

## Papel de PolA y RecA Durante la Esporulación de *Bacillus subtilis* Roles of RecA and PolA in *Bacillus subtilis* Sporulation

Linnet Alondra Barrientos Martínez<sup>1</sup>, Rocío C. Barajas Ornelas<sup>1</sup>, Estefanía Ramírez Meraz<sup>1</sup>, Mario Pedraza Reyes\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología. Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

(\*pedrama@ugto.mx)

### Resumen

Las bacterias poseen sistemas de reparación que contribuyen a su supervivencia y les permiten mantener la integridad de su genoma ante situaciones de estrés nutricional. *Bacillus subtilis* es un modelo de estudio que se ha empleado para comprender este fenómeno, en particular eventos post-exponenciales de crecimiento, entre ellos la esporulación. Durante este proceso participa el gen *recA*, que activa la respuesta SOS desencadenada ante daño al material genético, y el gen de *polA* que actúa para el adecuado funcionamiento de los sistemas de reparación. En este estudio se reporta el impacto que tiene la deficiencia de los genes *polA* y *recA* en la eficiencia de esporulación de *B. subtilis*.

**Palabras clave:** *Bacillus subtilis*, *polA*, *recA*, esporulación.

### Introducción

Las bacterias suelen enfrentarse a cambios ambientales, ante los cuales presentan respuestas adaptativas que mantienen o modifican la secuencia de su genoma, teniendo por tanto un impacto directo en su supervivencia y evolución. *B. subtilis* se ha empleado como modelo de estudio para el análisis de las respuestas fisiológicas que ocurren en su etapa de crecimiento post-exponencial, incluyendo; la competencia, la hipermotilidad, la mutagénesis asociada a estrés (stress-associated mutagenesis o SAM) y esporulación. Estos procesos son activados, entre otros, por el estrés nutricional <sup>[1]</sup>.

Bajo condiciones ambientales inapropiadas para el crecimiento, una subpoblación de la fase estacionaria de *B. subtilis*, activa una ruta de diferenciación celular que conduce a la síntesis de células altamente resistentes y diferenciadas llamadas esporas, a este proceso se le conoce como esporulación. En la etapa inicial de la esporulación, las células replican por última vez su material genético, sintetizan un septo asimétrico y experimentan un evento de división celular asimétrica que genera dos compartimentos de tamaño distinto, la célula madre (mayor tamaño) y la pre-espora (menor tamaño) <sup>[2]</sup>. Posteriormente, la célula madre engulle a la pre-espora, a partir de esta etapa, un programa de expresión genética modulado temporalmente en ambos compartimentos dirige la maduración de la pre-espora, la cuál es liberada tras la lisis de la célula madre. Las esporas pueden retornar al crecimiento vegetativo cuando las condiciones ambientales son favorables para este estilo de vida <sup>[2, 3]</sup>. Los procesos de mutagénesis y reparación de ADN se mantienen activos durante la fase postexponencial del ciclo de vida de *B. subtilis* <sup>[1]</sup>. Durante la esporulación, distintos mecanismos de reparación mantienen la integridad de los cromosomas de los esporangios permitiendo que el programa de expresión diferencial conducente a la formación de la espora ocurra sin contratiempos. A este respecto, se ha demostrado que la respuesta SOS, modulada por RecA, la reparación global y acoplada a la transcripción, así como un mecanismo de reparación alternativo, dependiente de la UV endonucleasa YwjD protegen el genoma de los esporangios de *B. subtilis* durante la esporogénesis <sup>[1]</sup>.

Estudios recientes mostraron que la respuesta SOS se activa durante la esporulación, y para ello *B. subtilis* requiere de la expresión de RecA para contrarrestar daños causados por factores físicos (luz UV-C) y agentes alquilantes (metil-metano sulfonato) <sup>[1, 6]</sup>. *B. subtilis* emplea a los sistemas canónicos de reparación por escisión de bases (BER) y de reparación por escisión de nucleótidos (NER), los cuales trabajan en conjunto con la DNA polimerasa PolA (codificada por el gen de *polA*) para mantener la integridad del genoma de células activamente replicantes <sup>[5]</sup>.

En este estudio se reporta la obtención de una cepa mutante de *B. subtilis*, deficiente en los genes *polA* y *recA* para estudiar su influencia en la eficiencia del proceso post-exponencial de esporulación.

## Materiales y métodos

**Tabla 1:** Cepas de bacterias utilizadas en este estudio

Cepa	Fenotipo	Referencia
PERM 311	<i>Bacillus subtilis</i> , cepa silvestre	Colección de cepas del laboratorio de MPR
PERM 1521	<i>Bacillus subtilis</i> <i>poA</i> ::Sp, resistente a espectinomicina (100µg/ml)	Colección de cepas del laboratorio de MPR
PERM 1773	<i>Bacillus subtilis</i> <i>recA</i> ::Eri, resistente a eritromicina (1µg/ml)	Bacillus Genetic Stock Center
PERM 2017	$\Delta poA$ ::Sp; $\Delta recA$ ::Eri, resistente a espectinomicina (100µg/ml) y eritromicina (1µg/ml)	Este estudio

**Tabla 2:** Oligonucleótidos para PCR utilizados en este estudio

Oligonucleótido	Secuencia	Descripción
966	GCA AAC AGC TCG CTG AAA TCG	Oligonucleótido directo que se alinea en la posición 1 335 pb río arriba de codón de inicio del gen <i>recA</i> .
956	CTC GTT CAT AGT AGT TCC TCC	Oligonucleótido reverso que se alinea a ~200 pb río abajo del codón de inicio del gen que da resistencia al antibiótico eritromicina.

### Medios de cultivo

Se utilizó el medio nutritivo LB (Luria-Bertani) para la cepa silvestre, LB suplementado con espectinomicina (Sp) para la cepa  $\Delta poA$ , LB con eritromicina (Eri) para la cepa  $\Delta recA$  y LB con Sp y Eri como medio selectivo para la cepa doble mutante  $\Delta poA \Delta recA$ .

### Extracción de ADN genómico de la cepa $\Delta recA$ y comprobación de su genotipo.

La cepa mutante  $\Delta recA$  fue recuperada en medio LB sólido suplementado con eritromicina [1µg/ml], de la placa fue seleccionada una colonia para ser crecida en medio LB líquido para la posterior extracción de ADN genómico, para lo cual se utilizó el Kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO), de acuerdo con las especificaciones del fabricante. La pureza y concentración de ADN se determinó mediante A260/280 nm en un espectrofotómetro JENWAY Genova Plus. Se realizó una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los oligonucleótidos 966 y 956, con los cuales se obtendría un amplicón de ~1.5 kb y se comprobó lo obtenido en un gel de electroforesis.

### Obtención y caracterización de la cepa *B. subtilis* $\Delta poA \Delta recA$ .

Se colocó una colonia de la cepa mutante  $\Delta poA$  en 1 mL de una mezcla de medio BMK (contiene: fosfato de potasio dibásico, fosfato de potasio monobásico, dextrosa, citrato de sodio dihidratado, citrato de amonio férrico, ácido aspártico y agua), extracto de levadura al 2% y sulfato de magnesio 1M para inducir la competencia genética. El cultivo se incubó durante 4 h a 37°C en agitación (250 rpm). Posteriormente, la suspensión celular se repartió en distintos tubos que contenían, o no, distintas concentraciones del ADN cromosómico de la cepa *B. subtilis*  $\Delta recA$ . Los cultivos se crecieron durante 2 h a 37°C/250 rpm y transcurrido el tiempo se sembraron en placas de medio LB conteniendo Sp y Eri, las cuáles se incubaron toda la noche a 37°C para la obtención de colonias transformantes.

Para la caracterización molecular se aisló DNA cromosómico de colonias transformante, y este se utilizó como templado para realizar reacciones de PCR (reacción en cadena de polimerasa) usando los oligonucleótidos 966 y 956 descritos en la Tabla 2. La producción de una banda de PCR de ~1500 pb corroboró la obtención de la mutante  $\Delta polA \Delta recA$ . Las condiciones de la reacción PCR fueron las siguientes:

**Tabla 3:** Condiciones de PCR

	Temperatura °C	Tiempo
Inicial: desnaturalización		
(30 ciclos)	95	5 minutos
	95	30 segundos
	66	30 segundos
	72	1 minuto, 30 segundos
Final: extensión	72	5 minutos
Hold	4-10	-

#### Determinación de la eficiencia de esporulación.

Colonias de las cepas WT,  $\Delta polA$ ,  $\Delta recA$ , y  $\Delta polA \Delta recA$ , crecidas en placas de medio LB con los antibióticos requeridos (Tabla 1), fueron trasferidas independientemente a tubos estériles conteniendo 3 mL de medio LB líquido; los cultivos se incubaron a 37° C durante 12 h. Posteriormente, se transfirieron 250  $\mu$ L de cada cultivo a medio líquido NSM (inductor de esporulación) suplementado con sulfato de magnesio 1mM, cloruro de calcio 0.5 M y cloruro de manganeso 10 mM. Se incubaron 24 h a 37°C y se tomó una muestra de 1 ml de cada cultivo y se centrifugó a 13 000 rpm durante 1 minutos para sedimentar las células y resuspender en 20  $\mu$ L de PBS, para después tomar una muestra (1 $\mu$ L) de cada cultivo y observar al microscopio. Para determinar el porcentaje de eficiencia de esporulación, se realizaron diluciones seriadas de cada uno de los cultivos, las cuales fueron sometidas a un choque de calor (80°C durante 20min). Pasado este tiempo las diluciones apropiadas fueron sembradas en placas de medio LB sin antibióticos, para determinar el porcentaje de esporas resistentes al calor. Las placas fueron incubadas por 12h a 37°C, para posteriormente hacer el conteo de colonia y el calculo de la eficiencia de esporulación. Los valores obtenidos para la cepa silvestre (~3.8X10<sup>8</sup> UFC/ml) se consideraron como el 100% de eficiencia de esporulación [7].

## Resultados y discusión

#### Extracción de ADN genómico de cepa $\Delta recA$ y comprobación de genotipo

Para generar una cepa deficiente en *polA* y *recA* mediante transformación genética, se purificó ADN cromosomal de la cepa *B. subtilis*  $\Delta recA$ . Se determinó que el material genético tenía una concentración de 2.346  $\mu$ g/ml, mientras que el valor de los cocientes  $A_{260/280}$  y  $A_{260/230}$  fueron de 2.161 y 2.111, respectivamente. El material genómico obtenido se utilizó como molde para la corroboración molecular de la cepa *B. subtilis*  $\Delta recA$ , mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos descritos en la Tabla 2. Los resultados obtenidos mostraron la obtención de un producto de amplificación de ~1500pb (Figura 1), lo que corroboró el genotipo RecA<sup>-</sup> de la cepa de interés.

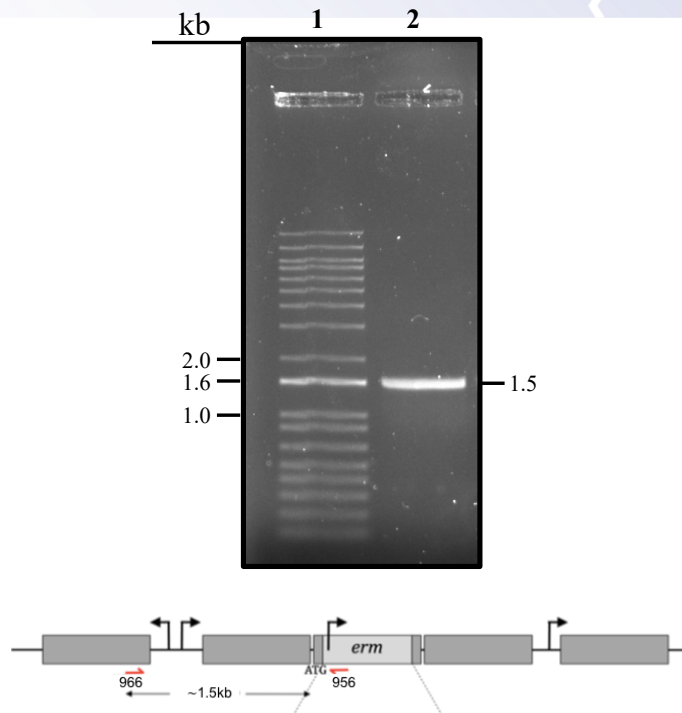


Figura 1. Análisis electroforético en un gel de agarosa al 0.8% que corrobora el genotipo de la cepa *B. subtilis* *recA::Eri*. Carril 1, marcadores de tamaño de ADN; Carril 2, producto de la reacción de PCR con ADN cromosomal de la cepa  $\Delta recA$  y los oligonucleótidos específicos descritos en la Tabla 2.

#### Obtención de una cepa doble mutante $\Delta polA \Delta recA$

A continuación, se prepararon células competentes de la cepa *B. subtilis*  $\Delta polA$  y estas se transformaron con el ADN cromosómico de la cepa *B. subtilis* *recA::Eri*. Después de corroborar la obtención de colonias transformantes resistentes a Sp y Eri, se procedió a corroborar molecularmente que, en algunas de éstas, el gen *recA* fuese reemplazado con el casete de Eri. Para tal fin, se eligió una colonia transformante, se purificó su ADN cromosómico y se utilizó para realizar una reacción de PCR con las condiciones descritas en Materiales y Métodos. Se encontró que al igual que un control positivo, es posible amplificar una banda de PCR de 1500 pb con el ADN cromosómico de la presunta cepa  $\Delta polA \Delta recA$  (Fig. 2). Estos resultados demostraron la obtención de una cepa de *B. subtilis* deficiente en PolA y RecA.

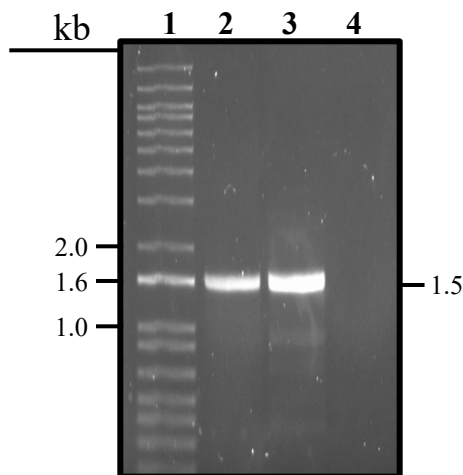


Figura 2. Análisis electroforético en un gel de agarosa al 1% para corroborar, mediante PCR, el genotipo de la cepa *B. subtilis* *polA::Sp, recA::Eri*. Carril 1, marcadores de tamaño de ADN; Carril 2, control positivo de PCR utilizando el ADN de la cepa *DrecA* como templado, Carril 3, producto de la reacción de PCR con ADN cromosomal de la cepa *B. subtilis* *polA::Sp, recA::Eri* y los oligonucleótidos específicos descritos en la Tabla 2; Carril 4, control negativo sin ADN templado.

### Impacto de la pérdida de *recA* y/o *polA* en la eficiencia de esporulación de *B. subtilis*.

A continuación, se realizaron experimentos para determinar el efecto de las deficiencias en los genes *polA* y/o *recA* en la esporulación de *B. subtilis*. Después de inducir la esporulación por 24 h en medio NSM, muestras de las cepas en estudio se analizaron mediante microscopía de campo claro. Los resultados de dos experimentos independientes se muestran en la Figura 3, en donde se observa una disminución moderada en la generación de esporas en las cepas deficientes en *polA* o *recA* en comparación con la cepa parental silvestre. Por otra parte, se encontró una disminución dramática en la generación de esporas en la cepa *DpolA/DrecA* con respecto a la cepa parental silvestre (Fig. 3).

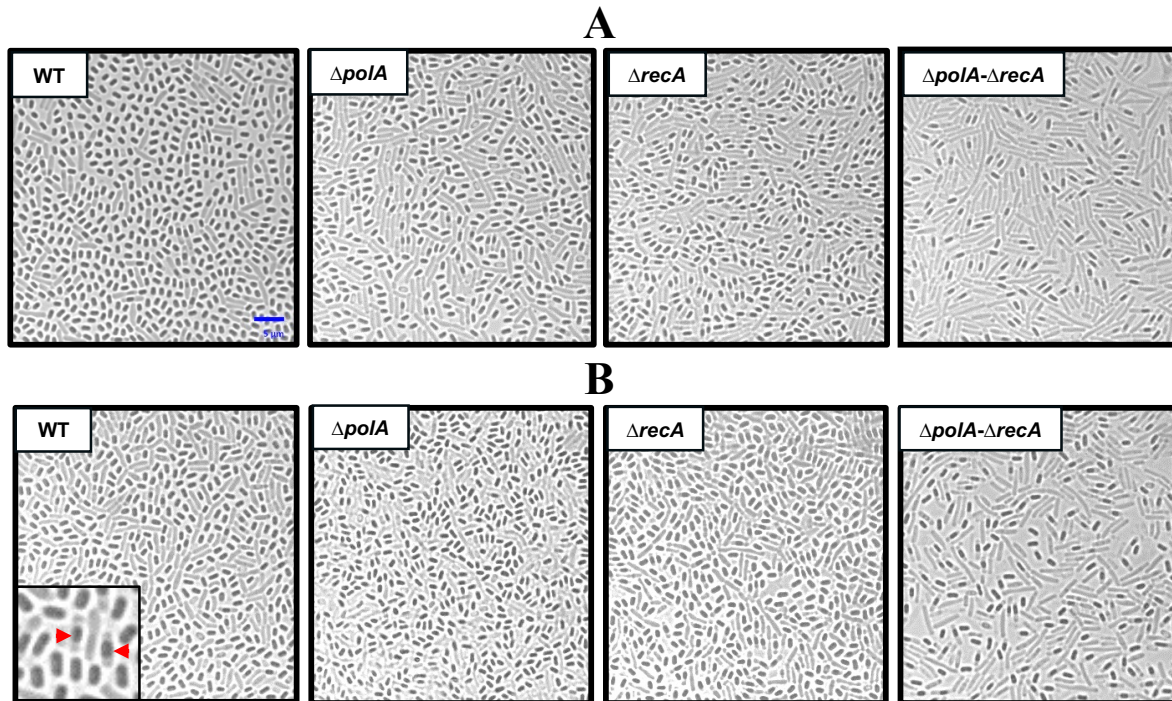


Figura 3. Micrografías de campo claro de esporas de *B. subtilis* de las cepas WT,  $\Delta polA$ ,  $\Delta recA$  y  $\Delta polA-\Delta recA$ . Panel A, experimento 1; Panel B, experimento 2. Una ampliación de la fotografía en el primer panel B muestra con flechas rojas las células que alcanzaron el estado de esporulación.

Experimentos preliminares que midieron la eficiencia de esporulación de las cepas WT,  $\Delta polA$ ,  $\Delta recA$  y  $\Delta polA-\Delta recA$  corroboraron los resultados mostrados en la Figura 3, indicando que la pérdida simultánea de *PolA* y *RecA* disminuye casi completamente la capacidad de esporular de *B. subtilis*.

## Conclusiones

Resultados generados en este estudio demostraron que la pérdida simultánea de *polA* y *recA* disminuyó dramáticamente la capacidad de esporulación de *B. subtilis*. Si bien, este proceso obedece a una respuesta al estrés nutricional, postulamos que *PolA* y *RecA*, mediante un mecanismo desconocido, contribuyen a eliminar los ~~insultos~~ daños que sufre el material genético al inicio o durante la esporulación para asegurar que este proceso se lleve a cabo de manera eficiente.



## Agradecimientos

Trabajo apoyado por CONAHCYT (Subsidios A-1S-27116 and CBF2023-2024-708) y la Universidad de Guanajuato (subsidio CIIC-029-2024). Linnet A. Barrientos agradece la beca otorgada por DAIP para realizar la estancia de verano UG 2024.

## Referencias

1. Pedraza-Reyes M, Abundiz-Yañez K, Rangel-Mendoza A, Martínez LE, Barajas-Ornelas RC, Cuéllar-Cruz M, Leyva-Sánchez HC, Ayala-García VM, Valenzuela-García LI, Robleto EA. *Bacillus subtilis* stress-associated mutagenesis and developmental DNA repair. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2024 Jun 27;88(2):e0015823. doi: 10.1128/mmbr.00158-23. Epub 2024 Mar 29. PMID: 38551349.
2. Piggot, Patrick & Hilbert, David. (2005). Sporulation of *Bacillus subtilis*. *Current opinion in microbiology.* 7. 579-86. 10.1016/j.mib.2004.10.001.
3. Robleto EA, Martin HA, Pepper AM, Pedraza-Reyes M. (2012). Gene regulation of sporulation in *Bacillus subtilis*, p. 9-18. *In* Abel-Santos E. (ed), *Bacterial spores: current research and applications*. Caister Academic Press. Wymondham, UK. ISBN: 978-1-908230-00-3
4. Suárez VP, Martínez LE, Leyva-Sánchez HC, Valenzuela-García LI, Lara-Martínez R, Jiménez-García LF, Ramírez-Ramírez N, Obregon-Herrera A, Cuéllar-Cruz M, Robleto EA, Pedraza-Reyes M. Transcriptional coupling and repair of 8-OxoG activate a RecA-dependent checkpoint that controls the onset of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Sci Rep.* 2021 Jan 28;11(1):2513. doi: 10.1038/s41598-021-82247-8. PMID: 33510358; PMCID: PMC7844254.
5. Patlán AG, Ayala-García VM, Valenzuela-García LI, Meneses-Plascencia J, Vargas-Arias PL, Barraza-Salas M, Setlow P, Briebe LG, Pedraza-Reyes M. YwqL (EndoV), ExoA and PolA act in a novel alternative excision pathway to repair deaminated DNA bases in *Bacillus subtilis*. *PLoS One.* 2019 Feb 6;14(2):e0211653. doi: 10.1371/journal.pone.0211653. PMID: 30726292; PMCID: PMC6364969.
6. Ramírez-Guadiana FH, Barajas-Ornelas Rdel C, Corona-Bautista SU, Setlow P, Pedraza-Reyes M. The RecA-Dependent SOS Response Is Active and Required for Processing of DNA Damage during *Bacillus subtilis* Sporulation. *PLoS One.* 2016 Mar 1;11(3):e0150348. doi: 10.1371/journal.pone.0150348. PMID: 26930481; PMCID: PMC4773242.
7. Amon JD, Yadav AK, Ramirez-Guadiana FH, Meeske AJ, Cava F, Rudner DZ. SwsB and SafA Are Required for CwlJ-Dependent Spore Germination in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* 2020 Feb 25;202(6):e00668-19. doi: 10.1128/JB.00668-19. PMID: 31871031; PMCID: PMC7043669.