA para producir un gramo de masa seca de *B. subtilis*. utilizando un medio químicamente definido El gasto de AcCoA para acetilar el Cm representa una reducción del 1.4 % en la biomasa producida, lo cual no corrobora lo encontrado experimentalmente, tanto en cultivo lote como en cultivo continuo.

Si se analiza los requerimientos de ATP para formar un gramo de masa celular seca, se encuentra que para *E. coli*, crecida en medio mínimo, se reporta una cantidad de 6162 mM. Si se supone que igual cantidad se requiere para formar un gramo de masa seca de *B. subtilis* y, ya que por la acetilación del Cm se dejan de producir 24 ATP por mol de AcCoA utilizado, se calcula una falta de producción de 483 mM de ATP. En función a este último cálculo, se espera una reducción del 7.8 % en la biomasa producida, lo que representa 1.2 % menos que la observada experimentalmente.

Si la repercusión del uso de AcCoA, en la reducción en el flujo de carbono y en la producción de energía, son adicionados, se encuentra una

reducción global del 9.2 % en la producción de biomasa. Este análisis es más difícil de realizar en cultivo lote, ya que las células se encuentran una sola vez con altas concentraciones del antibiótico. No obstante, la reducción de la biomasa producida es más drástica que en el cultivo continuo, lo cual implica la existencia de otros factores limitantes del crecimiento.

Aunque los resultados de reducción de la producción de biomasa por el aumento en la concentración de Cm en el medio de cultivo pueden ser explicados mediante el análisis anteriormente realizado, es importante tener en mente que este análisis es especulativo ya que se requiere de un estudio más formal para poder comprobarlo.

## CONCLUSIONES

A lo largo de este estudio se ha mostrado que la integración a cromosoma de información heteróloga puede ser una alternativa interesante para la producción de proteínas de interés comercial. Se ha mostrado que la proteína estudiada puede expresarse en forma estable, por al menos 50 generaciones en ausencia de presión de selección. Asimismo, se ha establecido un esquema de selección de células que producen seis veces más la proteína utilizada en este estudio.

Por otro lado, se demostró que el promotor de subtilisina es adecuado para la expresión de genes heterólogos, aunado a la facilidad de manejo ya que no requiere de inductores o de condiciones especiales de fermentación. Esto lo hace candidato para ser ampliamente utilizado para la

producción de proteínas heterólogas.

El uso del alelo *degU32(Hy)* repercutió en un incremento de treinta veces en la expresión de  $\beta$ -gal, con respecto a la cepa silvestre.

Aunque la proteína estudiada incrementó su actividad seis veces, cuando *B. subtilis* se seleccionó y creció en presencia de altas concentraciones de Cm, cuando se determinó el número de copias del inserto no se encontró una correlación directa, ya que sólo se encontró la duplicación de la información genética. Aunque varias hipótesis se analizaron, no se encontró una explicación coherente a los resultados, por lo que se requiere de un estudio más detallado a nivel molecular de este fenómeno.

La disminución en la proteína total y en la biomasa producida cuando se incrementa la concentración de Cm en el medio de cultivo, parece ser más un efecto en la limitación de energía (ATP) que en la síntesis de proteína, aunque se requiere de un estudio más formal para obtener resultados conclusivos.

Por otro lado, las preguntas fundamentales planteadas al inicio de la investigación fueron contestadas, ya que se pudieron obtener los organismos recombinantes en cromosoma y se establecieron esquemas de selección de organismos sobreproductores de la proteína estudiada. Asimismo, se encontró una relación entre la concentración de Cm y la expresión del gen heterólogo así como entre la dosis genética y el grado de expresión. Se mostró además que la información heteróloga se mantiene estable y no se afecta cuando el microorganismo recombinante se crece en condiciones

controladas.

Finalmente, las respuestas encontradas a las preguntas planteadas han generado una serie de nuevos cuestionamientos, los cuales se plantean en la siguiente sección.

## PERSPECTIVAS

i) Desde el punto de vista de conocimiento básico, el estudio del control molecular de la expresión del gen *lacZ*, cuando se encuentra presente en más de una copia en arreglo secuencial, es el punto más importante a estudiar ya que no se encontró una contestación lógica a los resultados del aumento de la expresión de  $\beta$ -gal al incrementarse la concentración de Cm en el medio de cultivo sin un aumento en la dosis genética. Valle y Ferrari (1989) puntualizaron que el arreglo espacial ("bending") del DNA en el locus de subtilisina parece jugar un papel muy importante en la transcripción. Tomando de cierto que el arreglo espacial del DNA se vea afectada por la secuencia nucleotídica del vector y esto a su vez afecte el grado de transcripción, es esperable que la expresión del gen sea independiente de la condición de cultivo y por lo tanto que la producción de la proteína heteróloga sea similar en la condición de monocopia o de duplicación. Nuestros resultados muestran que la enzima se expresa como una función de la concentración de Cm y es independiente de la dosis genética, implicando, de esta manera, que existe otro(s) factor(es) que afectan al proceso de transcripción y/o al de traducción. Se puede pensar, de acuerdo a los resultados,

que el producto desactivado del Cm juege un papel en la "sensibilización" de los ribosomas para transcribir específicamente y/o con más frecuencia los RNAm del gen heterólogo, o también que interactue con alguna proteína promotora de la transcripción aumentando, de esta manera, la frecuencia del proceso.

Sin embargo, en los experimentos de estabilidad, donde el Cm y sus productos de desactivación, solo estuvieron presentes en el primer lote, se encontró que el fenotipo, se conservaba por 50 generaciones, indicando de esta manera que existe(n) otro(s) factor(es), afectado(s) por el tratamiento con Cm, implicados en la regulación de la expresión del gen estudiado. Además, este(os) factor(es) afectado(s) quedan determinados dentro del genoma.

ii) El que solamente se haya detectado la duplicación del material genético heterólogo y el que este mismo fenómeno se encuentre en hospederos como *E. coli* y *R. etli*, implica el cuestionamiento al fenómeno de amplificación reportados por otros autores, por lo que se requiere de investigar si la duplicación es el límite para genes flanqueados por repetidos directos.

Por otro lado, el uso de antibióticos como marcadores de selección, en sistemas con repetidos directos, puede no ser la alternativa más apropiada, ya que por su efecto letal puede limitar al sistema. Por tal motivo, es probable que otros marcadores genéticos, p. ej. el sistema de alta afinidad por fósforo, puedan ser empleados para detectar un mayor grado de dosis genética en este tipo de

construcciones.

iii) Aunque la productividad volumétrica del sistema aquí empleado supera a lo reportado para los sistemas que utilizan plásmidos replicativos, se requiere del estudio de la producción de esta proteína en mutantes asporogénicas para determinar la posibilidad de aumentar la fase de producción de polipéptidos bajo control del promotor *aprE*, ya que se sabe que este es un promotor temporal. Asimismo, la productividad puede ser aumentada utilizando otras mutaciones que afectan, en forma positiva, la expresión del promotor empleado.

iv) Ya que *B. subtilis* es un productor natural de proteasas, se requiere de la construcción de cepas deletadas o mutadas en dichos genes, para determinar su efecto en la producción de la proteína heteróloga, sea esta extra o intracelular.

v) Basado en la experiencia del uso de cultivo continuo para la producción de proteínas nativas y heterólogas considero que esta técnica es una herramienta que puede ser muy útil para estudiar incógnitas tan grandes, que aún existen, como la determinación del metabolito que dispara el proceso de diferenciación celular, determinar la cinética de duplicación del material genético, determinar la cinética de amplificación de estructuras duplicadas en forma secuencial y flanqueadas por repetidos directos y, determinar la cinética de pérdida, si la hay, de información genética en estructuras amplificadas.

## BIBLIOGRAFIA

- Albano, M., J. Hahn and D. Dubnau. 1987. Expression of competence genes in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 169: 3110-3117.
- Albertini, A.M. and A. Galizzi. 1985. Amplification of a chromosomal region in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 162: 1203-1211.
- Albertini, A.M., M. Hofer, M. P. Galos and J. H. Miller. 1982. On the formation of spontaneous deletions: the importance of short sequence homologies in the generation of large deletions. *Cell* 29: 319-323.
- Alonso, J.C. and T.A. Trautner. 1985a. A gene controlling segregation of the *Bacillus subtilis* plasmid pC194. *Mol. Gen. Genet.* 198: 427-430.
- Alonso, J.C., and T.A. Trautner. 1985b. Generation of deletions through a *cis*-acting mutation in pC194. *Mol. Gen. Genet.* 198: 432-437.
- Ano, T., T. Imanaka and S. Aiba. 1986. The copy number of *Bacillus* plasmid pRBH1 is negatively controlled by Rep protein. *Mol. Gen. Genet.* 202: 416-420.
- Burbulys, D., K.A. Trach and J. A. Hoch. 1991. Initiation of sporulation in *B. subtilis* is controlled by a multicomponent phosphorelay. *Cell* 64: 545-552.
- Bron, S. and E. Luxen. 1985. Segregational instability of pUB110-derived recombinant plasmids in *Bacillus subtilis*. *Plasmid.* 14: 235-244.
- Cesareni, G. and D.W. Banner. 1985. Regulation of plasmid copy number by complementary RNAs. *Trends Biochem. Sci.* 10: 303-309.
- Chang, S., D. Ho, O. Gray, S.Y. Chang and J. McLaughlin. 1982. Functional expression of human interferon genes and construction of a partition-proefficient plasmid vector in *Bacillus subtilis*. p. 227-229. In: Ikeda, Y. and T. Beepu (ed). *Genetics of industrial microorganisms*. Kodansha, Tokio.
- Dahl, M.K., T. Msadek, F. Kunts and G. Rapoport. 1992. The phosphorylation state of the DegU response regulator acts as a molecular switch allowing either degradative enzyme synthesis or expression of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *J. Biol Chem.* 267: 14509-14514.
- Donnelly, C.G. and A.L. Sonenshein. 1984. Promoter-probe plasmid for *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 157: 965-967.
- Dubnau, E.D., J. Weir, G. Nair, H.L. Careter III, C.P. Moran, Jr. and I. Smith. 1988. *Bacillus* sporulation gene *spo0H* codes for  $\sigma^{30}$  ( $\sigma^H$ ). *J. Bacteriol.* 170: 1054-1062.
- Dubnau, E.D. 1991. The regulation of genetic competence in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 5: 11-18.
- Duncan, C.H., G.A. Wilson and F.E. Young. 1977. Transformation of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* by a hybrid plasmid pCD1. *Gene* 1: 153-167.
- Duncan, C.H., G.A. Wilson and F.E. Young. 1978. Mechanism of integrating foreign DNA during transformation of *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 3664-3668.
- Egnell, P. and J.I. Flock. 1991. The subtilisin Carlsberg pro-region is a membrane anchorage for two fusion proteins produced in *Bacillus subtilis*. *Gene* 97: 49-54.
- Ehrlich, S.D., H. Bursztyn-Pettegrew, L. Stroynowski and J. Lederberg. 1976. Expression of thymidylate synthetase gene of the *Bacillus subtilis* bacteriophage Phi-3-T in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73: 4145-4149.
- Errington, J. 1984. Efficient *Bacillus subtilis* cloning system using bacteriophage vector f10529. *J. Gen. Microbiol.* 130: 2615-2628.
- Errington, J. 1986. A general method for fusion of the *Escherichia coli lacZ* gene to chromosomal genes in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2953-2966.
- Errington, J. and J. Mandelstam. 1986a. Use of *lacZ* fusion to determine the dependence pattern

- and the spore compartment expression of sporulation operon *spoVA* in *spo* mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2967-2976.
- Errington, J. and J. Mandelstam. 1986b. Use of *lacZ* fusion to determine the dependence pattern and the spore compartment expression of sporulation operon *spoVA* in *spo* mutants of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2977-2985.
- Errington, J. and R.G. Wake. 1991. Chromosome strand segregation during sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 5: 1145-1149.
- Fahnestock, S.R., C.W. Slunders, M.S. Guyer, S. Lufdahl, B. Guss, M. Uhlen and M. Lindberg. 1986. Expression of staphylococcal protein A gene in *Bacillus subtilis* by integration of intact gene into the *B. subtilis* chromosome. *J. Bacteriol.* 165: 1011-1014.
- Ferrari, E., S.M.H. Haward and J.A. Hoch. 1986. Effect of stage 0 sporulation mutations on subtilisin expression. *J. Bacteriol.* 166: 173-179.
- Ferrari, E. and J.A. Hoch. 1989. Genetics. p.57-72. In: Harwood, C.R. (ed) *Bacillus biotechnology handbook*, vol. 2. Plenum Press. New York.
- Ferrari, F.A., E. Ferrari, and J.A. Hoch. 1982. Chromosomal location of a *Bacillus subtilis* DNA fragment uniquely transcribed by sigma-28 containing RNA polymerase. *J. Bacteriol.* 152: 780-785.
- Ferrari, F.A., A. Nguyen, D. Lang and J. A. Hoch. 1983. Construction and properties of an integrable plasmid in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 154: 1513-1515.
- Ferrari, F.A., K. Trach and J.A. Hoch. 1985. Sequence analysis of the *spo0B* locus reveals a polycistronic transcription unit. *J. Bacteriol.* 161: 556-562.
- Fisher, S.H. and A.L. Sonenshein. 1991. Control of carbon and nitrogen metabolism in *Bacillus subtilis*. *Annu. Rev. Microbiol.* 45: 107-135.
- Flock, J., I. Fotherenghan, J. Light, L. Bell and R. Denbyehire. 1984. Expression in *Bacillus subtilis* of the gene for human urogastrone using synthetic ribosome binding sites. *Mol. Gen. Genet.* 195: 246-251.
- Ford, S.R. and R.L. Switzer. 1975. Stimulation of derepressed enzyme synthesis in bacteria by growth on sublethal concentrations of chloramphenicol. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 7, 555-563.
- Frankena, J., G.M. Koningstein, H.W. vanVersevel and A.H. Stonhamer. 1986. Effect of different limitations in chemostat culture on growth and production of exocellular protease by *Bacillus licheniformis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 24: 106-112.
- Freese, E. and J. Heinze. 1984. Metabolic and genetic control of bacterial sporulation. p. 102-172. In: Hurs, T.A. and G.W. Gould (ed). *The bacterial spore*. vol 2. Academic Press, New York.
- Freese, E., E.B. Freese, E.R. Allen, Z. Olempska-Beer, C. Orrego, A. Varma and H. Wabiko. 1985. Metabolic initiation of spore development. p. 194-202. In: Hoch, J.A. and P. Setlow (ed). *Molecular biology of differentiation*. Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C.
- Gaur, N.K., J. Oppenheim and I. Smith. 1991. The *Bacillus subtilis sin* gene, a regulator of alternate developmental processes, codes for a DNA-binding protein. *J. Bacteriol.* 173: 678-686.
- Gentz, R., A. Langner, A. Chang, S. Cohen and H. Bujard. 1981. Cloning and analysis of strong promoters is made possible by downstream placement of an RNA termination signal. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78: 4936-4940.
- Git, M.A., L.F. Wang and R.H. Doi. 1985. A strong sequence homology exists between the major RNA polymerase sigma factors of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 260: 7178-7185.
- Goebel, W., J. Kreft and K.J. Burger. 1979. Molecular cloning in *Bacillus subtilis*. In: Timmis, L.M. and A. Puhler (ed) *Plasmids of medical environmental and commercial importance*. Elsevier. Amsterdam.

- Goel, A., J. Ferranca, J. Jeong and M.M. Atai. 1993. Analysis of metabolic fluxes in batch and continuous cultures of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 42: 686-696.
- Grandi, G., M. Mottes and V. Sgaramella. 1981. Specific pattern of instability of *Escherichia coli* *hisG* gene cloned in *Bacillus subtilis* via the *Staphylococcus aureus* plasmid pCS194. *Plasmid* 6: 99-111.
- Grossman, A.D. 1991. Integration of developmental signals and the initiation of sporulation in *B. subtilis*. *Cell* 65: 2-8.
- Gruss, A., H. Ross and R. Novick. 1987. Functional analysis of a palindromic sequences for normal replication of several staphylococcal plasmids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 2165-2169.
- Gutterson, N.I. and D.E. Koshland, Jr. 1983. Replacement and amplification of bacterial genes with sequences altered *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80: 4894-4898.
- Guzmán, P., J. Westpheling and P. Youngman. 1988. Characterization of the promoter region of the *Bacillus subtilis* *spoIIE* operon. *J. Bacteriol.* 170: 1598-1609.
- Haldenwang, W.G., C.D.B. Banner, J.F. Ollington, R. Losick, J.A. Hoch, M.B. O'Connor and A.L. Sunenshein. 1980. Mapping a cloned gene under sporulation control by insertion of a drug resistance marker into the *Bacillus subtilis* chromosome. *J. Bacteriol.* 142: 90-95.
- Hanlon, C.W., A. Hodges and A. D. Rusell. 1982. The influence of glucose, ammonium and magnesium availability on the production of protease and bacitracin by *Bacillus licheniformis*. *J. Gen. Microbiol.* 128: 845-853.
- Hanson, R.S. and D.P. Cox. 1967. Effect of different nutritional conditions on the synthesis of tricarboxylic acid cycle enzymes. *J. Bacteriol.* 93: 1777-1787.
- Harwood, C.R. and A.B. Archivald. 1990. Growth, maintenance and general techniques. p. 1-26. In: Harwood, C.R. and S.M. Cutting (ed). *Molecular biological methods for Bacillus*. John Wiley and Sons. Chichester, England.
- Hashiguchi, K., A. Tanimoto, S. Nomura, K. Yamane, K. Yoda, S. Harada, M. Mori, T. Furusato, A. Takatsuki, M. Yamasaki and C. Tamura. 1986. Amplification of the *amyE-tmrB* region on the chromosome in tunicamycin-resistant cells of *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 204: 36-43.
- Helmann, J.D., L.M. Marquez and M.J. Chamberlin. 1988. Cloning, sequencing and disruption of the *Bacillus subtilis*  $\sigma^{38}$  gene. *J. Bacteriol.* 170:1568-1574.
- Henner, D.J., E. Ferrari, M. Perego, and J.A. Hoch. 1988a. Location of the targets of the *hpr-97*, *sacU32(Hy)* and *sacQ36(Hy)* mutations in upstream regions of the subtilisin promoter. *J. Bacteriol.* 170: 296-300.
- Henner, D.J., M. Yang and E. Ferrari. 1988b. Location of *Bacillus subtilis* *sacU(Hy)* mutation to two linked genes with similarities to the conserved procaryotic family of two-component signalling systems. *J. Bacteriol.* 170: 5102-5109.
- Higgings, M.L. and P.J. Piggot. 1992. Septal membrane fusion. A pivotal event in bacterial spore formation? *Mol. Microbiol.* 6: 2565-2571.
- Hinnen, A., J.B. Hicks and G.R. Fink. 1978. Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 1929-1933.
- Honjo, M., A. Nakayama, K. Fukazawa, K. Kawamura, K. Ado, M. Hori and Y. Furutami. 1990. A novel *Bacillus subtilis* gene involved in negative control of sporulation and degradative-enzyme production. *J. Bacteriol.* 172: 1783-1790.
- Honjuchi, J., M. Kamasawa, H. Miyakawa, M. Kishimoto and H. Momose. 1993. Effective  $\beta$ -galactosidase production by recombinant *Escherichia coli* based on culture phase identification using fuzzy set theory. *J. ferm. Biotechnol.* 76: 382-387.
- Janniere, L. B. Niaudet, E. Pierre and S.D. Ehrlich. 1985. Stable gene amplification in the

- chromosome of *Bacillus subtilis*. *Gene* 40: 47-55.
- Jeong, J.W., J. Snay and M.M. Atai. 1990. A mathematical model for examining growth and sporulation processes of *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Bioeng.* 35: 160-184.
- Jones, I.M., S.B. Primrose, A. Robinson and D.C. Ellwood. 1980. Maintenance of some ColE1-type plasmids in chemostat cultures. *Mol. Gen. Genet.* 180: 579-584.
- Jonas, R.M. and W.G. Haldewang. 1989. Influence of *spo* mutations on  $\sigma^E$  synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 171: 5226-5228.
- Kalio, P.T., A. Palva and I. Palva 1988. Expression of integrated *Bacillus amyloliquefaciens*  $\alpha$ -amylase gene in the genome of *Bacillus subtilis*. p. 337-340. In: Ganegan, A.T. and J. A. Hoch (ed). *Genetics and biotechnology of bacilli*. vol 2. Academic Press, London.
- Kalio, P.T., J.E. Fagelson, J.A. Hoch and M.A. Strauch. 1991. The transition state regulator Hpr of *Bacillus subtilis* is a DNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* 266: 13411-13417.
- Kamazyn-Campelli, C., C. Bosnany, B. Savelli, and P. Stragier. 1989. Tandem genes encoding sigma factors for consecutive stages of development in *Bacillus subtilis*. *Genes. Dev.* 3: 150-157.
- Kenney, T.J. and C. P. Moran, Jr. 1987. Organization and regulation of an operon that encodes a sporulation-essential sigma factor in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 169: 3329-3339.
- Kenney, T.S., K. York, P. Youngman and C.P. Moran, Jr. 1989. Genetic evidence that RNA polymerase associated with  $\sigma^A$  uses a sporulation-specific promoter in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 9109-9113.
- Koehler, T.M. and C.B. Thurne. 1982. *Bacillus subtilis* (*natto*) plasmid pLS20 mediates interspecies plasmid transfer. *J. Bacteriol.* 169: 5271-5278.
- Kreft, J., J. Parrisios, K.J. Burger and W. Goebel. 1982. Expression and instability of heterologous genes in *Bacillus subtilis*. p. 145-172. In: Glanesan, A.T., S. Chang and J. Hoch (ed). *Molecular cloning and gene regulation in Bacillus*. Academic Press. New York.
- Kroos, L., B. Kunkel and R. Losick. 1989. Developmental regulatory protein from *Bacillus subtilis* switching RNA polymerase recognition specificity. *Science.* 243: 526-528.
- Kunkel, B., K. Sandman, S. Panzer, P. Youngman and R. Losick. 1988. The promoter for a sporulation gene in the *spoIVC* locus of *Bacillus subtilis* and its use in studies on temporal and spatial control of gene expression. *J. Bacteriol.* 170: 3513-3522.
- Kunkel, B., R. Losick and P. Stragier. 1990. The *Bacillus subtilis* gene for the developmental transcription factor  $s^K$  is generated by excision of a dispensable DNA element containing a sporulation recombinase gene. *Gene. Dev.* 4: 525-535.
- Kunst, F., M. Debarbouille, T. Msadek, M. Young, C. Mancel, D. Karamata, A. Kier and R. Dedonder. 1988. Deduced polypeptides encoded by the *Bacillus subtilis* *sacU* locus share homology with two component sensor-regulator systems. *J. Bacteriol.* 170: 5093-5101.
- LaBell, T.L., J.E. Trempey and W.G. Haldewang. 1987. Sporulation-specific  $\sigma$  factor  $\sigma^{29}$  of *Bacillus subtilis* is synthesized from a precursor protein P-31. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 1784-1788.
- Lin, F.J., K. Sperle and N. Sterenberg. 1985. Recombination in mouse L cells DNA introduced into cells and homologous chromosomal sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 1391-1395.
- Lopez, P., M. Espinoza and S.A. Lacks. 1984. Physical structure and genetic expression of the sulfonamide-resistance plasmid pLS80 and its derivatives in *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 195: 402-410.
- Losick, R and R. Pero. 1981. Cascades of sigma factors. *Cell* 25: 382-384.

- Losick, R. and P. Stragier. 1992. Criscross regulation of cell-type-specific gene expression during development in *B. subtilis*. *Nature* 355: 601-604.
- Lovett, P. and P. Ambulus, Jr. 1989. Genetic manipulation of *Bacillus subtilis*. p. 115-154. In: Harwood, C.R. (ed). *Bacillus biotechnology handbook*. vol 2. Plenum Press. New York.
- Mejean, V., J.-P. Claverys, H. Vasseghi and A. M. Sicard. 1981. Rapid cloning of specific DNA fragment of *Staphylococcus pneumoniae* by vector integration into the chromosome followed by endonucleolytic excision. *Gene* 15: 289-293.
- Mirel, D.B. and M.J. Chamberlin 1989. The *Bacillus subtilis* flagelin gene (*hag*) is transcribed by the  $\sigma^{28}$  form of RNA polymerase. *J. Bacteriol.* 171: 3095-3101.
- Moran C.P. Jr. 1992. Transcriptional regulation of gene expression in *Bacillus*. pp. 39-62. In: Doi, R. and M. McGloughlin (ed) *Biology of bacilli: applications to industry*. Butterworth-Heinemann. Stoneham, MA.
- Moran, C.P. Jr., N. Lang, S.F.J. LeGrice, G. Lee, M. Stephens, A.L. Sonenshein, J. Pero and R. Losick. 1982. Nucleotide sequences that signal the initiation of transcription and translation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 186: 339-346.
- Mountain, A. 1989. Gene expression systems for *Bacillus subtilis*. p. 73-114. In: Harwood, C.R. (ed) *Bacillus biotechnology handbook*, vol 2. Plenum Press. New York.
- Msadek, T., F. Kunt, A. Klier and G. Rapoport. 1991. DegS-DegU and ComP-ComA modulator-effector pairs control expression of the *Bacillus subtilis* pleiotropic regulatory gene *degQ*. *J. Bacteriol.* 173: 2366-2377.
- Mueller, J. P. and Sonenshein (1992). Role of the *Bacillus subtilis* *gsiA* gene in regulation of early sporulation gene expression. *J. bacteriol.* 174: 4374-4383.
- Mukai, K., M. Kawata and T. Tanaka. 1990. Isolation and phosphorylation of the *Bacillus subtilis* *degS* and *degU* gene products. *J. Biol. Chem.* 265: 20000-20006.
- Nagami, Y. and T. Tanaka. 1986. Molecular cloning and nucleotide sequence of a DNA fragment from *Bacillus natto* that enhances production of extracellular proteases and levansucrase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 166: 20-28.
- Neidhardt, F., J.L. Ingraham and M. Schaechter. 1990. *Physiology of the bacterial cell. A molecular approach*. Sinauer Associates, Inc. Publishers. Sunderland, Massachusetts.
- Niaudet, B., A. Goze and S.D. Ehrlich. 1982. Insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis*: mechanisms and use in gene cloning. *Gene* 19: 277-284.
- Niaudet, B. S., L. Janniere and S.D. Ehrlich. 1985. Integration of linear heterologous DNA molecules into the *Bacillus subtilis* chromosome mechanism and use in induction of predictable rearrangements. *J. Bacteriol.* 163: 111-1120
- Nomura. S., K. Yamane, T Sasaki, M. Yamasaki, G. Tamura and B. Maruo. 1988. Tunicamycin resistant mutants and chromosomal locations of mutational sites in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 136: 818-821.
- O'Kane, C., M.A. Stephens and D.J. McConnell. 1986. Integrable  $\alpha$ -amylase plasmid for generating random transcriptional fusions in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 168: 973-981.
- Ordal, G.W., H.M. Parker and J.R. Kirby. 1985. Complementation and characterization of chemotaxis mutants in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 164: 802-810.
- Ohta, Y. and M. Inouye. 1990. Pro-subtilisine E: purification and characterization of its autoprocessing to active subtilisine E *in vitro*. *Mol. Microbiol.* 4: 295-304.
- Paigen, K. 1963. Changes in the inducibility of galactokinase and  $\beta$ -galactosidase during inhibition of growth in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 77, 318-328.

- Park, S.-S., S.-L. Wong, L.-F. Wang and R.-H. Doi. 1989. *Bacillus subtilis* subtilisin gene (*aprE*) is expressed for a  $\sigma^A$  (sigma 43) promoter *in vitro* and *in vivo*. *J. Bacteriol.* 171: 2657-2665.
- Petit, M., G. Joliff, J. M. Mesas, A. Klier, G. Rapoport and S.D. Ehrich. 1990. Hyperproduction of a cellulase from *Clostridium thermocellum* in *Bacillus subtilis* by induction of chromosomal amplification. *Bio/Technology*. June: 559-563.
- Perego, M., G.B. Spiegelman and J.A. Hoch. 1988. Structure of the gene for the transition state regulator *abrB*: regulatory synthesis is controlled by the *spo0A* sporulation gene in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* 2: 689-699.
- Piggot, P.J., C.A.M. Curtis and H. de Lancastre. 1984. Use of integrational plasmid vectors to demonstrate the polycistronic nature of a transcriptional unit (*spolIA*) required for sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 130: 2123-2136.
- Piggot, P.J., J.W. Chapman and C.A.M. Curtis. 1985. Analysis of the control of *spo* gene expression in *Bacillus subtilis*. p. 15-21. In: Hoch, J.A. and P. Setlow (ed) *Molecular biology of molecular differentiation*. Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C.
- Power, S.D., R.M. Adams and J.A. Wells. 1986. Secretion and autoproteolytic maturation of subtilisin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 3096-3100.
- Priest, T.G. 1989. Products and applications. p. 293-322. In: Harwood, C.R. (ed). *Bacillus biotechnology handbook*. vol 2. Plenum Press. New York.
- Rincon, C., R. Quintero, and M. Salvador. 1994. Production of  $\beta$ -galactosidase with a chromosomal-recombinant strain of *Bacillus subtilis* grown in continuous culture. *J. Ferm. Bioeng.* (enviado a publicación).
- Romero, D. 1993. Comunicación personal.
- Rong, S., M.S. Rosenkrantz and A.L. Sonenshein. 1986. Transcriptional control of the *Bacillus subtilis* *spoIID* gene. *J. Bacteriol.* 165: 771-779.
- Rosenbluh, A., C.D.B. Banner, R. Losick and P.C. Fitz-James. 1981. Identification of a new developmental locus in *Bacillus subtilis* by a construction of a deletion mutation in a cloned gene under sporulation control. *J. Bacteriol.* 148: 341-351.
- Saito, H., H. Anzai and F. Kawamura. 1983. Multicopy integration vectors in *Bacillus subtilis*. p. 125-130. In: *Proc. 4th Int. Symp. Genet. Ind. Microorganisms*. Kodansha, Tokio.
- Sargent, M.G. and M.F. Bennett. 1985. Amplification of a major membrane-bound DNA sequence in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 161: 589-595.
- Seaward, M.R., I.T. Cross and B.A. Unsworth. 1976. Viable bacterial spores recovered from archaeological excavation. *Nature* 261:407-408.
- Shimotsu, H. and D.J. Henner. 1986. Modulation of *Bacillus subtilis* levansucrase gene expression by sucrose and regulation of the steady-state mRNA level by *sacU* and *sacQ* genes. *J. Bacteriol.* 168: 380-384.
- Skogman, G., J. Nilsson and P. Gustafsson. 1983. The use of a partition locus in increase stability of triptophan-operon-bearing plasmids in *Escherichia coli*. *Gene* 23: 105-115.
- Sthal, M.L. and E. Ferrari. 1984. Replacement of the *Bacillus subtilis* subtilisin structural gene with an *in vitro*-derived deletion mutation. *J. Bacteriol.* 158: 411-418.
- Shaw, W. 1983. Chloramphenicol acetyltransferase: Enzymology and molecular biology. *Crit. Rev. Biochem.* 14: 1-46.
- Stephens, M.A., N. Lang, K. Sandman and R. Losick. 1984. A promoter whose utilization is temporally regulated during sporulation in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 176: 333-348.
- Stragier, P. B. Kunkel, L. Kroos and P. Losick.

1989. Chromosomal rearrangement generating a composite gene for a developmental transcription factor. *Science* 243: 507-512.
- Strauch, M.A., M. Perego, D. Burbulys and J.A. Hoch. 1989. The transition state transcription regulator *AbrB* of *Bacillus subtilis* is autoregulated during vegetative growth. *Mol. Microbiol.* 3: 1203-1209.
- Strauch, M. and J.A. Hoch. 1992. Control of postexponential gene expression by transition state regulators. p. 105-121. In: Doi, R.H. and M. McGloughlin (ed). *Biology of bacilli: applications to industry*. Butterworth-Heinemann. Stoneham, MA.
- Struhl, K. 1983. The new yeast genetics. *Nature* 305: 391-397.
- Sun, D. P. Stragier and P. Setlow. 1984. Identification of a new sigma-factor which allows RNA polymerase to transcribe the *aprE* gene and other forespore specific genes during sporulation of *Bacillus subtilis*. *Genes. Dev.* 3: 141-149.
- Tanaka, T., M. Kawata and K. Mukai. 1991. Altered phosphorylation of *Bacillus subtilis* DegU caused by single amino acid changes in DegS. *J. Bacteriol.* 173: 5507-5515.
- teRiele, H., B. Michel and S.D. Ehrlich. 1986. Are single stranded circles intermediates in plasmid DNA replication? *EMBO J.* 5: 631-
- Trash, K. and J.A. Hoch. 1989. The *Bacillus subtilis* *spo0B* stage 0 sporulation operon encodes an essential GTP-binding protein. *J. Bacteriol.* 171: 1362-1371.
- Turner, S.M., J. Errington and J. Mandelstam. 1986. Use of a *lacZ* fusion to determine the dependence pattern of the sporulation operon *spoIIIC* in *spo* mutants of *Bacillus subtilis*: a branched pathway of expression of sporulation operons. *J. Gen. Microbiol.* 132: 2995-3003.
- Uhlen, M., J.I. Flock and L. Philipson. 1981. Rec E independent deletions of recombinant plasmids in *Bacillus subtilis*. *Plasmid* 5: 161-169.
- Valle, F. 1993. Comunicación personal.
- Valle, F. and E. Ferrari. 1989. Subtilisin: a redundantly temporally regulated gene? p. 131-146. In: Smith, I., R.A. Slepecky and P. Setlow. *Regulation of procaryotic development*. Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C.
- Vasantha, N. and E. Freese. 1980. Enzyme changes during *Bacillus subtilis* sporulation caused by deprivation of guanine nucleotides. *J. Bacteriol.* 144: 1119-1125.
- Votruba, J., J. Pazlarova, M. Dvorakova, K. Vanatalu, L. Vachova, M. Stradova, H. Kucerova and V. Chalovpka. 1987. External factors involved in the regulation of an extracellular proteinase synthesis in *Bacillus megaterium*. The effect of glucose and amino acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 26: 373-377.
- Wang, L.-F. and R.H. Doi. 1992. Heterologous gene expression in *Bacillus subtilis*. pp. 63-104. In Doi, R. and M. McGloughlin (ed) *Biology of bacilli: applications to industry*. Butterworth-Heinemann. Stoneham, MA.
- Wang, L.-F. and R.H. Doi. 1990. Complex character of *senS*, a novel gene regulating expression of extracellular-protein genes of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 172: 1939-1942.
- Wells, S.A., E. Ferrari, D. J. Henner, D.A. Estell and E.Y. Chen. 1983. Cloning, sequencing and secretion of *B. amyloliquefaciens* subtilisin in *B. subtilis*. *Nucleic Acids Res.* 11: 237-249.
- Wilson, C.R. and A.E. Morgan. 1985. Chromosomal-DNA amplification in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 163: 445-453.
- Wu, J.J., M.G. Haward and P.J. Piggot. 1989. Regulation of transcription of the *Bacillus subtilis* *spoIIA* locus. *J. Bacteriol.* 171: 692-698.
- Yamashita, S., H. Yashikawa, F. Kawamura, H. Takahashi, T. Yamamoto, Y. Kobayashi and H. Saito. 1986. The effect of *spo0* mutations on the expression of *spo0A*- and *spo0F-lacZ* fusions. *Mol. Gen. Genet.* 285: 28-33.

Yang, M., A. Galizzi and D. Henner. 1984. Nucleotide sequence of the amylase gene from *Bacillus subtilis*. *Nucleic Acid Res.* 11: 237-249.

Yang, M. A., H. Shimotsu, E. Ferrari and D.J. Henner. 1987. Characterization and mapping of the *Bacillus subtilis prtR* gene. *J. Bacteriol.* 169: 434-437.

Young, M. 1983. The mechanism of insertion of a segment of heterologous DNA in the chromosome of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1429-1512.

Young, M. 1984. Gene amplification in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 130: 1613-1621.

Young, M. and S. Ehrlich 1989. Stability of reiterated sequences in the *Bacillus subtilis* chromosome. *J. Bacteriol.* 171: 2653-2656.

Youngman, P., H. Poth, B. Green, K. York, G. Olmedo and K. Smith. 1989. Methods for genetic manipulation, cloning and functional analysis of sporulation genes in *Bacillus subtilis*. p. 65-87. In. Smith, I, A. Slepeky and P. Setlow (ed) Regulation of procaryotic development. Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C.

Zheng, I. and R. Losick. 1990. Cascade regulation of spore coat gene expression in *Bacillus subtilis*. *J. Mol. Biol.* 212: 645-660.

Zuber, P., J. Healy, H.L. Carter III, S Cutting, C.P. Moran, Jr. and R. Losick. 1989. Mutation changing the specificity of an RNA polymerase sigma factor. *J. Mol. Biol.* 206: 605-614.

Zuber, P. and R. Losick. 1983. Use of a *lacZ* fusion to study the role of the *spo0* genes of *Bacillus subtilis* in developmental regulation. *Cell* 35: 275-283.

# ANEXO

## Overproduction of $\beta$ -galactosidase from *Escherichia coli* in *Bacillus subtilis*

Miguel Salvador, Rodolfo Quintero and Fernando Valle\*.  
Instituto de Biotecnología, UNAM.  
Cuernavaca, Mor., 62271, México.

### SUMMARY

We have constructed a *Bacillus subtilis* strain that overproduces the  $\beta$ -galactosidase ( $\beta$ -gal) enzyme from *Escherichia coli* when the culture reaches the stationary phase. In order to transcribe the *E.coli lacZ* gene, the regulatory region of the gene coding for subtilisin (*aprE*) was utilized. A *sacU32(Hy)* mutation was also used to increase gene expression 30-fold over the levels expressed in the wild-type strain. The constructed transcriptional/translational fusion was inserted into the *B. subtilis* chromosome by a single cross-over event to allow the selection for better  $\beta$ -gal producers. The insertion was selected by isolating cells that could grow in higher chloramphenicol (Cm) concentrations. This selection scheme, increased the  $\beta$ -gal levels six-fold. Our production system was stable for at least 50 generations in the absence of antibiotic selective pressure.

### INTRODUCTION

Members of the genus *Bacillus* have been used in a wide range of industrial processes, including the production of several types of enzymes, antibiotics, fine chemicals and insecticides (1). Their capacity to secrete large quantities of protein to the medium, under simple growth conditions, and a proven safety record, have made them good candidates for production of heterologous proteins (2).

\*Dr. Fernando Valle. Dpto. de Biología Molecular, Instituto de Biotecnología, UNAM. Apartado Postal 510-3. Cuernavaca, Mor., 62271, México. Tel: (52)(73)114900. Fax (52)(73)172399

Despite its apparent advantages, the use of *Bacillus* for the production of heterologous proteins at a commercial level has been limited. One of the reasons for this limitation is that there are several factors affecting the final yield in these microorganisms: i) the production of several intra-, and extracellular proteases, ii) low stability of plasmid vectors, and iii) limited information in the scientific literature about the best strategies to overproduce heterologous proteins (3,4). *B.subtilis* has been a paradigm for the genetics of gram-positive bacteria. The knowledge of its

genetic organization at the molecular level is only surpassed by that of *E. coli* (3). Several heterologous genes have been expressed in *B. subtilis* for academic purposes and, as a first approach, replicating plasmids have been used to carry cloned genes of interest (5, 6). However, plasmid instability has led to the search of other cloning strategies. As a result, integration of heterologous genes into the chromosome emerged as an alternative (4, 7-10). Chromosomal integration, by a single or double crossover DNA recombination, has also been used as a tool for studying gene regulation and amplification mechanisms (11).

The ability of *B. subtilis* to amplify DNA regions flanked by direct repeat sequences has been exploited to increase gene expression. The most common approach has been to include in the region to be amplified, an antibiotic-resistance marker, and then to select strains resistant to higher antibiotic concentrations. In practice, the selected survivors have amplified the antibiotic marker DNA and all the other sequences contained within the direct repeats (11). Although the stability of the integrated vector and the relationship between amplification and selective pressure has been investigated, few reports exist about the use of

this alternative to overproduce proteins of commercial interest. (1, 11-13).

In this paper we report the intracellular overproduction of the *E. coli*  $\beta$ -gal in *B. subtilis*. Our system uses the promoter of the *aprE* gene, which codes for subtilisin, to transcribe the *lacZ* gene. This fusion was integrated into the *B. subtilis* chromosome. The final production strain also carries the *sacU32*(Hy) allele which increases the transcriptional level of the *aprE* gene (14). To further increase  $\beta$ -gal production, we also took advantage of the ability of *B. subtilis* to amplify DNA regions flanked by direct repeats.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Bacterial strains and media.**

*B. subtilis* BG125 (*hisA1*, *thr-5*, *trpC2*) (15), *B. subtilis* BIBT-10 (*sacU32*(Hy), *thr-5*, *trpC2* :: pAprlac2), *B. subtilis* BIBT-1 (*hisA1*, *thr-5*, *trpC5* :: pAprlac2) and *E. coli* JM101 strains were used in this work. *Bacillus* strains were cultured in Schaeffer's sporulation medium (SM) (16). *E. coli* strain was cultured in Luria-Bertani media. Two percent agar was used for preparing solid media.

### **Culture conditions.**

For shake-flask experiments, 500-ml flasks with 100 ml of SM were employed and after inoculation,

they were incubated at 37°C at 200 rpm. For fermentor cultures, a 14-l fermentor (New Brunswick, Microgen, Edison NJ) equipped with three Rushton impellers, working at 400 rpm, one volume of air per minute per volume of medium (1 vvm) of aeration, 37°C and pH 7.3 was used.

#### **β-galactosidase assay.**

Samples (2 ml) were withdrawn every hour and subjected to centrifugation at 13,000 x g for 5 min. Pellets were resuspended in saline solution (NaCl 0.8 %). Aliquots of 20 μl were added to 710 μl of Z Buffer (17) and incubated at 37°C for 10 min with lysozyme (2 mg/ml). After treating the cells with Triton X-100 (0.1% v/v), β-gal activity (U) measurements were done as described elsewhere (17). β-gal specific activity was obtained referring volumetric activity to protein concentration. One unit of β-gal activity was defined as one nmol of o-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) hydrolysed at 37°C.

#### **Protein assay.**

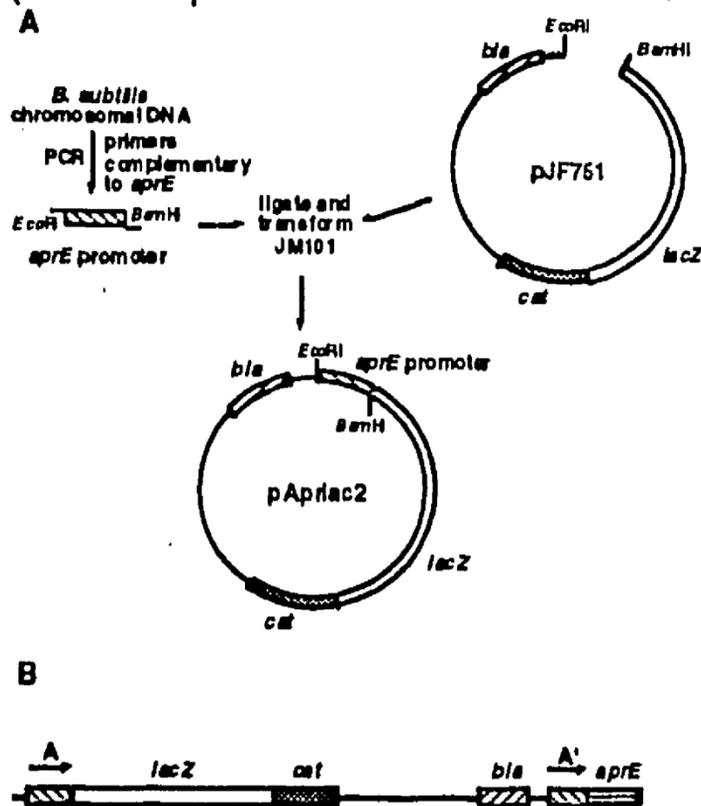
Protein concentration was determined by the method of Lowry (18).

## **RESULTS AND DISCUSSION**

**Strain construction.** To obtain expression of the *E. coli lacZ* gene in *B. subtilis*, we constructed a

transcriptional-translational fusion ligating an *EcoRI-BamHI* DNA fragment carrying the *E. coli lacZ* gene from plasmid pJF751 (15), with a 660 bp DNA fragment containing the *aprE* regulatory region, its ribosome binding site and the DNA region that codes for the first eight amino acids of preprosubtilisin. Ligated DNA was transformed into competent JM101 *E. coli* cells. Transformants were selected by plating on Luria agar plates containing 200 mg/mL of ampicillin (Ap) and 5-bromo-4-chloro-3-indoyl-β-D-galactopyranoside (X-gal). Ap-resistant, blue colonies, were screened for the presence of plasmids. One plasmid with the pAprlac2 (Fig.1A). This construction is similar to one previously reported (15), except that in our case, the DNA fragment carrying the *aprE* promoter was obtained by synthesis with the DNA polymerase chain reaction (PCR), from *B. subtilis* chromosomal DNA. The 3' PCR primer used was designed in such a way to introduce a restriction site which would allow to place the *lacZ* gene in frame with the eighth codon of the *aprE* signal sequence (data not shown). Plasmid pAprlac2 does not replicate in *B. subtilis* after transformation. However, it is able to integrate into the chromosome by a single crossover event, with the homologous *aprE*

chromosomal sequence. Figure 1B shows a schematic representation of the integration of pAprlac2 into the chromosomal *aprE* region. As a result, the *lacZ* and *cat* (chloramphenicol



**Fig. 1. (A)** Recombinant DNA strategy utilized for the cloning and expression of the *E. coli lacZ* gene under the control of the *B. subtilis aprE* promoter. The recombinant plasmid was constructed following standard protocols (27). All the methodologies used in *B. subtilis* were as reported by Harwood and Cutting (15). **(B)** Schematic representation of pAprlac2 integration into the *aprE* region of the *B. subtilis* chromosome. Only relevant regions are shown. A, A' arrows, indicate the two direct repeats of the *aprE* promoter region (hatched boxes), generated by the recombination event. The figure is not drawn to scale.

acetyltransferase) genes are flanked by a direct repeat of the *aprE* promoter region. This

structure allows the selection for amplification of this DNA region (due to the direct repeats), by growing the cells in presence of higher Cm concentrations (see below).

Plasmid pAprlac2 was used to transform *B. subtilis* strain BG125 (15), which carries a *hisA1* mutation. Transformants were selected on SM plates containing X-gal and Cm (5 mg/l). All Cm resistant (Cm<sup>R</sup>) colonies showed a blue phenotype on these plates, indicating that the *lacZ* and Cm markers were simultaneously transferred. One colony, named BIBT-1, was used for the next step on strain construction.

The *sacU32(Hy)* is a well-known mutation that increases *aprE* expression. However, it also confers a non-transformable phenotype (19). Therefore, the *sacU32(Hy)* mutation has to be introduced into the production strain as the last step in strain construction. In our case, this was done by using PBS1 transduction and selecting for a His<sup>+</sup> phenotype, because it is known that the *sacU32(Hy)* cotransduces with the *his*-marker (14). The resulting recombinant strain Cm<sup>R</sup>, *lacZ*, *sacU32(Hy)* was named BIBT-10.

In order to measure the level of  $\beta$ -gal production and growth kinetics of the BIBT-10 strain, a single colony from a fresh streak was used to inoculate liquid SM media. Growth

and  $\beta$ -gal specific activity were measured every hour. As shown figure 2,  $\beta$ -gal production starts at the end of the exponential growth. Maximal  $\beta$ -gal specific activity was 2980 U per mg protein, and it was obtained two hours after the onset of the stationary phase. This activity was 30-fold higher than that produced by a BIBT-1 strain, which does not carries the *sacU32(Hy)* mutation.

**Increasing  $\beta$ -galactosidase production by selecting strains able to grow at different Cm concentrations.**

Since the integration of the *lacZ* gene into the *B. subtilis* chromosome occurred by a simple crossover event, we expected that the two direct repeats flanking the *lacZ* and *cat* genes (figure 1B), should be able to promote gene amplification. To select for amplification, initially we tried to select *B. subtilis* cells that were able to grow in 10, 20, 40, 80 and 100 mg/l of Cm. After 18 h of incubation, no growth was detected on SM supplemented with more than 10 mg/l of Cm. Based on these results, we decided to carry out the same experiment by challenging the cells with incremental amounts of antibiotic concentration. First, single colonies from cultures with 10 mg/l of Cm were streaked on solid media containing 20 mg/l of Cm.

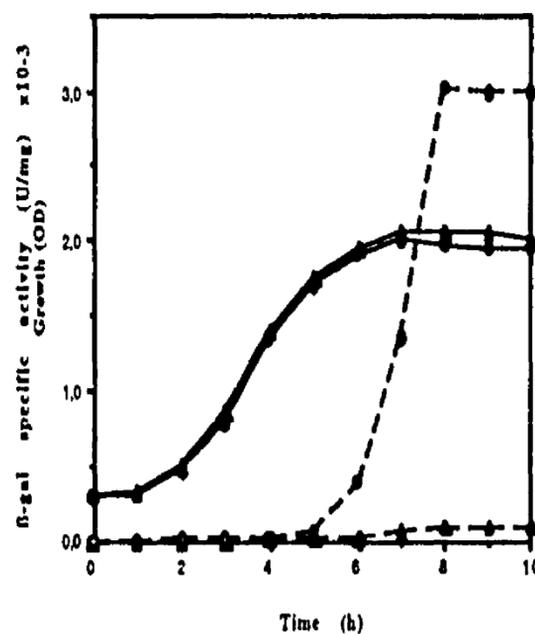


Fig. 2. Growth (—) and  $\beta$ -gal specific activity (--) kinetics of BIBT-10 (o) and BIBT-1 ( $\Delta$ ) strains. BIBT-10 strain is a *sacU32(Hy)* derivative of BIBT-1. Cells were grown in 500-ml flasks with 100 mL of SM and 5 mg/l of CM. After inoculation, they were incubated at 37°C at 200 rpm. OD was measured at 525 nm.

After 18 h of incubation, visible cell growth was detected, suggesting that the microorganism needed an adapting period to grow in the presence of Cm concentrations above 10 mg/l. Using this procedure (a colony previously adapted to a determined Cm concentration, and then streaked on a plate containing a higher Cm concentration) in repeated assays, we could obtain growth on plates containing up to 80 mg/l of Cm (Table 1). No growth was achieved at 100 mg/l of Cm.

In order to determine the  $\beta$ -gal production potential of these

preselected cells, one colony of each antibiotic concentration was used to inoculate tubes of SM medium supplemented with the same concentration of Cm used during preselection steps. After 12 h of cultivation at 37°C, these cultures were used to inoculate different flasks (containing the same amount of Cm), and  $\beta$ -gal levels and growth kinetics were measured. The  $\beta$ -gal specific activity obtained in cultures with 5 mg/L of Cm was considered as 1.

**Table 1.** Selection scheme to isolate cells capable to grow in medium with higher Cm concentrations<sup>a</sup>.

Preselection condition <sup>b</sup>	Cm (mg/l)					
	5	10	20	40	80	100
5	+	+	-	-	-	-
10	+	+	+	-	-	-
20	+	+	+	+	-	-
40	+	+	+	+	+	-
80	+	+	+	+	+	-

<sup>a</sup>Strains were streaked on SM plates with 2% agar (Cm was used as needed) and incubated 18 hours at 37°C.

(+) visible growth; (-) no visible growth.

<sup>b</sup>Cm concentration at which cells were grown before streaking.

Regardless of whether the Cm concentration was varied from 0 to 10 mg/l, the maximum  $\beta$ -gal

specific activity remained constant (Figure 3A). However, when Cm concentration was varied from 10 to 80 mg/l, a six-fold increase in activity was observed. Theoretically, this increase is due to an elevation in gene dosage. However, this was not confirmed experimentally.

The specific growth rate ( $\mu$ ) and the biomass production in these cultures were also calculated. Both parameters decreased as the Cm concentration increased (Table 2). These differences may be the result of different amounts of acetyl-CoA used for Cm acetylation (20). It is important to emphasize that this reaction removes the acetyl moiety of acetyl-CoA from cell metabolism, with the consequent loss of carbon, NADH, and ATP production.

### Stability of the production strains.

In fermentation processes, one of the major concerns regarding the use of recombinant microorganisms is the stability of heterologous genes. In replicative plasmids, this stability depends on the type of cloning vector used, the gene(s) expressed, host characteristics and fermentation conditions. In contrast, it has been reported that heterologous DNA integrated into the *Bacillus* chromosome remains stable (21-23). We were

**Table 2.** Specific growth rate, biomass production and maximal  $\beta$ -gal specific activity of strain BIBT-10 grown in different Cm concentrations<sup>a</sup>

Cm (mg/l)	Specific Growth Rate <sup>b</sup> (1/h)	Biomass <sup>c</sup> (g/l)	Maximum $\beta$ -gal specific activity* (U/mg of protein)
5	0.54	2.6	2970
10	0.52	2.5	3002
20	0.49	2.4	6130
40	0.47	2.3	11950
80	0.44	2.0	18340

<sup>a</sup>Cultures and assays were carried out as described in Materials and Methods. Cm was used as needed according to the experimental design.

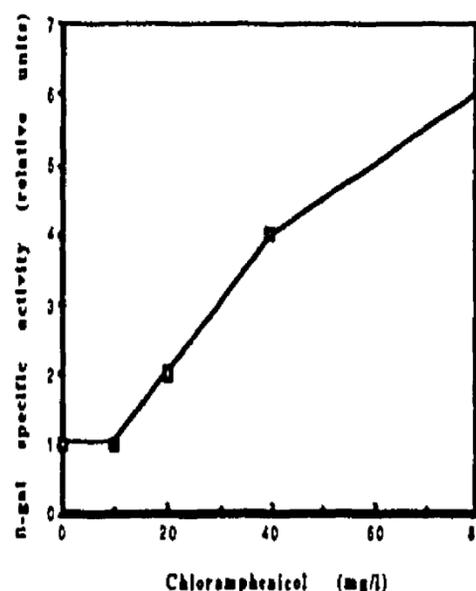
<sup>b</sup>Specific growth rate was calculated during exponential growth.

<sup>c</sup>Cell dry weight was calculated from a standard curve.

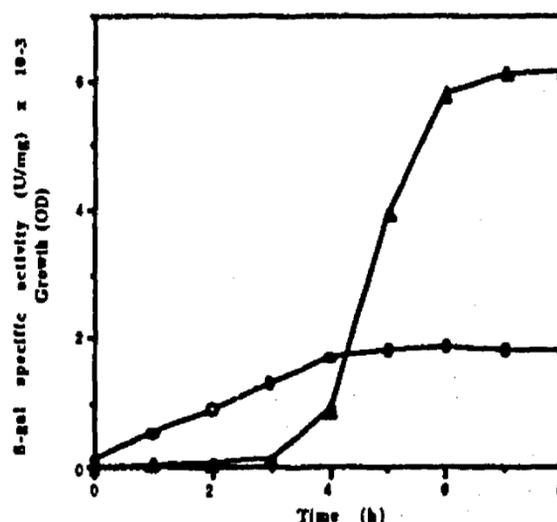
\*Average of three experiments.

interested in analyzing the stability of our  $\beta$ -gal production system. This was done by measuring  $\beta$ -gal production after subculturing the cells in liquid media, for approximately 50 generations in the absence of Cm. Under these conditions, we found that the ability of the cells to overproduce  $\beta$ -gal remained constant (data not shown). Further evidence in this regard was obtained by randomly testing 200 colonies for their ability to form blue colonies, on X-gal plates at the end of each experiment. We found that in every case all the colonies were blue, indicating that at least one copy of the  $\beta$ -gal gene was still present (data not shown). Another interesting conclusion from these

A



B



**Fig. 3.** (A) Maximum relative  $\beta$ -gal specific activity produced by BIBT-10 strain as a function of Cm concentration in the preselection culture medium. (B) Growth (o) and  $\beta$ -gal ( $\Delta$ ) production kinetics of BIBT-10 in a 14-l fermentor. Cells were preselected on 20 mg/l of Cm and grown in the fermentor without Cm.

experiments is that after we selected one strain on high Cm concentrations and obtained a better  $\beta$ -gal producer, the cell population kept this property for

at least 50 generations.

#### **Scaling-up the process.**

Our production system was tested under controlled conditions. We scaled-up the process up to 14 l, using cells selected on 20 mg/l of Cm. Fermentations were performed using standard conditions, 400 rpm, 1 vvm of aeration, 37°C and a 7.3 initial pH. In these experiments oxygen did not drop more than 50%. The results of this experiments are shown in Figure 3B. As can be seen, the biomass and  $\beta$ -gal specific activity were similar to those observed in shake flasks experiments. However, the fermentation time was shorter. The reduction in fermentation time, and thus an increase in  $\mu$ , did not change the production profile, nor the maximal enzyme activities obtained. Variation in the fermentation conditions, from shake flask to the 14-l fermentor, basically mass transfer coefficient and mixing processes, did not affect the efficiency nor the stability of the recombinant microorganisms used in this study.

The results presented in this paper demonstrate that the subtilisin promoter, combined with proper mutations in the host, inoculum preparation, and fermentation conditions, is able to drive the synthesis of a heterologous protein to high

levels. In this sense, there are several reports of  $\beta$ -gal production in *E. coli*. The most recent one (24) contains the combined use of a multicopy plasmid, the  $P_L$  promoter, temperature shifts to induce transcription, and pH changes during fermentation; this results in the obtention of 4,757 U per ml of culture after 24 hours of fermentation. Our system reported here, produced 22,000 U per ml, in a 10 hour fermentation, without the need of any induction scheme.

Furthermore, we believe that the process described in this paper is still susceptible of improvement by optimization of the fermentation process, and by using other *B. subtilis* mutations that are known to increase *aprE* transcription, like *hpr-92* or *sacQ36* (14, 25). Also, the use of *spo-* mutants could increase the production during stationary phase (26).

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Dr. X. Soberón and Dr. B. Becerril for helpful discussions, and Dr E. Ferrari for donating the BG125 strain and helpful discussions. Part of this work was supported by grant 0250-N9107 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), México.

## REFERENCES

1. Zukowski, M.: Production of commercially valuable products. In: *Biology of Bacilli. Applications to industry* (Doi, R., McGloughlin, M., eds.), Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA, pp. 311-338, 1992.
2. Slepecky, R.: What is a *Bacillus*? In : *Biology of Bacilli: Applications to industry* (Doi, J., McGloughlin, M., eds.), Butterworth-Heinemann, Stoneham, MA, pp. 1-21, 1992.
3. Harwood, C. 1992. *Bacillus subtilis* and its relatives: molecular biological and industrial workhorses. *TIBTECH* 10 : 247-256.
4. Ferrari, E., Jannagin, A. E. and Schmidt, B. F. Commercial production of extracellular enzymes. In : *Bacillus subtilis* and other gram-positive bacteria (Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., Losick, R., eds.), Am Soc. Microbiology, Washington, D.C., pp. 917-938, 1993.
5. Corfield, V., Sugrue, A. and Thomson, J. Towards an understanding of hybrid plasmid instability in *Bacillus subtilis*. In : *Recombinant DNA and bacterial fermentation* (Thomson, J., ed.), CRC Press, Inc. Boca Raton, FLA, pp. 23-44, 1988.
6. Watson, T., Louw, M., Traub, J. and Thomson, J.: Plasmid instability during scale-up of recombinant DNA-containing bacteria. In : *Recombinant DNA and bacterial fermentation* (Thomson, J., ed.), CRC Press, Inc. Boca Raton, FLA, pp. 45-64, 1988.
7. Galizzi, A., Milanesi, S. and Albertini, A. 1981. Integration and excision of a plasmid in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 182 : 99-105.
8. Young, M. 1983. The mechanism of insertion of a segment of heterologous DNA into the chromosome of *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 129 : 1497-1511.
9. Niaudet, A., Janni re, L. and Ehrlich, S. 1985. Integration of linear heterologous DNA molecules into the *Bacillus subtilis* chromosome: Mechanism and use in induction of predictable rearrangements. *J. Bacteriol.* 163 : 111-120.
10. Dowds, B., O'Kane, C., Gormley, E., McConell, D. and Devine, K.: Integrating plasmids in the genetic engineering of Bacilli. In : *Recombinant DNA and bacterial fermentation* (Thomson, J., ed.), CRC Press, Inc. Boca Raton, FLA, pp. 137-156, 1988.
11. Albertini, A. and Galizzi, A.

1985. Amplification of a chromosomal region in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 162 : 1203-1211.
12. Wong, S., Kawamura, F. and Doi, R. 1986. Use of the *Bacillus subtilis* subtilisin sigma peptide for efficient secretion of TEM  $\beta$ -lactamase during growth. J. Bacteriol. 168 : 1005-1009.
13. Petit, M., Joliff, G., Mesas, J., Klier, A., Rapoport, G. and Ehrlich, S. 1990. Hypersecretion of a cellulase from *Clostridium thermocellum* in *Bacillus subtilis* by induction of chromosomal amplification. Biotechnol. June : 559-563.
14. Henner, D., Ferrari, E., Perego, M and Hoch, J. 1988. Location of the targets of the *hpr-97*, *sacU32*(Hy) and *sacQ36* (Hy) mutations in upstream regions of the subtilisin promoter J. Bacteriol. 170 : 296-300.
15. Ferrari, E., Howard, S. and Hoch, J. 1986. Effect of stage 0 sporulation mutations on subtilisin expression. J. Bacteriol. 166 : 173-179.
16. Harwood, C. and Cutting, S. Molecular biological methods for *Bacillus*. John Wiley & Sons Ltd. Chichester, England, 1990
17. Miller, J. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York, NY, 1972.
18. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. and Randall, R. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 191 : 265-275.
19. Kunst, F., Pascal, M., Lepesant-Kejzlarova, J., Lepesant, J-A., Billault, A. and Dedonder, R. 1974. Pleiotropic mutations affecting sporulation conditions and the synthesis of extracellular enzymes in *Bacillus subtilis* 168. Biochimie 56 : 1481-1489.
20. Shaw, W. 1983. Chloramphenicol acetyltransferase: Enzymology and molecular biology. Crit. Rev. Biochem. 14 : 1-46.
21. Ferrari, E. and Hoch, J. System for complementation and dominance analysis in *Bacillus*. In : Molecular cloning and gene regulation in Bacilli (Ganesan, A. T., Chang, S., Hoch, J. A., eds.), Academic Press, New York, NY, 53-61, 1982.
22. Janni re, L., Niaudet, B., Pierrs, E. and Ehrlich, S. 1985. Stable gene amplification in the chromosome of *Bacillus subtilis*. Gene 40 : 47-55.
23. Young, M. and Ehrlich S. 1989.

Stability of reiterated sequences in the *Bacillus subtilis* chromosome. J. Bacteriol. 171 : 2653-2656.

24. Horjuchi, J.-I., Kamasawa, M., Miyakawa, H., Kishimoto, M. and Momose, H. 1993. Effective  $\beta$ -galactosidase production by recombinant *Escherichia coli* based on culture phase identification using fuzzy set theory. J. Ferm. Biotechnol. 76 : 382-387.

25. Ferrari, E., Henner, D., Perego, M. and Hoch, J. 1988. Transcription of *Bacillus subtilis* subtilisin and expression of subtilisin in sporulation mutants. J. Bacteriol. 170 : 289-295.

26. Pierce, J. A., Robertson, C. and Leighton, T. 1992. Physiological and genetic strategies for enhanced subtilisin production by *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Prog. 8 : 211-218.

27. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. Molecular cloning: A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York, NY, 1989.