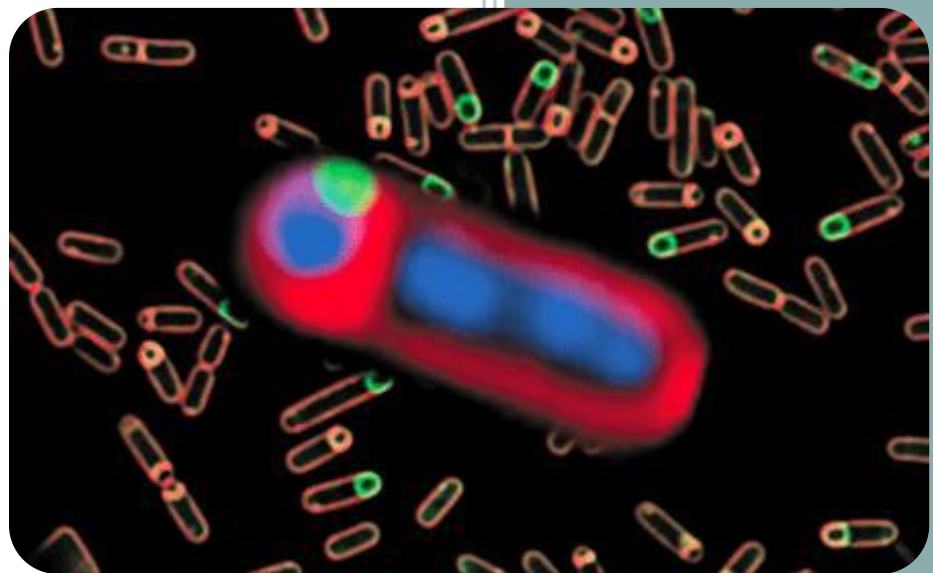


Spo0A: MÁS ALLÁ DE LA ESPORULACIÓN EN BACILLUS



Marcos Rodríguez Lancharro

Facultad de Farmacia



REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Spo0A: MÁS ALLÁ DE LA ESPORULACIÓN EN BACILLUS

Marcos Rodríguez Lancharro

GRADO EN FARMACIA

FACULTAD DE FARMACIA, UNIVERSIDAD DE SEVILLA

TUTOR: ALBERTO GARCÍA QUINTANILLA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

TRABAJO FIN DE GRADO (REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA)

FECHA DE LA CONVOCATORIA: 17 DE JUNIO 2019

SEVILLA



1. RESUMEN

Cuando hablamos de supervivencia entre bacterias, uno de los mejores ejemplos es la bacteria del suelo *Bacillus subtilis*. Esta bacteria es capaz de hacer frente a situaciones extremas en cuanto a nutrientes y condiciones ambientales. Para ello, no solo guarda un as en la manga, como se suele decir, sino vario de ellos.

Al frente de estos recursos se encuentran una serie de proteínas reguladoras. En este trabajo nos centraremos en la proteína Spo0A, que desempeña un papel regulador central.

La proteína Spo0A es un regulador transcripcional que por sí sola no tiene función alguna, en cambio, una vez fosforilada se activa. La activación depende de las señales internas y externas recibidas que son integradas en un mecanismo de transferencia de fosfatos denominado “phosphorelay”, cuyo aceptor final es la proteína Spo0A quedando activada (Spo0A~P).

Las señales detectadas aumentan progresivamente los niveles de Spo0A~P conforme las condiciones se vuelven más severas, a la vez que se van desbloqueando los recursos que *B. subtilis* guarda para su supervivencia. Al principio, cuando los niveles son bajos, se da la expresión de genes con alta afinidad, tales como los genes formadores de biopelículas o biofilms, y los genes que regulan el canibalismo. Más adelante, cuando la bacteria no puede sobrevivir con estas tácticas, tiene lugar un aumento abrupto en los niveles de la proteína fosforilada que desencadena la expresión de los genes que inician la esporulación.

B. subtilis utiliza la esporulación como último recurso, por lo que su regulación debe estar estrictamente controlada, puesto que es un proceso muy costoso en tiempo y energía, y que una vez comienza, es irreversible, situando en una posición crítica a nuestra bacteria que se debate entre la vida y la muerte.

ÍNDICE

1. RESUMEN	3
2. INTRODUCCIÓN	5
3. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN.....	8
4. METODOLOGÍA.....	8
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	8
5.1. PROTEÍNA Spo0A.....	8
5.1.1. ¿Qué es la proteína Spo0A?	8
5.1.2. SÍNTESIS: expresión de la proteína Spo0A. Mecanismo de “cambio de promotor” ...	9
5.1.3. REGULACIÓN: mecanismo de control “Just-in-time”	11
5.1.4. ACTIVACIÓN: “Phosphorelay multicomponente”	13
5.2. BIOPELÍCULAS O BIOFILMS.....	19
5.2.1. Regulación de la formación de biopelículas.....	20
5.3. CANIBALISMO.....	22
5.3.1. Regulación del canibalismo.....	23
5.4. ESPORULACIÓN	23
5.4.1. Proceso de la formación de espora.....	24
5.4.2. Regulación de la esporulación.....	26
6. CONCLUSIONES	28
7. BIBLIOGRAFÍA.....	29

2. INTRODUCCIÓN

Desde hace miles de millones de años, los organismos microscópicos llevan colonizando el planeta en el cual vivimos. Estos seres son capaces de adaptarse a los diferentes entornos, cualquiera que sean sus condiciones ambientales y nutricionales, entre ellos se encuentran las bacterias. Las bacterias son microorganismos unicelulares procariontes, ya que carecen de orgánulos y núcleo definido, cuyo tamaño oscila entre los 0,5-5 micrómetros, con formas muy diversas, como esferas (cocos), barras (bacilos), sacacorchos (vibrios) y hélices (espirilos). Sus formas de intercambio de información pueden ser muy diversas, tales como la conjugación (célula-célula a través de un pili), la transducción (mediante bacteriófago), la transformación o la fisión binaria. Con respecto a su crecimiento cabe destacar que está compuesto por 4 etapas bien definidas como vemos en la figura 1. En primer lugar tenemos la etapa de latencia, la cual representa un periodo de transición para los microorganismos que se encuentran en una nueva condición, en esta fase no hay incremento de células. A continuación viene la etapa de crecimiento exponencial o logarítmica, en la que los microorganismos crecen exponencialmente. Acto seguido encontramos la fase estacionaria en la que se agotan los nutrientes esenciales y se acumulan productos tóxicos, ya que el número de células es elevado. Por último encontramos la fase de muerte, en la que disminuye progresivamente el número de células viables.

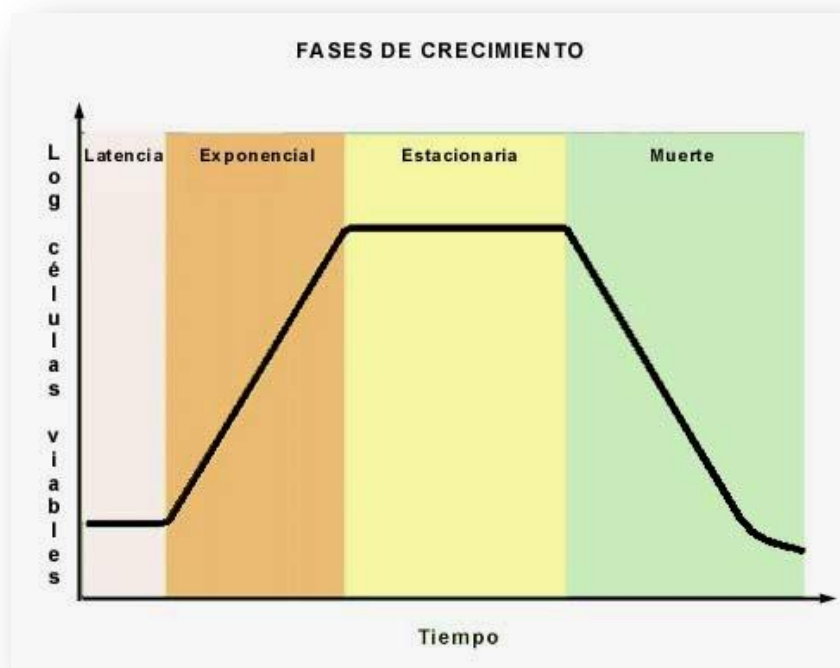


FIGURA 1. Fases de crecimiento en una bacteria.

En este trabajo nos centraremos en una bacteria en particular, *Bacillus subtilis*, considerada un paradigma para el estudio de procesos de diferenciación, regulación de la expresión genética y de morfogénesis celular (Castilla, 2008), además de su capacidad para esporular. Estas peculiaridades, junto al hecho de ser una bacteria prácticamente no patógena y de fácil crecimiento en medios baratos, han propiciado que sea utilizada desde hace muchos años como un sistema modelo en biología.

B. subtilis pertenece al dominio Bacteria, filo Firmicutes, clase Bacilli, orden Bacillales, familia Bacillaceae, género *Bacillus*, especie *Bacillus subtilis*. Es una bacterias Gram-positiva, con forma de bastón. Se desarrolla en condiciones aerobias, aunque actualmente sabemos que es capaz de hacerlo también en condiciones anaeróbicas. En 1997 tuvo lugar la secuenciación de su genoma, protagonizada por un consorcio europeo/japonés. A este genoma se le denominó 168, y está disponible en el *Bacillus subtilis* Genetic Stock Center (1ª700). El genoma de esta estirpe consiste en una molécula de ADN circular de doble cadena de 4.214.810 pares de bases (pb) (Castilla,2008).

Es un organismo muy ubicuario, estando presente en multitud de lugares como el agua, sedimentos acuáticos, aire, residuos vegetales, tracto digestivo humano y de animales, incluso en condiciones extremas parecidas a las encontradas en el espacio exterior, siendo su nicho natural el suelo (Nicholson et al., 2000). En el suelo las condiciones son muy cambiantes en cuanto a nutrientes y factores ambientales, lo que ha permitido a la bacteria adaptarse y desarrollar diferentes estrategias de supervivencia para responder a estos cambios. Éstas van desde su capacidad de movimiento en busca de nuevas fuentes nutritivas (Castilla, 2008; Szurmant y Ordal, 2004), a la capacidad de entrar en un estado de competencia natural en el cual puede captar ADN exógeno e integrarlo en su genoma mediante recombinación homóloga (Castilla, 2008; Claverys et al., 2006). Otra de las adaptaciones es el llamado canibalismo entre bacterias de una misma especie, durante el cual algunas bacterias de la población son capaces de provocar la lisis de otras bacterias de su especie para poder hacer uso de los nutrientes que liberan (Castilla, 2008; Gonzalez-Pastor et al., 2003). Además, al igual que muchas otras bacterias, ha desarrollado un comportamiento social por el cual las células son capaces de comunicarse entre ellas dando lugar a estructuras multicelulares como son los “enjambres de células o swarming” (Castilla, 2008; Kearns y Losick, 2003) y las “biopelículas” (Castilla, 2008; Kearns et al., 2005), siendo esta adaptación la más común para crecer en condiciones naturales (Castilla, 2008). Como última opción de supervivencia frente a condiciones adversas está el proceso de esporulación que da como resultado la formación de esporas altamente

resistentes, pudiendo permanecer en estado de latencia durante largos períodos de tiempo (Castilla, 2008; Piggot y Hilbert, 2004).

Todas estas estrategias forman diferentes subpoblaciones de células especializadas que coexisten dentro de comunidades altamente estructuradas. La coordinación y la interacción entre estos tipos de células requiere una comunicación extracelular extensa dirigida principalmente por la detección de señales secretadas autogeneradas. Estas señales extracelulares activan un conjunto de cinasas sensoras, que responden mediante la fosforilación de tres proteínas reguladoras principales: DegU, ComA y Spo0A. Cada regulador fosforilado activa un programa de diferenciación específico al mismo tiempo que reprime otros. Esto permite a *B. subtilis* diferenciarse en respuesta a una señal específica, incluso en presencia de otras señales que puedan interferir (López y Kolter, 2010).

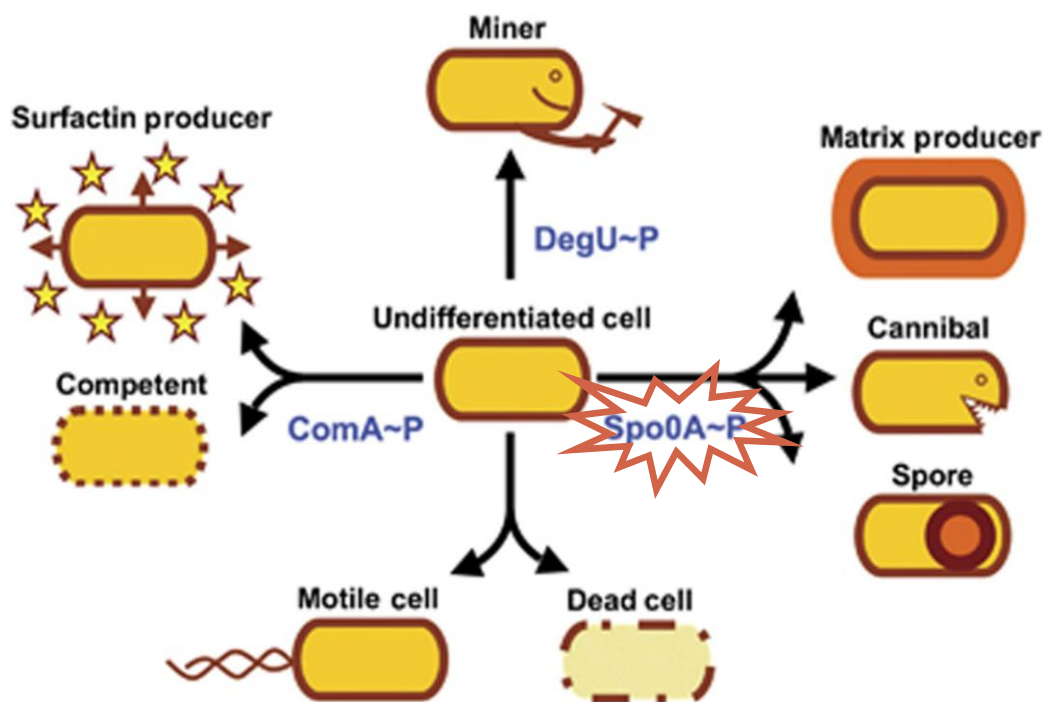


FIGURA 2. Representación esquemática de los distintos tipos de células que se diferencian en las comunidades de *B. subtilis* (López y Kolter, 2010).

Aquí vamos a tratar una serie de adaptaciones con un valor muy importante en la supervivencia de *B. subtilis* que son la formación de biopelículas o biofilms, el canibalismo y, en último lugar, no por ello menos importante, el complicado proceso de esporulación. La capacidad de decidir entre los diferentes destinos celulares tiene lugar al final de la fase de crecimiento exponencial, y en el corazón de la toma de decisiones se encuentra la proteína reguladora de respuesta Spo0A (Chastanet y Losick, 2011).

3. OBJETIVOS DE LA REVISIÓN

El objetivo de éste trabajo es realizar una revisión bibliográfica que nos ayude a comprender la importancia de la proteína reguladora Spo0A en la supervivencia de la bacteria del suelo *Bacillus subtilis*. Para ello se han desarrollado los conceptos básicos y específicos que permiten su comprensión.

4. METODOLOGÍA

Para la elaboración de este trabajo se realizó una revisión bibliográfica cuya información se obtuvo principalmente de la base de datos MEDLINE (a través del buscador de libre acceso PubMed) y de varias tesis en las que se abordan los temas a tratar.

La base de datos fue seleccionada por su amplia cobertura de artículos científicos y su constante actualización. Para la búsqueda, se incluyeron las siguientes palabras claves: “*Bacillus subtilis*”, “Spo0A”, “esporulación”, “biopelículas”, “canibalismo”. De todos los artículos obtenidos, se trató de recurrir a aquellas publicaciones más recientes y de mayor impacto.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. PROTEÍNA Spo0A.

5.1.1. ¿Qué es la proteína Spo0A?

La proteína Spo0A es un factor de transcripción, considerado como el regulador de respuestas maestro, esencial para la capacidad que tiene *B. subtilis* de decidir entre un gran abanico de destinos celulares, como pueden ser la competencia, la formación de biopelículas, el canibalismo o la esporulación (de Oña, 2016; Banse et al., 2011). Es considerada una proteína de unión al ADN, la cual consiste en una sola cadena polipeptídica de 29,5 kDa que una vez plegada posee dos dominios de un tamaño similar. Un dominio receptor, N-terminal, que contiene un residuo de Asp⁵⁶ que será fosforilado, y otro dominio efector, C-terminal, donde reside la capacidad de unión al ADN (Figura 3). La fosforilación de la proteína Spo0A

mediante el “phosphorelay” (proceso que se explicará más adelante) induce un cambio conformacional en la estructura del dominio N-terminal, lo que provoca la dimerización, y ésta a su vez la liberación en el dominio C-terminal, de tal forma que queda expuesta la región de interacción con el ADN y así queda activada para ejercer su función reguladora (Castilla, 2008).

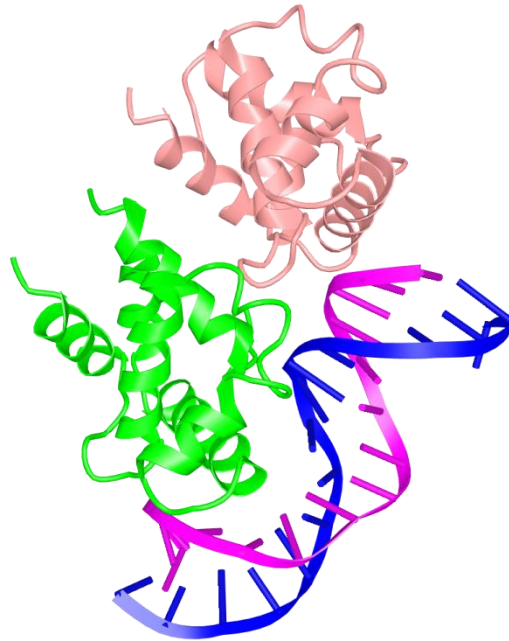


FIGURA 3: Estructura Spo0A unido al ADN (Zhao et al., 2002).

Una vez es fosforilado Spo0A (Spo0A~P), puede actuar como activador o represor de la expresión de alrededor de 500 genes, regulados directa o indirectamente durante las primeras etapas del desarrollo. De estos, es probable que 121 genes, que están organizados en 30 unidades de un solo gen y 24 operones, estén bajo el control directo de Spo0A. Cuarenta de estos genes están bajo el control positivo de Spo0A y 81 están bajo su control negativo (Molle et al., 2003).

5.1.2. SÍNTESIS: expresión de la proteína Spo0A. Mecanismo de “cambio de promotor”

La transcripción de la proteína Spo0A tiene lugar a partir de dos promotores, mediante un mecanismo de “cambio de promotor”. El promotor vegetativo, denominado P_v , es reconocido por el factor sigma constitutivo, σ^A , que unido a la ARN polimerasa activa su expresión, mientras que el promotor de esporulación, P_s , es reconocido por el factor sigma alternativo, σ^H (Castilla, 2008). Ambos promotores están separados entre sí por 158 pb y sus sitios de inicio están ubicados respectivamente a 204 y 45 pb corriente arriba del codón de

inicio para el marco de lectura abierto (Figura 4). El promotor más alejado, P_V , se expresa durante la fase exponencial de crecimiento, bajo el control de la ARN polimerasa a la que se le ha unido el factor sigma constitutivo (σ^A), y se detiene durante la transición a la fase estacionaria. En cambio, el promotor corriente abajo, P_S , es inducido al final de la fase de crecimiento exponencial, bajo el control del factor sigma alternativo (σ^H) y de la misma proteína Spo0A~P (activa), regulando así la expresión de su propio gen. Por consiguiente, la transcripción de Spo0A cambia del promotor vegetativo, P_V , al promotor de esporulación, P_S , a medida que las células salen del crecimiento en fase exponencial y se adentran en la fase estacionaria (Chastanet y Losick, 2011).

Para que el cambio de promotor tenga lugar de manera eficiente contamos con una serie de secuencias de unión de consenso, TTTGTCRAA, que denominamos como “box 0A”, que se encuentran entre el promotor vegetativo y el promotor de esporulación, dentro de la región reguladora de Spo0A. En este trabajo nos referimos a estas cajas como O_1 , O_2 , O_3 y O_4 (Figura 4), que desempeñan un papel fundamental en el proceso de cambio de promotor y otras características de la región reguladora (Chastanet y Losick, 2011).

El cambio de promotor según Strauch y colaboradores está mediado por la proteína Spo0A fosforilada (Spo0A~P), de manera que éste se une a las diferentes cajas 0A para poder ejercer sus funciones (Strauch et al., 1992). Estas funciones son las siguientes:

O_1 : es un elemento de acción negativa, responsable de reprimir P_V al final de la fase exponencial. Debido a que su secuencia se encuentra cerca del sitio de inicio para P_V , la unión de Spo0A~P puede interferir con la unión de la ARN polimerasa al promotor (Chastanet y Losick, 2011).

O_2 : es un elemento de acción negativa que reprime a P_S durante el crecimiento exponencial. Conocemos la función pero aún no está claro el proceso que la desencadena, puede ser la unión de la proteína Spo0A~P (no identificada bioquímicamente) u otra molécula diferente (Chastanet y Losick, 2011).

O_3 : es un elemento de acción positiva que se encarga de activar a P_S al entrar en la fase estacionaria. Esta acción tiene lugar gracias a la unión de una o varias moléculas de Spo0A~P (confirmado bioquímicamente) en su secuencia, pudiendo hacer que la activación de P_S sea sensible a pequeños cambios en los niveles de Spo0A~P, dando lugar a un interruptor de alta sensibilidad y auto-reforzante que contrarresta el efecto represor de O_2 , responsable de

producir una explosión de la síntesis de Spo0A al inicio de la esporulación (Chastanet y Losick, 2011).

O₄: la función de esta caja sigue siendo misteriosa pero se sabe que es prescindible para el mecanismo de cambio de promotor (Chastanet y Losick, 2011).

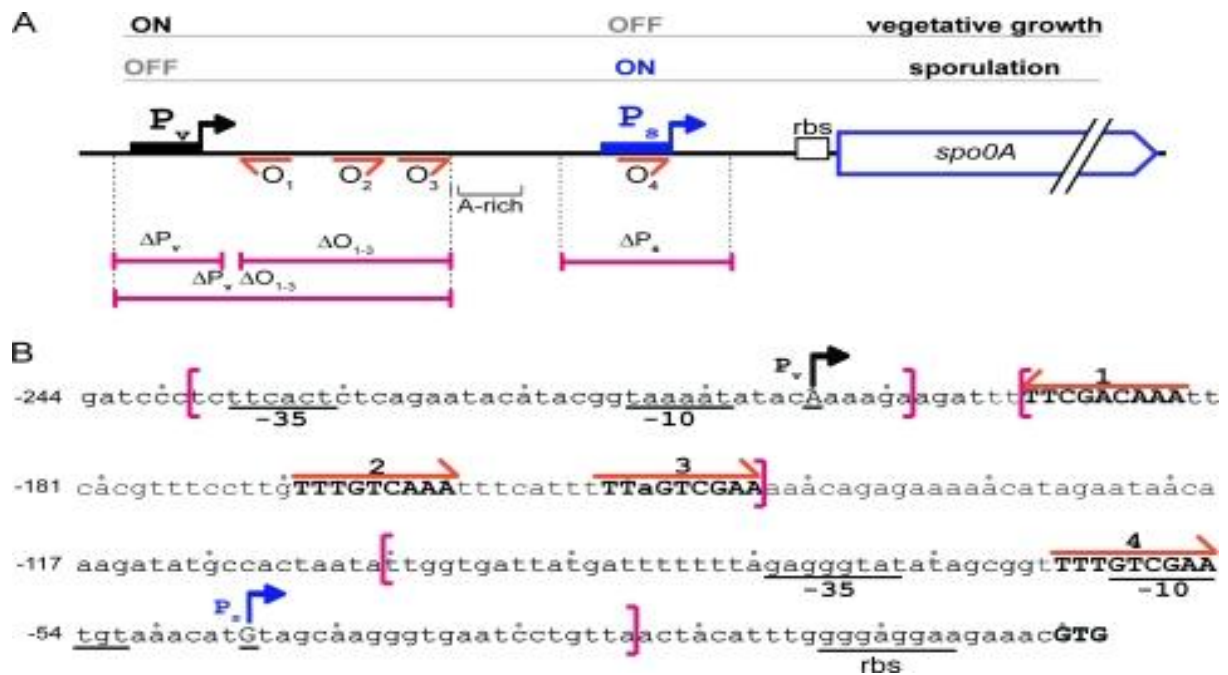


FIGURA 4. Región reguladora de Spo0A. (Chastanet y Losick, 2011).

5.1.3. REGULACIÓN: mecanismo de control “Just-in-time”

El mecanismo de cambio de promotor es un sistema complejo e intrincado el cual propone que al principio de la fase exponencial de crecimiento, la síntesis de Spo0A está dirigida principalmente, si no exclusivamente, por el promotor vegetativo, P_v . Esta síntesis se mantiene a unos niveles relativamente bajos (~ 2,000 moléculas/célula) mediante un mecanismo controlado. Gracias a este nivel basal la célula está preparada para responder rápidamente a las diferentes señales captadas por el phosphorelay, y por consiguiente activan a la proteína Spo0A fosforilándola, quedando como Spo0A~P. A su vez, el promotor de esporulación se encuentra latente debido a la ausencia de Spo0A~P y de factor σ^H (Chastanet y Losick, 2011).

Más tarde, aproximadamente a mitad de la fase de crecimiento exponencial, el gen *sigH* da lugar a σ^H y Spo0A~P comienza a acumularse, debido a las señales recibidas en el

phosphorelay. Aún así, la síntesis de Spo0A por parte de P_v continúa manteniéndose a un nivel basal debido a la represión de P_s a través de O_2 . Finalmente, durante la transición a la fase estacionaria, donde escasean los nutrientes y abundan las sustancias de desecho, aumentan las señales que conllevan a la subida de los niveles de Spo0A~P ($\sim 20,000$ moléculas/célula) en condiciones de esporulación. Estos niveles tan elevados de proteína activa hacen que la represión mediada por O_2 sobre el P_s se vea superada y por consiguiente se active el promotor de esporulación a través de la unión de Spo0A~P a O_3 . Del mismo modo Spo0A~P se une a O_1 reprimiendo la transcripción del promotor vegetativo P_v , efectuándose de esta manera el cambio del promotor vegetativo al promotor de esporulación. El cambio efectuado lleva a tasas aún más altas de síntesis de la proteína Spo0A como consecuencia de la traducción sin impedimento de los ARNm originados a partir del promotor de esporulación (Chastanet y Losick, 2011).

Por lo tanto, llegamos a la conclusión de que el promotor vegetativo ceba la bomba manteniendo un nivel de moléculas de Spo0A en células en crecimiento, que una vez comiencen a activarse, dará lugar al cambio de promotor, activándose el promotor de esporulación, P_s , que lleva a niveles aún más altos de proteína Spo0A y una regulación a la baja del promotor vegetativo, P_v . Este sistema de alerta es lo que se denomina control “just-in-time”, el cual evita que la proteína Spo0A sea limitante en el proceso de activación, ayudando a garantizar un suministro adecuado de la proteína con el fin de poder activar o reprimir los genes que posibilitan la adaptación.

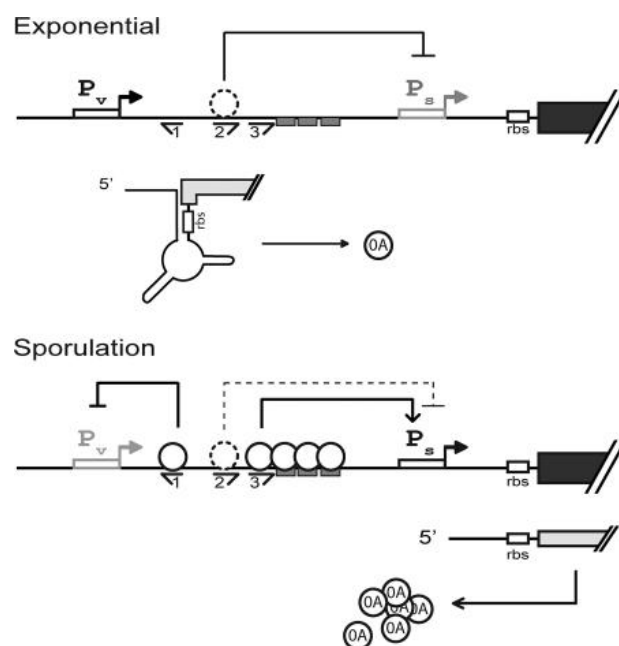


FIGURA 5. Modelo para el control de la expresión de Spo0A (Chastanet y Losick, 2011).

5.1.4. ACTIVACIÓN: “Phosphorelay multicomponente”

El inicio de los diferentes procesos de adaptación a la fase estacionaria se encuentra regido bajo el control de un sistema de dos componentes y una cascada de fosfatos denominado “phosphorelay” (Figura 6). Este sistema de transducción de señales consiste en un sensor histidin cinasa y un regulador de respuesta o factor de transcripción que interpretan una multitud de señales ambientales y celulares y coordina la expresión de una amplia gama de genes en bacterias (Szurmant et al., 2007). A través de estos mecanismos los microorganismos son capaces de percibir los estímulos del medio externo e interno y de responder a ellos regulando distintos patrones de expresión genética.

La función del phosphorelay se reduce en última instancia a la fosforilación de la proteína Spo0A, manteniendo unos niveles de Spo0A~P adecuados según la estrategia de adaptación que *B. subtilis* ponga en marcha para sobrevivir a un medio ambiente hostil. Para ello el sistema está sensiblemente regulado por multitud de componentes que controlan su complicado funcionamiento.

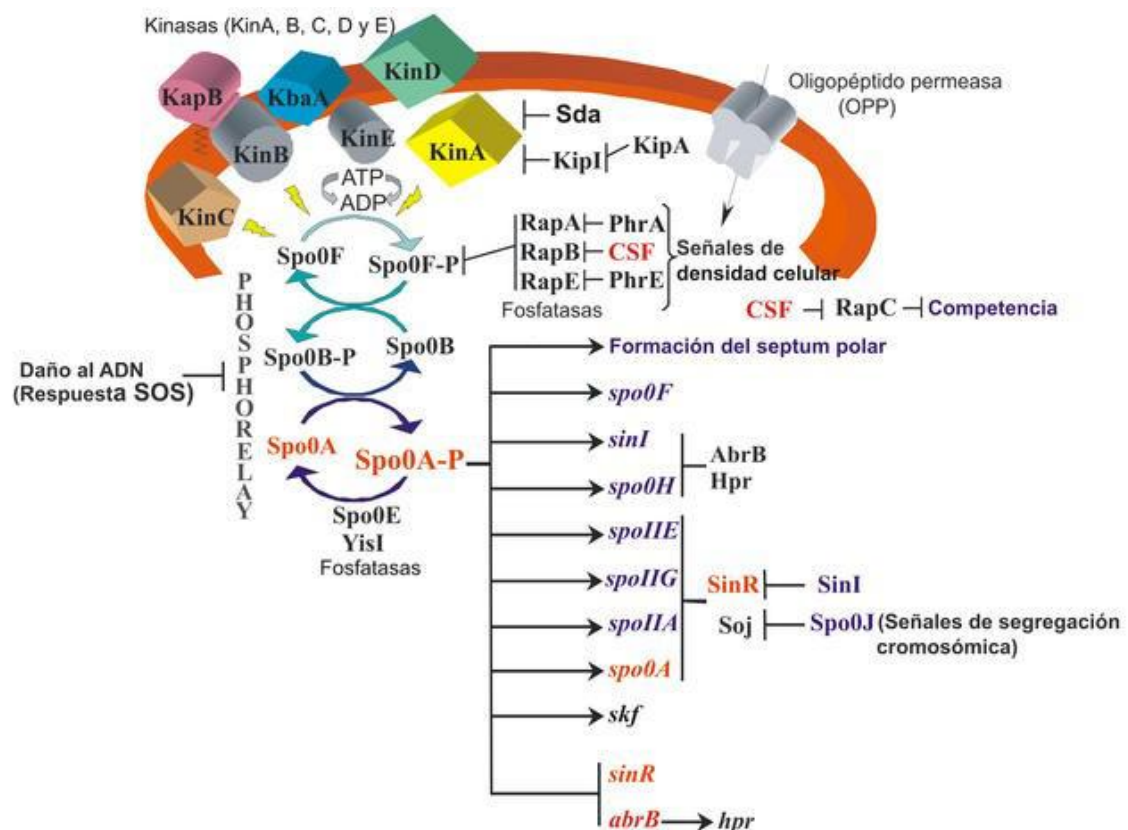


FIGURA 6. Mecanismo del phosphorelay (de Oña, 2016).

5.1.4.1. Componentes del phosphorelay

Los diversos componentes que constituyen el “phosphorelay” se explican a continuación:

- **Histidin-cinasas sensoras**, se han identificado cinco cinasas con actividad en el phosphorelay que son **KinA, KinB, KinC, KinD y KinE**, de las cuales dos son solubles (KinA y KinE) y las otras tres son de membrana (KinB, KinC y KinD). Estas se autofosforilan a expensas de ATP ante el flujo de señales metabólicas y/o ambientales aún no identificadas pero vinculadas indefectiblemente al agotamiento de nutrientes, la densidad celular y señales del hospedador. Estas cinasas de *B. subtilis* fueron clasificadas en el grupo IIIB, basándose en la región alrededor de la histidina donde se une el ATP para quedar activas (de Oña, 2016). Cada una de estas cinasas tiene una función en particular dentro del phosphorelay, hecho por el que también se les puede clasificar en dos grupos redundantes: KinA-KinB, encargadas de la esporulación y, por otro lado, KinC-KinD, encargadas de la formación de biofilms (McLoon et al., 2011). Con respecto a la actividad de KinE aún no se conoce con certeza.

- **Fosfotransferasa (Spo0B)**: es una proteína clave que reconoce a dos reguladores de respuesta y transfiere un grupo fosforilo entre ellos. El residuo fosforilado se ha comprobado que es una histidina, en concreto la His³⁰ (Tzeng et al., 1998).

- **Reguladores de respuesta (Spo0F y Spo0A):**

- **Spo0F**, es el regulador de respuesta objetivo de las cinasas. Consiste en un dominio regulador de 124 aminoácidos que actúa como intermediario en el esquema de fosfotransferencia, integrando las diferentes señales (Tzeng et al., 1998). El grupo fosforilo en este caso reacciona con un residuo de Asp, que se prepara para ser transferido. A diferencia del otro regulador de respuesta carece de residuo C-terminal de unión al ADN, incapaz de activar la transcripción (de Oña, 2016; Molle et al., 2003).

- **Spo0A**, como ya se dijo, consta de un dominio receptor N-terminal que contiene un residuo de Asp⁵⁶ conservado que será fosforilado y un dominio receptor C-terminal donde reside la capacidad de unión al ADN (Castilla, 2008).

- **Dos familias de aspartil-fosfato fosfatasa:** familia Rap-fosfatasa (RapA, RapB y RapC) y familia Spo0E (Spo0E, YisI y YnzD), son las encargadas de la desfosforilación de las proteínas Spo0F y Spo0A respectivamente ante diversos estímulos, de esta manera se regula negativamente el flujo de fosfatos (P) por el phosphorelay (Perego, 2001) y, en consecuencia, controlar los niveles de Spo0A~P.

5.1.4.2. Funcionamiento del phosphorelay

Todo comienza en el phosphorelay, que constituye el núcleo de un mecanismo de integración de diferentes señales, capaz de reconocer y tratar una gran variedad de éstas. Las cinasas son las encargadas de recoger las señales mediante su autofosforilación, a expensas de ATP y ante diferentes estímulos metabólicos y/o ambientales como ya se dijo.

La autofosforilación de las cinasas siempre tiene lugar en un residuo de histidina (His) que se encuentra altamente conservado, situado en la región fosfotransferasa, con el fin de transferirlo a otro residuo altamente conservado como es el aspartato (Asp) de los reguladores de respuesta. En este primer paso de la cascada de fosforilación, el fosfato se transfiere al regulador de respuesta Spo0F que carece de dominio C-terminal de unión al ADN. En el segundo paso Spo0F~P transfiere el grupo fosforilo a la histidina (His³⁰) de la fosfotransferasa Spo0B, y es Spo0B~P el encargado del último paso, donde el grupo fosforilo finalmente es transferido al residuo de Asp⁵⁶ del regulador de respuesta Spo0A, dando lugar a Spo0A~P (de Oña, 2016) (Figura 6).

5.1.4.3. Regulación del phosphorelay

Como ya hemos dicho anteriormente este sistema está altamente regulado por diversos mecanismos, los cuales actúan de manera negativa en el flujo de fosfatos por el phosphorelay. De esta manera el sistema permite a la célula otras alternativas menos drásticas que la esporulación, como puede ser la entrada en competencia, la formación de biofilms y el canibalismo (de Oña, 2016). Las proteínas Sda o Kipl, AbrB, Sin R y diversas fosfatasas de la familia Rap y Spo0E son las responsables de esta represión de respuestas de adaptación a la fase estacionaria, de manera directa o indirecta (Figura 5).

Cada una actúa de manera diferente que a continuación vamos a explicar:

- **Dos familias de aspartil-fosfato fosfatasas:** familia Rap fosfatasa y familia Spo0E, explicadas anteriormente.
- **Sda y Kipl:** son proteínas que se unen a KinA y actúan inhibiendo su actividad, es decir, su autofosforilación. La producción de Kipl está relacionada con la disponibilidad de sustancias nitrogenadas. La síntesis de Sda es inducida en respuesta al daño en el ADN, evitando la esporulación si la replicación del cromosoma está desmejorada (de Oña, 2016). Además, Sda inhibe directamente la capacidad de KinA para transferir el fosfato a su objetivo, Spo0F (Higgins y Dworkin, 2012). Por otro lado, la proteína Sda inhibe la autofosforilación de

KinB. Para que KinB sea funcional requiere de la presencia de la lipoproteína KapB y se ha sugerido que forman un complejo en la membrana citoplasmática (de Oña, 2016).

- **AbrB:** es un represor transcripcional que actúa de manera directa o indirecta en la represión de genes necesarios para la adaptación a la fase estacionaria. El gen para AbrB está bajo el control negativo del regulador maestro para la entrada en la esporulación Spo0A~P. La desrepresión de los genes bajo el control negativo de AbrB se logra mediante la represión del gen *abrB* mediada por Spo0A~P, seguida de una rápida degradación de la proteína AbrB (Banse et al., 2008). AbrB se inactiva por el producto de un gen no caracterizado *abbA* cuya transcripción está activada por Spo0A~P. Este gen codifica a AbbA, un antirepresor que se une a AbrB evitando su unión al ADN (Banse et al., 2008). Además, esta proteína puede actuar de manera indirecta mediante dos vías: por un lado reprimiendo al gen que codifica al factor σ^H , responsable de la transcripción de KinA y la acumulación en altos niveles de Spo0A. Por otro lado también activa la expresión del gen *hpr*, cuyo producto es la proteína Hpr o ScoC que es un represor directo de genes necesarios para la adaptación a la fase estacionaria (SinI y Spo0H), como producción de exoenzimas y antibióticos, formación de biofilms o la misma esporulación. Es decir, AbrB y Hpr se potencian mutuamente como represores de estas adaptaciones (de Oña, 2016).

- **SinR:** es un regulador transcripcional que actúa activando genes vinculados a la motilidad (swimming o swarming) (de Oña, 2016; Kearns y Losick, 2003) y competencia genética (de Oña, 2016). Por otra parte reprime la expresión de los genes de síntesis de sustancias bioactivas, de formación de biofilms (Kearns et al., 2005) y de esporulación como SpoIIIE, SpoIIIG, SpoIIA, Spo0F y Spo0A entre otros. La regulación de SinR se realiza a nivel post-traducciona l y depende de la interacción proteína-proteína con su antagonista, SinI. La transcripción del gen *sinI*, a diferencia de *sinR*, está regulada por Spo0A~P que activa la transcripción de *sinI*. De este modo al entrar en la fase estacionaria los niveles de SinI aumentan mientras que los de SinR se mantienen, formándose el complejo SinI-SinR que inactiva a SinR y se desbloquea la producción de sustancias bioactivas, la formación de biofilms y la esporulación (de Oña, 2016) (Figura 7). A su vez, SinR es una proteína de acción pleiotrópica de unión al ADN que es esencial para procesos de la fase tardía de crecimiento como movilidad y competencia, siendo además un represor de la esporulación, síntesis de subtilina y formación de biofilms (Kearns et al., 2005).

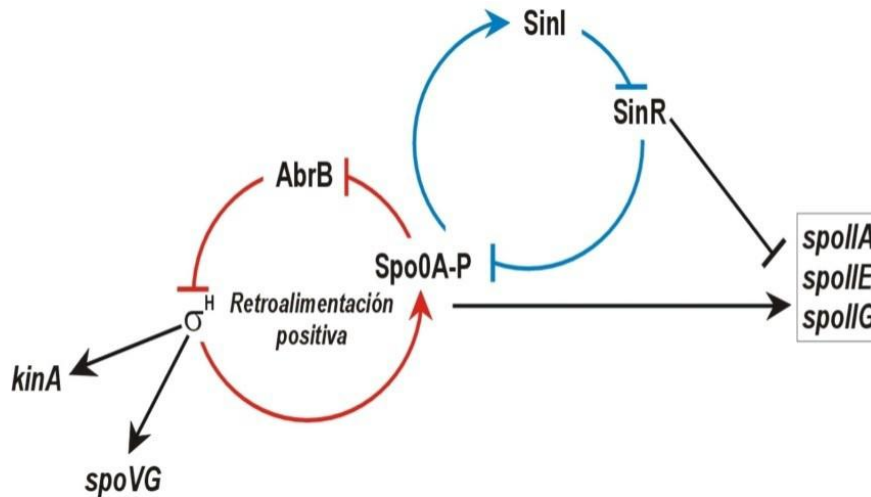


FIGURA 7. Regulación de SinR y AbrB (Oña, 2016).

La finalidad de esta regulación tan estricta se resume en mantener unos niveles adecuados de la proteína Spo0A~P, ya que la cantidad de ésta marcará el camino que *B. subtilis* tome para adaptarse y sobrevivir a un medio ambiente cambiante. Estos niveles, como ya se dijo, están controlados a través de diferentes señales que *B. subtilis* censa, dependiendo de las condiciones a las que esté sometida la bacteria.

Como ya sabemos, una vez fosforilada la proteína Spo0A actúa como activador o represor, directo o indirecto, de una gran cantidad de genes. Estos genes los vamos a agrupar en 4 categorías según sus respuestas frente a los niveles acumulados de Spo0A: genes que se activan a una cantidad baja de Spo0A, genes que requieren de un umbral alto de proteína Spo0A para ser activados, genes que se reprimen a un nivel bajo de Spo0A y, finalmente, genes que son reprimidos necesitando un umbral alto de la proteína. Aquellos genes que requerían una alta dosis de Spo0A para activarse tenían constantes de unión bajas para la proteína de unión al ADN, por el contrario, aquellos que requerían una baja dosis de Spo0A para ser activados tenían una alta constante de unión para la proteína reguladora o se activaron por un mecanismo indirecto (Fujita et al., 2005). Los genes que necesitan un bajo nivel de Spo0A son en este caso el gen *skf* (Sporulation Killing Factor) o *spd* (Sporulation Delaying Protein), encargados del canibalismo entre bacterias, o como el caso del gen *eps*, *abrB* o *sinR*, que toman más importancia a la hora de la formación de los biofilms. Por el contrario, también encontramos a genes que necesitan un nivel de Spo0A~P alto para ser activados, tal es el caso de los genes tempranos de esporulación, como pueden ser *SpollE*, *SpollG* y *SpollA* encargados de desencadenar el proceso irreversible de la esporulación (Fujita et al., 2005).

Todo hace pensar que el aumento de los niveles de Spo0A se produce de manera progresiva, lo que conlleva a una fase temprana de transcripción en la que se activan, de manera directa o indirecta, los genes que desempeñan funciones auxiliares menos drásticas en el desarrollo de la bacteria, permitiéndoles la supervivencia, que incluyen estrategias como la formación de biopelículas, el canibalismo, la producción de antibióticos o enzimas, el “swarming”, etc y, una fase posterior en la que los genes implicados directamente en el proceso de esporulación son activados (Fujita et al., 2005) (Figura 8). El mecanismo de activación directa involucra la afinidad del gen en cuestión por Spo0A, por otro lado, el mecanismo de activación indirecto tiene lugar a través de la represión del gen para la proteína represora inestable AbrB.

Podemos llegar a la conclusión de que todas estas alternativas a la esporulación le brindan la oportunidad a *B. subtilis* de mejores posibilidades de sobrevivir sin iniciar el camino irreversible de la formación de esporas, si las condiciones en las que se encuentra la bacteria no son tan desfavorables como para activar este último recurso que es la esporulación. De ser así, la bacteria perdería la oportunidad de colonizar un nuevo nicho, dejándolo a merced de otros colonizadores. Si por el contrario se demora demasiado en esporular podría quedarse sin energía (nutrientes) suficiente para iniciar el proceso de esporulación y en consecuencia morir en ese ambiente hostil (de Oña, 2016; Higgins y Dworkin, 2012). Por ello la importancia de mantener una regulación estricta y fina de los niveles de Spo0A~P que se consigue a través del phosphorelay y sus diferentes reguladores.

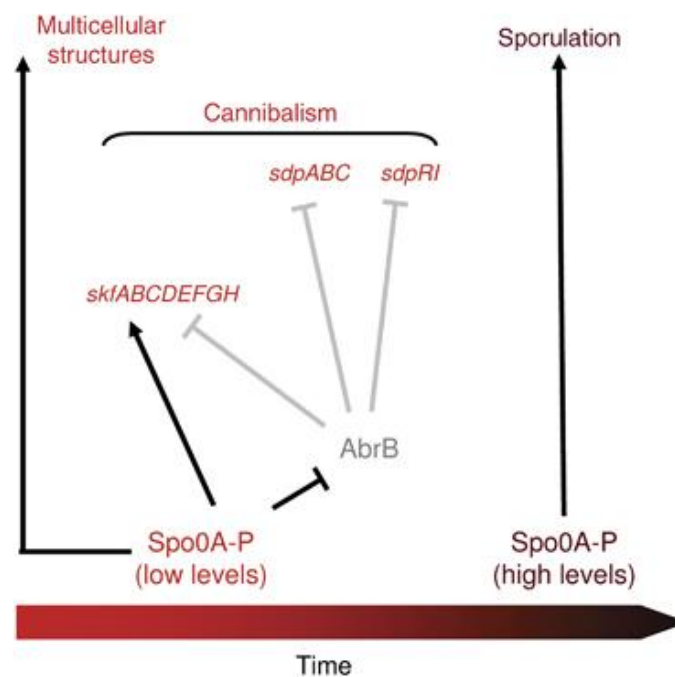


FIGURA 8. Expresión de genes formadores de biofilms, canibalismo y esporulación con respecto al tiempo y niveles de Spo0A~P (Gonzalez-Pastor, 2011).

5.2. BIOPELÍCULAS O BIOFILMS

Las biopelículas son comunidades multicelulares de bacterias asociadas a una superficie que se cree que son el modo de crecimiento bacteriano más común en los distintos ambientes naturales. Se ha demostrado que los flagelos y los pili de tipo IV desempeñan un papel importante en la unión inicial de varias bacterias a una superficie. Se puede decir que la estructura del biofilm depende de las condiciones ambientales, de hecho se han encontrado diferentes formas de biopelículas como placas, limos, biopelículas y colonias (Kobayashi, 2007). Podemos encontrar biopelículas en multitud de localizaciones pero cobra especial importancia en los entornos médicos e industriales, donde pueden ser problemáticas debido a la mayor resistencia de las células de biopelículas a los agentes antimicrobianos.

A pesar de que las diferentes especies bacterianas difieran en las estructuras y tipos de regulación de la formación del biofilms, la mayoría de los biofilms comparten tres características en común. La primera sería que los biofilms están estabilizados por una matriz extracelular compuesta de varias combinaciones de polisacáridos, proteínas y ADN. Segundo, las células pierden su movilidad flagelar (si la presentan) cuando entran en el estado de biofilms. Tercero, una serie compleja de proteínas regulatorias gobierna la transición del estado planctónico (natación libre) a la forma de biofilms (Winkelman et al., 2009). A continuación, en la figura 9, se muestran las diferentes etapas en la creación de un biofilm de *B. subtilis*. El proceso comienza cuando las diferentes señales externas (como la surfactina) activan la proteína reguladora maestra Spo0A y ésta a su vez activa la expresión de los genes que forman la matriz extracelular (naranja en la figura 9). Al inicio, las células son barras cortas y móviles, pero conforme se desarrolla el biofilm forman largas cadenas de células no móviles que se adhieren entre sí y a la superficie, al secretar una matriz extracelular. Esta matriz extracelular es esencial para mantener la integridad de la biopelícula, ya que mantiene junta a la comunidad. Conforme va madurando la biopelícula, los grupos de células se hacen más grandes y la comunidad se organiza y protege mediante la matriz extracelular. Dentro de las biopelículas, las células genéticamente idénticas expresan diferentes genes y producen subpoblaciones de tipos de células coexistentes pero con distinta función, como por ejemplo las productoras de matriz, las células móviles o las formadoras de esporas que también están presentes y organizadas espacialmente dentro del biofilm en proceso de maduración. La presencia y localización de los diferentes tipos de células es dinámico y no parece ser una secuencia ordenada de diferenciación (Vlamakis et al., 2013).

En condiciones de laboratorio, las biopelículas tienen una vida útil limitada que finalmente se desensamblan en respuesta a señales generadas por ellas mismas. A medida que la biopelícula se desarma, las esporas atrapadas en la matriz quedan liberadas, lo que les posibilita su dispersión para encontrar condiciones ambientales favorables para su germinación (Vlamakis et al., 2013).

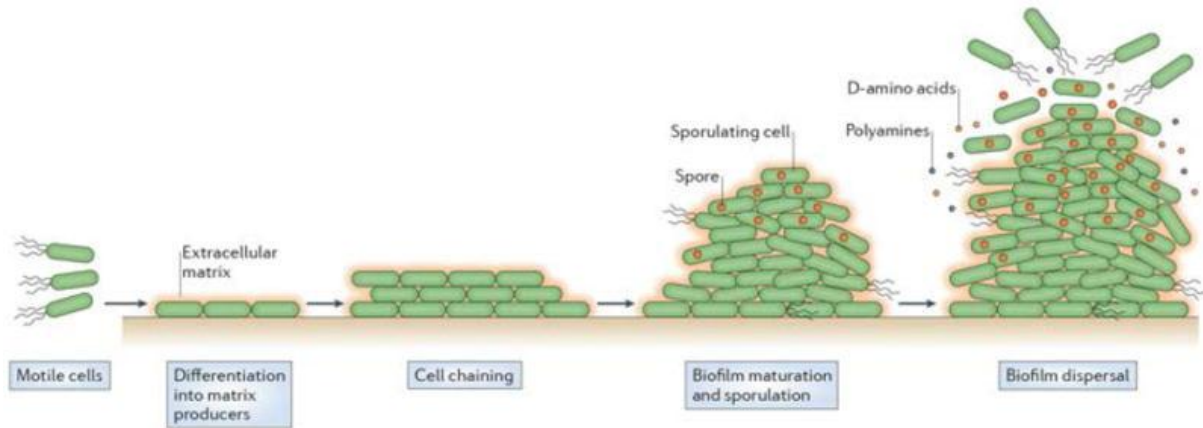


FIGURA 9. Ciclo de vida de una biopelícula de *B. subtilis* (Vlamakis et al., 1013).

5.2.1. Regulación de la formación de biopelículas

Los mecanismos que controlan la formación del biofilm son muy complejos y están bajo el mando de 19 reguladores transcripcionales (Kobayashi, 2007), de los cuales el más importante es el regulador maestro Spo0A que controla la expresión de gran parte de los genes formadores de biofilms (Fujita et al., 2005). Cabe destacar en este proceso el papel de las proteínas reguladoras represoras SinR y AbrB.

Como ya se dijo, *abrB* es un gen de alta afinidad para la proteína Spo0A~P, por lo que necesita poca cantidad de la proteína reguladora para ser reprimido (se activa con poca cantidad de Spo0A~P). La función de AbrB es la de represor global de genes activados en fase estacionaria, como puede ser en este caso los formadores de biofilm. Al jugar un papel negativo sobre la formación de biopelículas reprime al operón *yqxM-sipW-tasA*, que da lugar a TasA, un componente proteico principal en la formación de la matriz extracelular. También se encarga de reprimir la expresión de *yqxM* y *sipW* que codifican proteínas requeridas para la secreción de TasA (Kobayashi, 2007).

Otro de los reguladores importantes en la formación de las biopelículas es SinR, también de alta afinidad con respecto a la proteína Spo0A~P, cuya función es regular negativamente tanto el operón *yqxM-sipW-tasA* como el operón *eps*, el último de los cuales codifica la proteína EPS, encargadas de la biosíntesis del exopolisacárido necesario para la formación de la matriz extracelular del biofilms (Chu et al., 2006).

La ausencia de TasA o el exopolisacárido EPS dio lugar a una matriz residual, mientras que la ausencia de ambos componentes llevó a una falla completa para formar comunidades multicelulares complejas (Branda et al., 2006).

Cabe destacar un pequeño péptido llamado SinI, proveniente del primer producto génico del operón *sinI*, que antagoniza la actividad de la proteína SinR al unirse a ella. Por lo tanto la represión mediada por SinR está regulada por la activación transcripcional de SinI. También se sabe que SinR tiene un efecto positivo en la transcripción de genes flagelares. Por lo tanto, el sistema SinI-SinR se ha propuesto como un sistema regulador maestro que gobierna la transcripción de un estado planctónico a un estado de biofilms (Kobayashi, 2007).

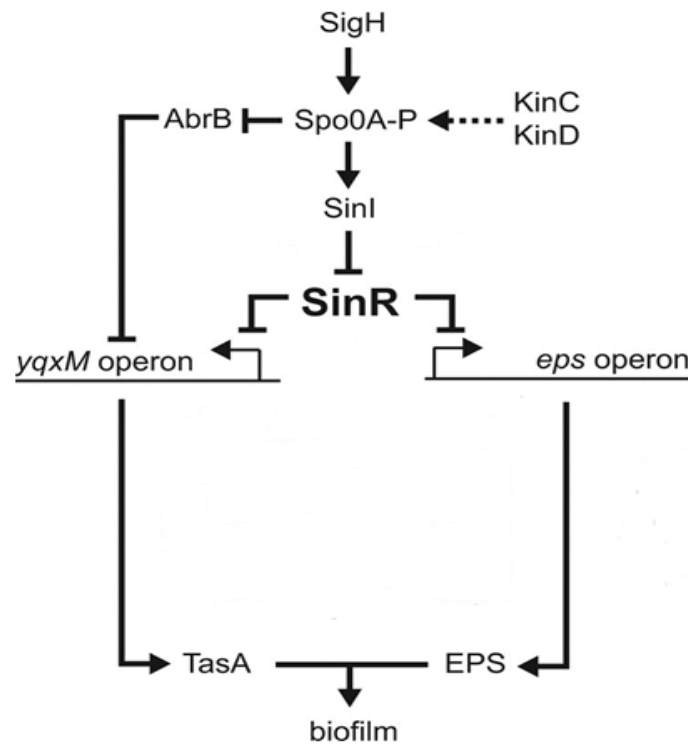


FIGURA 10. Modelo de regulación del operón de la matriz de biopelículas de *B. subtilis* (Winkelman et col., 2009).

Todo comienza cuando el factor sigma alternativo (σ^H) se activa al entrar en la fase estacionaria, controlando la expresión del regulador maestro Spo0A. La proteína Spo0A se activa en respuesta de diferentes señales externas (como la surfactina) acumulándose en

niveles bajos, que aparentemente depende de dos quinasas KinC y KinD. Spo0A~P en estos niveles reprime directamente al regulador AbrB liberando la represión ejercida por este hacia el operón *yqxM*. Por otro lado, activa la expresión del péptido SinI en una subpoblación de células. En este momento SinI se une a SinR para antagonizar la unión al ADN de SinR y aliviar la represión de los operones *yqxM* y *eps* formadores de biofilm (Winkelman et al., 2009).

5.3. CANIBALISMO

El canibalismo se trata de otro método de supervivencia adoptado por *B. subtilis* cuya función es retrasar el máximo posible el proceso de la esporulación (Höfler et al., 2016), ya que éste es irreversible y conlleva un gasto de energía importante. Tiene lugar durante las primeras etapas del proceso de esporulación, basándose en la heterogeneidad de las poblaciones esporulantes, constituidas por al menos dos tipos de células: células esporulantes, en las cuales el regulador maestro Spo0A está activo y células no esporuladoras, en las que Spo0A se encuentra inactivo (Gonzalez-Pastor, 2011).

Las células en las que Spo0A se encuentra activo tiene lugar la producción y secreción de dos toxinas caníbales, el factor de destrucción de esporulación (SKF) y la proteína retardadora de la esporulación (SDP), ambos regulados positivamente por la proteína reguladora, que bloquean las células hermanas que no han activado a Spo0A para que no entren en la esporulación. En su lugar, las células hermanas se someten a lisis, lo que proporciona una fuente de nutrientes para las células que han activado Spo0A y por ello se retrasan en esporulación (Gonzalez-Pastor, 2011) (Figura 11).

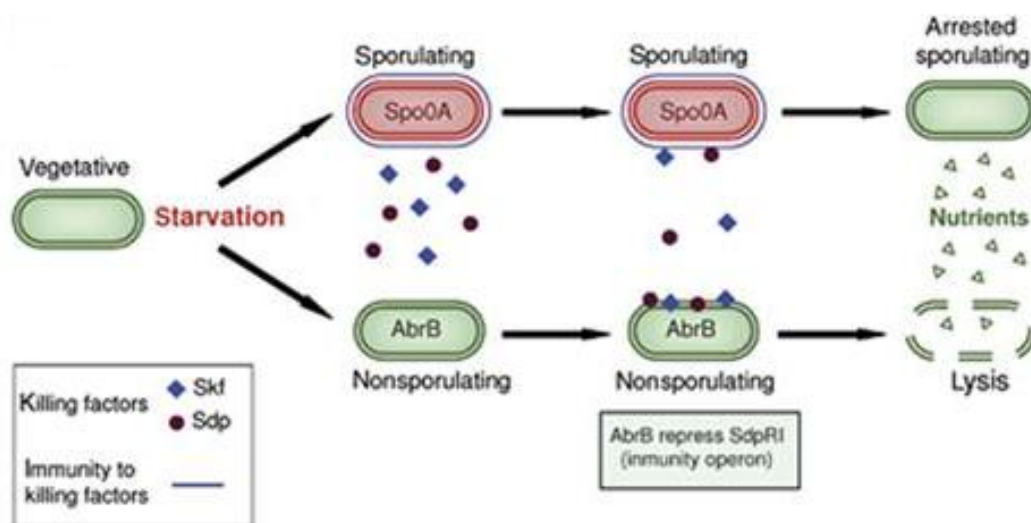


FIGURA 11. Modelo de comportamiento canibalístico (Gonzalez-Pastor, 2011).

5.3.1. Regulación del canibalismo

La proteína retardadora de la esporulación y la toxina de destrucción de la esporulación son expresadas a partir de los operones *sdpABC* (*sdp*) y *skfABCDEFGH* (*skf*), respectivamente. Estos operones implicados en el canibalismo son de alta afinidad para la proteína Spo0A, por lo tanto, se requiere un nivel bajo de la proteína para ser activados, a la vez que se alivia la represión generada por AbrB. El promotor del operón *skf* tiene un sitio de unión de alta afinidad para Spo0A, y el operón *sdp* está reprimido por AbrB, y por tanto, se activa indirectamente a una concentración baja de Spo0A a través de la represión de *abrB*. Además, AbrB reprime directamente la transcripción del operón *skf*, por lo tanto, *skf* se activa por dos rutas: directamente por Spo0A e indirectamente aliviando la represión mediada por AbrB (Gonzalez-Pastor, 2011) bajo el control de Spo0A~P a través de AbbA y AbrB (Banse et al., 2011). A su vez, cuando los niveles de proteína activa son altos, ésta actúa como represor directo del operón *skf* (Banse et col., 2011). Como sabemos, la proteína AbrB es un represor directo de numerosos genes que se activan durante la transición de la fase de crecimiento exponencial a la fase estacionaria como es ahora el caso de los genes del canibalismo, y que está bajo el control negativo del regulador maestro para la entrada en esporulación, Spo0A~P.

Para que todo este proceso tenga lugar Spo0A debe activarse y para ello depende de la lipoproteína Med (operón *med*), que actúa estimulando la fosforilación (y bajo ciertas condiciones, desfosforilación) de Spo0A indirectamente a través de la cinasa de membrana KinD. Trabajos anteriores han demostrado que Spo0A reprime directamente la transcripción de *med*. La regulación negativa de *med* por Spo0A constituye un circuito de retroalimentación negativo en el que la actividad de KinD se reduce a medida que aumentan los niveles de Spo0A~P. Esto da pie a que otras quinasas, como KinA y KinB, tomen el control de la fosforilación de Spo0F e impulsen los niveles de Spo0A~P lo suficientemente altos como para iniciar la esporulación (Banse et col., 2011).

5.4. ESPORULACIÓN

Una vez que las demás estrategias de adaptación a la inanición han fracasado, *B. subtilis* se compromete a la esporulación, la cual representa una inversión formidable de tiempo y energía y se considera como una vía de supervivencia como último recurso (de Hoon et al., 2010). Esto ocurre cuando la carencia de nutrientes y las condiciones ambientales se

vuelven muy severas para *Bacillus*, obligándola a esporular, dando lugar a una célula metabólicamente quiescente (de Oña, 2016; Sonenshein, 2000). Este proceso ha sido objeto de investigación microbiológica continuo desde finales del siglo XIX de la mano de Robert Koch (Koch, 1876) y Fernando Cohn (Cohn, 1876).

La esporulación, que es una respuesta al quórum sensing, es un proceso de diferenciación celular mediado por moléculas de señalización, señales fisiológicas y ambientales. Sabemos que *B. subtilis* es capaz de detectar las señales ambientales y metabólicas e integrarlas en un sistema complejo y regulado de transferencia de fosfatos llamado “phosphorelay”. Las señales son detectadas por histidin cinasas que se autofosforilan y fosforilan, a su vez, a proteínas que actúan como reguladores de respuesta.

Cuando todos los mecanismos de supervivencia anteriormente descritos fallan, el phosphorelay se desbloquea y los niveles de Spo0A~P sobrepasan el umbral de activación dando comienzo a la esporulación. Las células que comienzan a esporular ya no se dividen simétricamente para dar dos células hijas indistinguibles (ciclo vegetativo), sino que las células esporulantes se dividen asimétricamente. La esporulación tiene lugar al final de la fase de crecimiento exponencial de la bacteria y comprende un proceso irreversible. Así que, una vez iniciado el proceso (una vez formado el septum polar) la célula debe seguir hasta el final o morir en el intento de formar una spora (de Oña, 2016).

5.4.1. Proceso de la formación de spora

La esporulación da comienzo cuando la célula, en lugar de seguir su ciclo vegetativo dividiéndose en dos células idénticas por fisión binaria, toma la decisión de dividirse asimétricamente (Figura 12). Como resultado obtenemos dos células distintas: una forespora o prespora (el compartimento más pequeño) y una célula madre. Ambas células experimentan destinos diferentes, ya que la célula madre se lisa mediante un mecanismo de muerte celular programado, mientras que la forespora madura como una spora. Poco después de la división asimétrica, se establecen dos programas paralelos de expresión génica en cada compartimento bajo el control de los factores de transcripción que se activan de una manera específica de la célula. Además de las interacciones regulatorias dentro de la célula madre y la forespora, se requiere una señalización precompartimental precisa para controlar la progresión espacial y temporal del proceso de desarrollo (de Hoon et al., 2010).

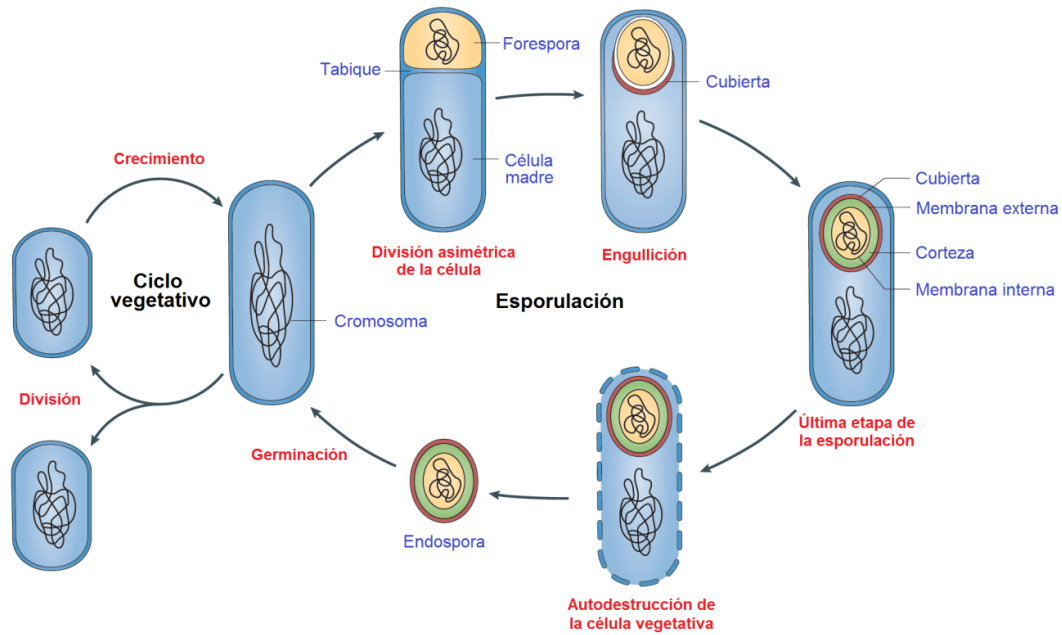


FIGURA 12. Ciclo vegetativo y esporulación en *B. subtilis*.

La esporulación comienza solo una vez que el ADN se replica para asegurar que haya dos copias de cromosoma disponibles en la célula. Los dos cromosomas están orientados con su origen de replicación anclado en un polo celular y su región distal de origen en la mitad de la célula. Una vez formado el tabique polar cada compartimento se queda con un cromosoma en su interior (de Hoon et al., 2010).

Después de la división asimétrica, tiene lugar la etapa de engullimiento de la célula madre a la forespora. Es un proceso análogo a la fagocitosis facilitado por las proteínas de la célula madre que ayudan a la migración de la membrana alrededor de la forespora mediante la eliminación enzimática del peptidoglicano. Una vez terminado el engullimiento, la forespora, ahora completamente rodeada de sus membranas interna y externa, es un protoplasto libre en el citoplasma de la célula madre. A continuación una serie de estructuras protectoras se ensamblan alrededor del núcleo de la espora. También tiene lugar la síntesis de la corteza, un peptidoglicano modificado, situada entre las dos membranas de la espora. De manera simultánea, al menos 70 proteínas individuales de la cubierta son sintetizadas en la célula madre para encerrar la espora en una estructura multicapa, con la corteza como la capa más externa. Finalmente tiene lugar la autodestrucción de la célula madre para liberar la espora madura, ahora llamada endospora (de Hoon et al., 2010) (Figura 12).

La endospora se considera la forma de vida más resistente del planeta, protegida del calor, la desecación, la radiación y la oxidación. Sin embargo, en el momento en que las

condiciones ambientales se vuelven favorables para el desarrollo vegetativo, es crítico que *B. subtilis* salga rápidamente del estado de latencia. Este proceso es conocido como germinación de la espora, y se desencadena por la presencia de nutrientes en el ambiente que son captados por receptores específicos de la membrana de la espora. En cuestión de minutos, el núcleo de la espora se rehidrata, la corteza se hidroliza y la capa se desprende. En última instancia, se inicia la replicación de ADN y pronto la entrada de nuevo en el ciclo vegetativo (de Hoon et al., 2010).

5.4.2. Regulación de la esporulación

Todo comienza cuando los niveles de Spo0A~P se acumulan en altos niveles a merced principalmente de las histidin cinasas sensoras, KinA y KinB. De este modo, sobrepasan el umbral necesario para que tenga lugar la activación de los genes tempranos de esporulación, como pueden ser *spoIIE*, *spoIIG*, *spoIIA*, etc (de Oña, 2016; Fujita et al., 2005), e incluso Spo0F y Spo0A (retroalimentación positiva). A su vez, mediante la represión de diferentes reguladores con un papel importante como AbrB y SinR (represores), puede llegar a tener lugar la expresión diferencial de genes de fase estacionaria.

El mecanismo control de la expresión de genes esporulantes consta de una red reguladora transcripcional de la esporulación, organizada espacial y temporalmente en distintos compartimentos. Este mecanismo está gobernado por la acción sucesiva de cuatro factores sigma: σ^F , σ^E , σ^G , σ^K , que se expresan a lo largo del ciclo celular de la bacteria permitiendo la expresión de genes necesarios para la esporulación (Figura 13). En las primeras fases de la esporulación, cuando ambos compartimentos, la célula madre y la forespora, coexisten uno al lado del otro, la transcripción génica está controlada exclusivamente por σ^F en la forespora, y σ^E en la célula madre. Una vez avanzado el proceso, la forespora queda libre en el citoplasma de la célula madre, σ^F y σ^E son reemplazados por los factores sigma tardíos σ^G y σ^K respectivamente (de Oña, 2016; de Hoon et al., 2010).

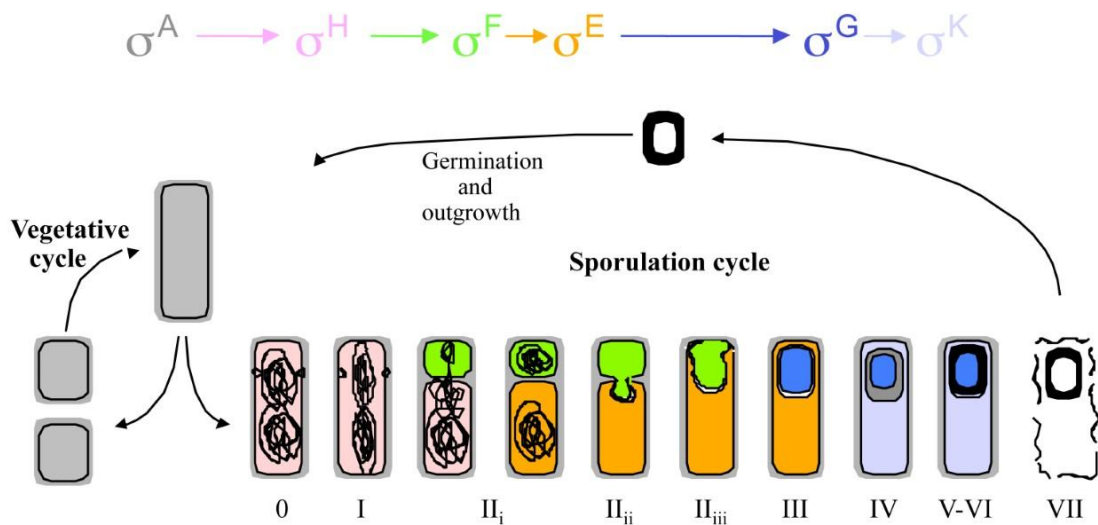


FIGURA 13. Activación secuencial de los factores sigmas en las diferentes fases de la esporulación (Doherty et al., 2010).

Después de la formación del tabique, un mecanismo de “entrecruzamiento” que comienza con la activación del primer factor de transcripción específico de compartimento, σ^F en la forespora, gobierna la activación secuencial de otros tres factores de transcripción específicos de cada compartimento (Figura 13). Quiere decir que la activación adecuada de σ^F es crítico para todo el desarrollo posterior de la espora. Posteriormente se activa el factor σ^E , el primer factor de transcripción específico de la célula madre. Acto seguido tiene lugar la activación de σ^G en la forespora que requiere una señal generada en la célula madre. Finalmente, σ^G es responsable de la activación adecuada de σ^K , el factor de transcripción de la célula madre final (Higgins y Dworkin, 2012).

Esta activación es compartimentalizada y siempre requiere una señal del compartimento opuesto. La cascada de comunicación célula-célula que se genera garantiza la sincronización del proceso de diferenciación de la forespora y la célula madre (Higgins y Dworkin, 2012).

6. CONCLUSIONES

- La proteína maestra Spo0A necesita ser activada mediante fosforilación para ejercer su función reguladora.
- La bacteria utiliza un mecanismo denominado “phosphorelay”, que consiste en un sistema de dos componentes junto a una cascada de fosfatos, para integrar las diferentes señales externas e internas que recibe con el fin de activar a la proteína Spo0A.
- Para que tenga lugar el aumento en los niveles de la proteína Spo0A debe efectuarse un cambio en la expresión del gen *spo0A*, que consiste en el salto del promotor vegetativo (P_V) al promotor de esporulación (P_S), mediante un mecanismo conocido como “just-in-time”.
- Cada uno de los genes de adaptación a la fase estacionaria requiere un nivel de umbral diferente para ser activados.
- El aumento de los niveles del regulador maestro tiene lugar de manera progresiva, activándose en primera instancia los genes de umbral bajo y posteriormente los que requieren un nivel más alto de la proteína Spo0A.
- La expresión de los genes represores AbrB y SinR debe estar estrictamente regulada ya que son los responsables de la formación de la matriz extracelular, encargada de la formación del biofilms.
- *B. subtilis* utiliza el recurso canibalístico para retrasarse en esporulación y así tener ventaja frente a sus adversarios.
- El proceso de esporulación es una vía de último recurso para la supervivencia de *B. subtilis*.
- La expresión de los genes esporulantes depende de la activación secuencial de los diferentes factores sigmas, por lo que es crítico que el primero de ellos (σ^F) se active correctamente.

7. BIBLIOGRAFÍA

Allison V. Banse, Arnaud Chastanet, Lilah Rahn-Lee, Errett C. Hobbs, Richard Losick. Parallel pathways of repression and antirepression governing the transition to stationary phase in *Bacillus subtilis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008; 105(40): 15547-15552.

Allison V. Banse, Errett C. Hobbs, Richard Losick. Phosphorylation of Spo0A by the Histidine Kinase KinD requires the lipoprotein Med in *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 2011; 193(15):3949-3955.

Branda SS, Chu F, Kearns DB, Losick R, Kolter R. A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. Mol Microbiol. 2006; 59(4): 1229-38.

Chastanet A, Losick R. Just-in-time control of Spo0A synthesis in *Bacillus subtilis* by multiple regulatory mechanisms. J Bacteriol. 2011; 193(22): 6366-74.

Chu F, Kearns DB, Branda SS, Kolter R, Losick R. Targets of the master regulator of biofilm formation in *Bacillus subtilis*. Mol Microbiol. 2006; 59(4): 1216-28.

Claverys JP, Prudhomme M, Martin B. Induction of competence regulons as a general response to stress in gram-positive bacteria. Annu Rev Microbiol. 2006; 60:451-75.

Cohn F. Untersuchungen ueber Bakterien. IV. Beitrage zur Biologie der Bacillen. Beitrage zur Biologie der Pflanzen. 1876; 2 : 249–276.

Douglas Higgins, Jonathan Dworkin. Recent progress in *Bacillus subtilis* sporulation. FEMS Microbiol Rev. 2012; 36(1): 131-148.

Fujita M, Gonzalez-Pastor JE, Losick R. High and low threshold genes in the Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. J Bacteriol. 2005; 187(4): 1357-68.

Geoff P Doherty, Kirra Bailey, Peter J. Lewis. Stage-specific fluorescence intensity of GFP and mCherry during sporulation in *Bacillus subtilis*. BMC Res Notes. 2010; 3: 303.

Gonzalez-Pastor JE. Cannibalism: a social behavior in sporulating *Bacillus subtilis*. FEMS Microbiol Rev. 2011; 35(3):415-24.

Hendrik Szurmant, George W. Ordal. Diversity in chemotaxis mechanisms among the bacteria and archaea. Microbiol Mol Biol Rev. 2004; 68(2): 301-319.

Hendrik Szurmant, Robert A. White, James A. Hoch. Sensor complexes regulating two-component signal transduction. *Curr Opin Struct Biol.* 2007; 17(6): 706-715.

Hera Vlamakis, Yunrong Chai, Pascale Beauregard, Richard Losick, Roberto Kolter. Sticking together: building a biofilm the *Bacillus subtilis* way. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11(3): 157-168.

Höfler C, Heckmann J, Fritsch A, Popp P, Gebhard S, Fritz G et al. Cannibalism stress response in *Bacillus subtilis*. *Microbiology.* 2016; 162(1): 164-76.

Jared T. Winkelman, Kris M. Blair, Daniel B. Kearns. RemA (YlzA) and RemB (YaaB) regulate extracellular matrix operon expression and biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 2009; 191(12): 3981-3991.

José E. González-Pastor, Errett C. Hobbs, Richard Losick. Cannibalism by sporulating bacteria. *Ciencia.* 2003; 301(5632): 510-3.

Kazuo Kobayashi. *Bacillus subtilis* pellicle formation proceeds through genetically defined morphological changes. *J Bacteriol.* 2007; 189(13): 4920-4931.

Kearns DB, Chu F, Branda SS, Kolter R, Losick R. A master regulator for biofilm formation by *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 2005; 55(3): 739-49.

Kearns DB, Losick R. Swarming motility in undomesticated *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 2003; 49(3): 581-90.

Koch R. Die Ätiologie der Milzbrand-Krankheit, begründet auf die Entwicklungsgeschichte des *Bacillus anthracis*. *Beiträge zur Biologie der Pflanzen.* 1876; 2 : 277–231.

López D, Kolter R. Extracellular signals that define distinct and coexisting cell fates in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol Rev.* 2010; 34(2): 134-49.

Mc Loon AL, Kolodkin-Gal I, Rubinstein SM, Kolter R, Losick R. Spatial regulation of histidine kinases governing biofilm formation in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 2011; 193(3): 679-85.

Michiel JL de Hoon, Patrick Eichenberger, Dennis Vitkup. Hierarchical evolution of the bacterial sporulation network. *Curr Biol.* 2010; 20(17): R735-R745.

Molle V, Fujita M, Jensen ST, Eichenberger P, González-Pastor JE, Liu JS, et al. The Spo0A regulon of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 2003; 50(5): 1683-701.



Paula de Oña. Propiedades de multicelularidad de *Bacillus subtilis* y sus aplicaciones en el desarrollo de inoculantes para el agro. Tesis. Rosario: Universidad Nacional de Rosario; 2016.

Perego M. A new family of aspartyl phosphate phosphatases targeting the sporulation transcription factor Spo0A of *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol.* 2001; 42(1): 133-43.

Piggot PJ, Hilbert DW. Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol.* 2004; 7(6): 579-86.

Sonenshein AL. Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Curr Opin Microbiol.* 2000; 3(6): 561-6.

Tzeng YL, Zhou XZ, Hoch JA. Phosphorylation of the Spo0B response regulator phosphotransferase of the phosphorelay initiating development in *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem.* 1998; 273(37): 23849-55.

Virginia Castilla Llorente. Estudio de los mecanismos moleculares responsables de la adaptación del desarrollo de los bacteriófagos ϕ 29 y Nf al estado fisiológico de la célula de *Bacillus subtilis* infectada. Tesis. Madrid: Universidad Autónoma de Madrid; 2008.

Wayne L. Nicholson, Nobuo Munakata, Gerda Horneck, Henry J. Melosh, Peter Setlow. Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000; 64(3):548-572.

Zhao H, Msadek T, Zapf J, Madhusudan, Hoch JA, Varughese KI. DNA complexed structure of the key transcription factor initiating development in sporulating bacteria. *Structure.* 2002; 10(8): 1041-50.