

# Canibalismo

## en poblaciones de *Bacillus subtilis*

José Eduardo González Pastor

Laboratorio de Ecología Molecular  
Centro de Astrobiología (CSIC-INTA), Madrid  
gonzalezpje@inta.es

Los microorganismos emplean armas químicas como antibióticos u otros agentes antimicrobianos para protegerse del ataque de otras especies o incluso de diferentes cepas de la misma especie. En general, los microorganismos que producen estos compuestos son inmunes a los mismos. En *Bacillus subtilis*, concretamente en poblaciones que entran en fase de esporulación, se ha descrito un comportamiento fratricida mediado por unas toxinas que son producidas por algunas células de la población para eliminar a otras células hermanas, genéticamente idénticas (González-Pastor *et al.*, 2003). El proceso de formación de esporas se inicia por limitación de nutrientes, e implica la división asimétrica de la célula para producir dos compartimentos de distinto tamaño: la célula madre, de mayor tamaño, y la forespora, de menor tamaño que dará lugar a la espora. El compartimiento de la forespora termina incorporándose en el compartimento de la célula madre, que contribuye al desarrollo de la espora. La lisis de la célula madre permite la liberación de la espora (revisado en Piggot y Losick, 2002; Errington, 2003). Un aspecto importante de este proceso es que las células no están comprometidas a esporular hasta que forman el septo asimétrico en uno de los polos. Hasta ese momento, pueden volver a crecer si surgen nuevos nutrientes en el medio. Sin embargo, las células que han pasado el estado de formación del septo asimétrico entran en un proceso sin retorno, y tendrán que completar la formación de la espora pese a la presencia de nutrientes (Parker *et al.*, 1996). El proceso de esporulación es muy complejo, requiere un elevado consumo energético y necesita varias horas para completarse. Por ello, la formación del septo asimétrico se podría considerar como el momento idóneo para decidir si el proceso de esporulación debe continuar o no, haciendo este proceso reversible si aparecen nuevos nutrientes en el medio. Como se ha comentado previamente, se ha descrito un comportamiento de fratricidio en poblaciones que entran en esporulación. En estas poblaciones se ha observado que no todas las células entran de forma sincronizada en esporulación, y aquellas células que han comenzado este proceso producen toxinas que matan a las células hermanas que no han empezado a esporular. El resultado es la

liberación al medio de nuevos nutrientes que proceden de las células muertas, y que son empleados por las células que han producido las toxinas (caníbales) y que habían empezado a esporular pero no habían llegado a la etapa de compromiso, en la formación del septo asimétrico (Figura 1A). Mediante este proceso de fratricidio y canibalismo se consigue retrasar el proceso de esporulación en toda la población, ya que permite que aquellas células que habían empezado a esporular y que no habían completado el septo asimétrico puedan volver a crecer y dividirse (González Pastor *et al.*, 2003).

### GENES IMPLICADOS EN LA MUERTE DE LAS CÉLULAS QUE NO ENTRAN EN ESPORULACIÓN

Se han identificado dos grupos de genes implicados en este proceso de canibalismo: i) *skf* (*sporulation killing factor*), y ii) *sdp* (*sporulation delaying peptide*) (González Pastor *et al.*, 2003; Ellermeier *et al.*, 2006). Los dos grupos de genes se expresan al principio del proceso de esporulación, y además su transcripción depende de SpooA (Fawcett *et al.*, 2000), el regulador principal de la entrada en fase de esporulación. Se observó que las mutaciones en genes de cada uno de estos grupos aceleran el proceso de esporulación (Figura 1B). Los estudios clásicos del proceso de formación de esporas se basan en la detección de mutantes defectivos en la formación de esporas, y esta fue la primera vez en la que se estudiaron mutantes que aceleraban este proceso. La posible relevancia biológica de este fenotipo se discutirá más adelante.

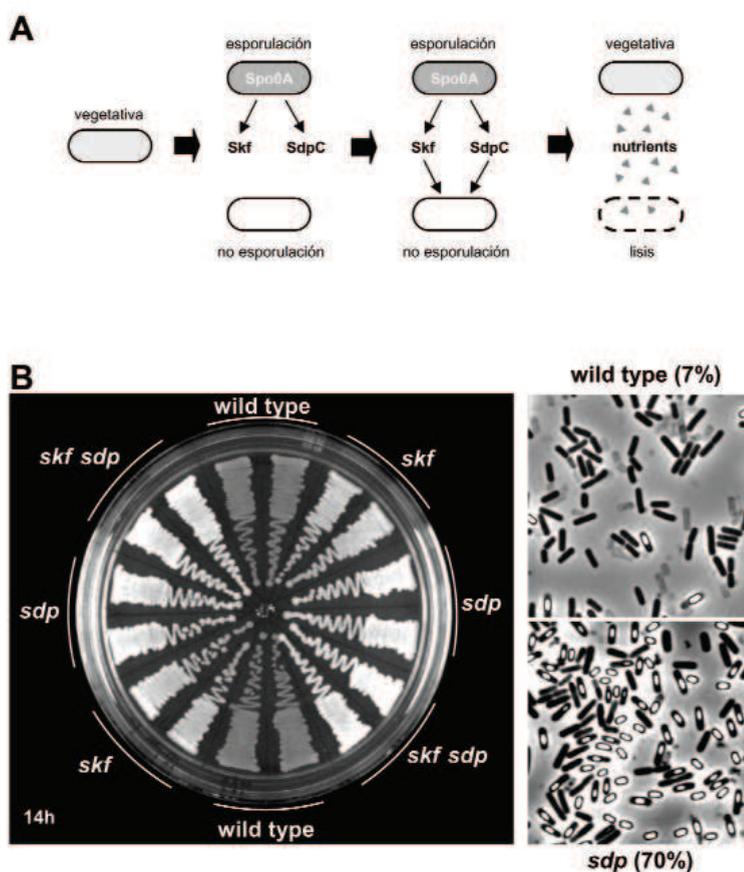
El operón *skf* está constituido por ocho genes (A-H) y codifica la producción de una toxina e inmunidad a la misma. Este operón es similar a otros que están implicados en la síntesis de antibióticos peptídicos. El gen *skfA* podría codificar la estructura primaria de la toxina. El gen *skfB*

codifica una proteína similar a otra de *B. subtilis* implicada en la modificación del antibiótico subtilisina. El producto del gen *skfD* contiene el dominio CAAX identificado en una familia de proteasas. Por otra parte, los genes *skfE* y *skfF* codifican un posible transportador de tipo ABC (*ATP binding cassette*). Este tipo de transportadores se encuentran frecuentemente en operones de síntesis de antibióticos, y están relacionados con la secreción del antibiótico y la resistencia al mismo. La toxina producida por el operón *skf*, SKF, no ha podido ser aislada, pero diferentes experimentos han demostrado su actividad: (i) en cultivos mixtos de la cepa natural y la cepa mutante *skf*, la cepa natural mata a la mutante cuando el cultivo entra en esporulación. (La cepa natural produce SKF que mata a la cepa mutante *skf*); (ii) la expresión de los genes que codifican el transportador de tipo ABC, *skfEF*, en la cepa mutante *skf*, permite que estas células se vuelvan resistentes a SKF; (iii) una cepa que puede expresar el operón *skf* bajo el control de un promotor inducible por IPTG, en presencia del inductor, produce un halo de inhibición de crecimiento cuando se inocula sobre un césped de la cepa mutante *skf*; y la evidencia más importante, (iv) el operón *skf* es responsable de la muerte de cerca de un 70 % de las células de una población de *B. subtilis* que entra en esporulación, algo que no se observa en una cepa mutante *skf*. Este fenómeno es resultado de la heterogeneidad de las células de una misma población en relación con la activación del regulador principal de fase estacionaria, *Spo0A*, en menos de la mitad de la población se activa este regulador (Chung *et al.*, 1994; Gonzalez-Pastor *et al.*, 2003). Por tanto, sólo las células con el regulador *Spo0A* activado producen la toxina y la resistencia a la misma, y por ello, las células con *Spo0A* no activado mueren.

El otro grupo de genes implicado en la muerte celular durante esporulación es *sdp*, constituido por dos operones convergentes, *sdpABC* y *sdpRI*. El operón *sdpABC* es responsable de la síntesis y transporte de un péptido de 63 aminoácidos procedente del extremo C-terminal del producto de *sdpC*. El péptido SdpC se ha descrito inicialmente como una señal que retrasa el proceso de esporulación, mediante la inducción de los genes adyacentes *sdpRI* (Gonzalez-Pastor *et al.*, 2003). Recientemente, se ha propuesto que SdpC puede funcionar como una toxina y que los productos de *sdpRI* confieren inmunidad a la toxina (Ellermeier *et al.*, 2006). Las mutaciones en *sdpABC* también confieren un fenotipo de aceleramiento de la esporulación, incluso más rápido que el de las mutaciones en *sdp* (Figura 1B). Mediante experimentos de *microarrays* de ADN se demostró que una mutación en *sdpC* afecta fuertemente a la transcripción del operón convergente *sdpRI*, y esta dependencia se debe a un efecto de

señalización intercelular. El operón *sdpRI* no se transcribe en un mutante *sdpC*, pero su transcripción se restablece si las células productoras de la señal SdpC crecen en su proximidad. SdpC se pudo purificar directamente del medio de cultivo de células que entran en esporulación, y se comprobó que el péptido purificado estimula la transcripción del operón *sdpRI*.

Como se ha mencionado antes, además de la función de señalización, SdpC se comporta como una toxina, y se ha demostrado que SdpI, que es posiblemente una proteína integral de membrana, confiere inmunidad a la misma (Ellermeier *et al.*, 2006). Por otra parte, la proteína SdpR es similar a otras de la familia de reguladores ArsR, y fue inicialmente identificada en una búsqueda de genes que inhiben la transcripción del gene *sigW*, implicado en resistencia a antibióticos y detoxificación. Además, SdpR funciona



**Figura 1.** (A) Modelo del comportamiento de canibalismo. (B) Las colonias de mutantes de *B. subtilis* que no exhiben canibalismo (mutantes en los genes *skf*, *sdp* o en los dos) esporulan más lentamente que las colonias formadas por cepas naturales (*wt*). En la fotografía de la izquierda, se observa que las colonias de los mutantes son más brillantes que las colonias de la cepa *wt* y esto se asocia a un mayor número de esporas. En efecto, en el panel de la derecha se observan bacterias procedentes de la cepa *wt* y de mutantes en *sdp*; como se puede apreciar, en el mutante *sdp* hay más bacterias brillantes (con esporas) que en la cepa *wt*. Por otra parte, en la cepa *wt* se aprecia un gran número de bacterias que exhiben menor intensidad (señaladas con flechas blancas) y que corresponden a bacterias muertas. Este tipo de bacterias no se observa en el mutante *sdp*.

**Eduardo González Pastor** (Madrid, 1967) se licenció en Biología por la Universidad Complutense de Madrid, y obtuvo el doctorado en Ciencias Biológicas (Bioquímica y Biología Molecular) en la Universidad Autónoma de Madrid en 1998. Realizó la tesis doctoral bajo la dirección del Dr. Felipe Moreno en la Unidad de Genética Molecular del Hospital Ramón y Cajal de Madrid, sobre la estructura y regulación del operón responsable de la biosíntesis y exportación de la microcina C7, un antibiótico peptídico que inhibe la síntesis de proteínas, producido por *Escherichia coli*. Desde 1999 hasta abril del 2003 realizó una estancia postdoctoral en el laboratorio del Prof. Richard Losick, en el Departamento de Biología Molecular y Celular de la Universidad de Harvard (Cambridge, USA). Durante esta etapa investigó en diversos aspectos relacionados con el comportamiento social y multicelular de comunidades de *Bacillus subtilis*. Además participó en la construcción del primer *microarray* de DNA de esta bacteria, que se empleó para investigar los genes controlados por los principales factores sigma y reguladores implicados en el proceso de esporulación. Posteriormente, se incorporó en el 2003 en el Centro de Astrobiología de Madrid como investigador contratado dentro del programa Ramón y Cajal. Sus principales líneas de investigación son: i) estudio del comportamiento social en comunidades microbianas, empleando técnicas genómicas, moleculares y de biología celular, y ii) estudio de los mecanismos moleculares de adaptación de los microorganismos a ambientes extremos, como el río Tinto (un sistema de drenaje ácido de minas), y más recientemente zonas geotermales en Islandia. Para estos estudios se emplean técnicas metagenómicas y moleculares.



de *sdpABC*, también controla *sdpRI* de forma indirecta mediante el represor AbrB. Este represor sólo está presente cuando SpooA no está activado. Por ello, las células que no esporulan, en las que SpooA no está activado, no pueden transcribir *sdpRI*, debido a la acción del represor AbrB, y por tanto no expresan la proteína de inmunidad (Figura 3).

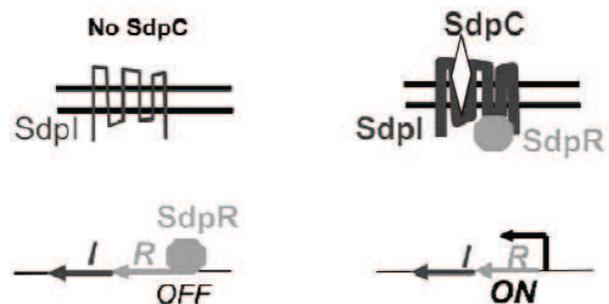
## ¿POR QUÉ LOS MUTANTES SKF Y SDP ESPORULAN MÁS RÁPIDAMENTE?

## ¿CUÁL ES EL SIGNIFICADO BIOLÓGICO DEL CANIBALISMO EN LAS POBLACIONES DE *B. SUBTILIS*?

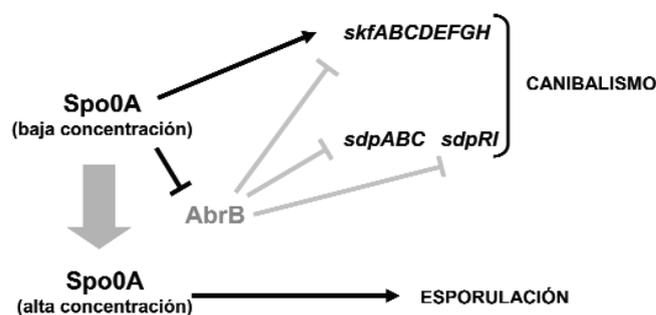
El fenotipo de esporulación acelerada de los mutantes *E<sub>skfK</sub>* y *sdp* indica que la cepa natural no es muy eficiente en cuanto a la velocidad de esporulación. Las toxinas producidas por estos operones matan a aquellas células en las que SpooA no está activado. Los nuevos nutrientes liberados al medio procedentes de la lisis de esas células son empleados por aquellas células que habiendo empezado a esporular todavía no han llegado al punto de no retorno. Estos nutrientes les permiten volver a crecer y duplicarse. En este escenario, el proceso de formación de esporas se paraliza hasta que de nuevo se vuelven a agotar los nutrientes en el medio. De nuevo, esto producirá una población heterogénea en cuanto a la actividad de SpooA, y nuevos episodios de muerte celular tendrán lugar, hasta que gran parte de la población se haya transformado en esporas. Este ciclo de múltiples eventos de muerte celular es responsable del retraso en el proceso de esporulación de la cepa natural. Si una o dos de las toxinas está ausente, las células que no tienen SpooA activado no mueren, no se introducen nuevos nutrientes en el medio y por tanto no se detiene el proceso de esporulación, lo que explica su mayor velocidad en las cepas mutantes *sdp* o *skf*.

como un auto-represor, ya que se ha demostrado que se une a la región promotora del operon *sdpRI* e inhibe su transcripción. En un mutante en *sdpC* no se transcribe el operon *sdpRI*, pero si se introduce una mutación en *sdpR* se restablece la transcripción. Integrando diversas observaciones, se ha propuesto un modelo (Figura 2) en el que la toxina SdpC interacciona con la proteína de inmunidad SdpI, y este complejo induce el secuestro del regulador SdpR en la membrana. En efecto, se confirmó que SdpR, fusionado a la proteína verde fluorescente se localiza en membrana en presencia de la toxina SdpC, pero no en su ausencia. El secuestro de SdpR en la membrana impide que reprima la transcripción de *sdpRI*, facilitando la expresión de la proteína de inmunidad SdpI. En ausencia de la toxina SdpC, SdpR no se secuestra en la membrana, reprime *sdpRI*, y por tanto evitaría la producción innecesaria de la proteína de inmunidad SdpI (Ellermeier *et al.*, 2006).

En resumen, ¿por qué las células que esporulan son inmunes a las toxinas que producen? En el caso del operón *skf*, las células que expresan SKF son inmunes porque además producen el transportador de tipo ABC, codificado en el mismo operón, que confiere resistencia a la toxina. ¿Qué ocurre en el caso de la toxina SdpC? En principio, la señal SdpC podría inducir la expresión del gen de inmunidad SdpI en todas las células de la población. Esto no sucede porque el regulador SpooA que controla la transcripción



**Figura 2.** Modelo de secuestro propuesto para explicar como la señal extracelular SdpC induce la expresión del operón de inmunidad *sdpRI*. La flecha gruesa en el panel de la derecha sobre el promotor de *sdpRI*, indica el nivel elevado de transcripción de este operón. El mayor grosor del símbolo de SdpI en el panel superior de la derecha indica que se expresa en mayor cantidad.



**Figura 3.** El canibalismo y la esporulación están controlados por diferentes niveles del regulador Spo0A. Los operones *skf* y *sdp* implicados en el canibalismo, están regulados por una baja dosis de Spo0A. El operón *skf* además está reprimido por AbrB. *sdpABC* y *sdpRI* están regulados de forma indirecta por Spo0A, ya que están reprimidos por AbrB. Por otra parte, la activación del proceso de esporulación requiere niveles más elevados de Spo0A.

¿Por qué las cepas naturales presentan este comportamiento fratricida? ¿Qué ventajas puede aportar? A diferencia de lo que se pensaba, hemos propuesto que el proceso de esporulación es posiblemente el último resorte que *B. subtilis* quiere activar en respuesta a la ausencia de nutrientes. Como se ha explicado previamente, el proceso de esporulación es complejo y requiere un importante consumo de energía y de tiempo para ser completado. Además es un proceso que se convierte en irreversible a partir de una etapa muy temprana. Para una comunidad de *B. subtilis*, podría ser desfavorable que todos los miembros de la población entrasen de forma rápida y sincronizada en este proceso a la menor señal de ausencia de nutrientes, que es el fenotipo observado en los mutantes *sdp* y *skf*. Este proceso de canibalismo ayuda a retrasar la formación de esporas y además mantiene durante un mayor tiempo una población mixta con un pequeño porcentaje de esporas y un mayor porcentaje de células que están en fase de crecimiento. El mantenimiento de una población de este tipo podría ser más beneficioso para la comunidad a la hora de competir con otras poblaciones microbianas. En su entorno natural, estas comunidades compiten con otros microorganismos, muchos de los cuales, no producen esporas. Las células que ya se encuentran en la fase irreversible de la esporulación y las esporas podrían tardar mucho más tiempo en recuperarse y crecer rápidamente si nuevos nutrientes aparecen en el medio, por lo que estarían en desventaja con otros microorganismos no productores de esporas. Por otra parte, las toxinas producidas por las células que esporulan podrían matar no sólo a las células hermanas de *B. subtilis* que no esporulan sino también otros microorganismos que estuviesen en la proximidad, favoreciendo la liberación de nuevos nutrientes, lo que ralentizaría el proceso de esporulación.

### LOS GENES IMPLICADOS EN EL CANIBALISMO SE INDUCEN POR NIVELES BAJOS DEL REGULADOR SPOOA, ANTES QUE LOS GENES ESPECÍFICOS DE ESPORULACIÓN

El regulador SpooA se conoce principalmente por su función en el control del inicio del proceso de esporulación en *B. subtilis*, y regula directamente 121 genes. Sin embargo, no todos estos genes responden de la misma manera a SpooA. Algunos se activan con una baja concentración de SpooA y otros requieren una elevada concentración

(Chung et al., 1994). Mediante *microarrays* de DNA se identificaron todos los genes que están en estas categorías (Fujita et al., 2005). En resumen, se observó que los genes que desempeñan una función directa en el proceso de esporulación requieren una elevada dosis de SpooA ya que sus promotores tienen una baja afinidad de unión a este regulador. Por otra parte, los genes que requieren una concentración baja de SpooA, o bien tienen un sitio de unión de alta afinidad, o son regulados de forma indirecta por SpooA, a través del represor AbrB. En presencia de SpooA, no se expresa AbrB y de esta forma se desreprimen los promotores controlados por AbrB. Dentro de esta categoría de genes que requieren una dosis baja de SpooA están los genes implicados en el canibalismo, *skf* y *sdp* (Figura 3). El promotor del operón *skf* tiene alta afinidad por SpooA, y además es reprimido por AbrB, y el operón *sdpABC* está bajo el control negativo de AbrB. Por ello, la existencia de estos distintos tipos de activación de SpooA podría tener un significado biológico. En una etapa temprana, las células producen SpooA en bajas concentraciones, y se inducen genes auxiliares en el proceso de esporulación, como por ejemplo los de canibalismo. Un incremento progresivo en los niveles de SpooA, llevaría a inducir los genes que participan directamente en la esporulación (Figura 3). Esta compleja regulación refleja nuevamente que la decisión de esporular se elabora de una forma muy controlada.

### OTROS EJEMPLOS DE FRATICIDIO EN MICROORGANISMOS

Recientemente se ha descrito otro caso de fratricidio en el patógeno *Streptococcus pneumoniae* (Guiral et al., 2005; revisado junto al canibalismo por Claverys y Håvarstein, 2007). En condiciones de alta densidad celular, y en respuesta a un péptido señal secretado al medio, *S. pneumoniae* entra en un estado de competencia genética. Al igual que en el proceso de esporulación de *B. subtilis*, sólo una fracción de las células en la población se vuelve competente, y producen una bacteriocina responsable de la lisis de las células no competentes en la población. Se ha postulado que las células lisadas liberan al medio DNA, nutrientes, pneumolisina y otros factores de virulencia que podrían facilitar la invasión del huésped.

Por otra parte, en *Myxobacteria*, que también forma esporas, se ha descrito que los cultivos que entran en fase estacionaria experimentan un proceso de autólisis.

Aproximadamente se lisa un 80 % de la población inicial (Wireman y Dworkin, 1977). Las toxinas implicadas en esta muerte celular se denominan autocidas, y no son activas contra ninguna otra bacteria u hongos, pero sí contra la especie productora y otras cercanas. Será interesante investigar si esta muerte celular en *Myxobacteria* se debe a un comportamiento fratricida. Este podría considerarse un caso de muerte celular programada o apoptosis como los que se describen en organismos multicelulares eucariotas.

## CONCLUSIONES

Nuestra percepción del mundo bacteriano tiende a ser reduccionista. Los estudios realizados en condiciones de laboratorio proporcionan información sobre los genes, su regulación transcripcional, rutas metabólicas, que no se explican ni integran en el contexto del tipo de vida de estos organismos en el medio ambiente. El proceso de esporulación se ha estudiado extensamente desde un punto de vista unicelular, aunque ya se conocía que requiere señales de densidad celular: una bacteria aislada no puede entrar en esporulación. Este comportamiento fratricida que hemos denominado canibalismo refleja un control por parte de la comunidad bacteriana para retrasar el mayor tiempo posible la decisión de esporular. Por otra parte, este trabajo ha proporcionado una visión más amplia de la función del regulador SpooA, tradicionalmente vinculado de forma exclusiva al proceso de esporulación a nivel unicelular. Las complejas propiedades de la regulación mediada por SpooA, que controla la entrada en un programa de desarrollo dependiendo de la concentración de proteína activada, recuerdan a las de los reguladores del desarrollo en organismos eucariotas.

## BIBLIOGRAFÍA

- Chung, JD, Stephanopoulos, G, Ireton, K, and Grossman, AD. 1994. Gene expression in single cells of *Bacillus subtilis*: evidence that a threshold mechanism controls the initiation of sporulation. *J. Bacteriol.* **176**, 1977-1984.
- Claverys, JP y Håvarstein, LS. 2007. Cannibalism and fratricide: mechanisms and raisons d'être. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 219-229.
- Ellermeier, CD, Hobbs, EC, González-Pastor, JE y Losick, R. 2006. A three-protein signalling pathway governing immunity to a bacterial cannibalism toxin. *Cell* **124**, 549-559.
- Errington, J. 2003. Regulation of endospore formation in *B. subtilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* **1**, 117-126.
- Fujita, M, González-Pastor, JE y Losick, R. 2005. High- and low-threshold genes in the SpooA regulon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **187**, 1357-1368.
- González-Pastor, JE, Hobbs, EC y Losick, R. 2003. Cannibalism by sporulating bacteria. *Science* **301**, 510-513.
- Guiral, S, Mitchell, TJ, Martin, B y Claverys, J.P. 2005. Competence-programmed predation of noncompetent cell in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 8710-8715.
- Parker, GF, Daniel, RA y Errington, J. 1996. Timing and genetic regulation of commitment to sporulation in *Bacillus subtilis*. *Microbiol.* **142**, 3445-3452.
- Piggot, P y Losick, R. 2002. Sporulation genes and intercompartmental regulation. In *Bacillus subtilis and Its Closest Relatives: From Genes to Cells*, Sonenshein, AL, Hoch, JA, and Losick, R. eds. (Washington, DC: Am. Soc. Microbiol.), pp. 483-517.
- Wireman, JW y Dworkin, M. 1977. Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **129**, 796-802.