

Reparación de DNA con tendencia al error: Efectos en supervivencia y evolución microbiana

Aniceto Hernández Yessica de Jesús (1), Pedraza Reyes Mario (2)

¹ [Licenciatura en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato | Dirección de correo electrónico: yessije_261092@hotmail.com ² [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] Dirección de correo electrónico: pedrama@ugto.mx

Resumen

Todos los organismos se encuentran constantemente expuestos a una amplia gama de agentes intra- y extracelulares capaces de alterar la estructura del DNA provocando mutaciones y/o muerte celular. *Bacillus subtilis*, una bacteria capaz de proliferar en distintos ambientes cuenta con mecanismos para prevenir y/o eliminar los daños que sufre su material genético, incluyendo al gen *mutSB*, un ortólogo del gen *mutS* dedicado, junto con *mutL*, a la corrección de bases erróneamente apareadas (MMR). Un estudio reciente mostró que la interrupción de *mutSB* incrementó la mutagénesis en células de *B. subtilis* carentes de división indicativo de que este gen participa en modular la mutagénesis asociada a la fase estacionaria en esta bacteria. De acuerdo con esta observación, en el presente estudio se encontró que los niveles máximos de expresión de *mutSB* ocurren en la fase estacionaria de crecimiento. Además, se demostró que la adición de Mitomicina C (M-C), Peróxido de Hidrógeno (H₂O₂) o Cloruro de Sodio (NaCl) a cultivos exponenciales de *B. subtilis* no incrementó los niveles basales de expresión de *mutSB*, lo que permite proponer que este gen no forma parte de los regulones SOS, PerR o σ^P . Finalmente, se generó y caracterizó molecularmente una cepa transformante de *B. subtilis* con mutaciones nulas en los genes *mutSB* y *mutY*.

Abstract

All organisms are constantly exposed to cellular and environmental genotoxic factors that promote mutagenesis and/or cell death. The soil bacterium *B. subtilis* relies on different mechanisms to prevent or eliminate DNA damage, including MutSB an ortholog of MutS, which together with MutL eliminate the misspairs generated during replication. A recent study linked the function of MutSB with mutagenic events that occur in non-dividing cells of *B. subtilis* (adaptive mutagenesis) suggesting that MutSB is a factor involved in stationary-phase-associated mutagenesis (SPM). In agreement with this contention, we report here that the maximum levels of mutSB expression took place during the stationary-phase of growth. Moreover, it was shown that addition of the stress-inducing factors Mitomycin-C, Hydrogen peroxide or Sodium Chloride did not activate the transcription of mutSB, strongly suggesting that this gene is not a member of the SOS, PerR or SigB regulons of *B. subtilis*. Finally a null mutant of *B. subtilis* deficient for MutSB and MutY was generated and characterized.

Palabras Clave

Bacillus subtilis, Mutagénesis adaptativa, Reparación de ADN, MutSB.

INTRODUCCIÓN

La información genética de los organismos se encuentra almacenada en el DNA, indispensable para perpetuar la vida. Los organismos están expuestos a una amplia variedad de agentes genotóxicos (especies de oxígeno reactivas (ROS), la luz UV, radiaciones ionizantes y diversos compuestos químicos) capaces de alterar la estructura del DNA y sus precursores provocando mutaciones [1]. Aunque algunas mutaciones son letales, otras son favorables para la célula, ya que pueden brindarles ventajas para sobrevivir ante una presión selectiva existente, lo cual permitirá a la célula adaptarse [2,3]. Por lo anterior, es importante dilucidar los mecanismos involucrados en la generación de mutaciones puesto que juegan un papel esencial en la generación de diversidad genética, patogénesis y evolución. Las bacterias representan un extraordinario modelo de estudio para entender los mecanismos moleculares que rigen estos procesos [2,3]. En nuestro grupo de trabajo hemos utilizado a *B. subtilis* para entender el papel que juegan distintos sistemas de reparación en modular la mutagénesis en células en ayuno, carentes de división [3]. Notablemente, se ha demostrado que la tasa de mutación en este organismo está influenciada por la respuesta al estrés fisiológico [2,3].

Antecedentes

El sistema MMR (MutSL) de *B. subtilis* reconoce y corrige malos apareamientos causados por la DNA polimerasa, contribuyendo a la fidelidad de la replicación en células en crecimiento. Estudios recientes han sugerido que la mutación adaptativa es favorecida por la saturación de este sistema, cuya contribución principal está dada por la proteína *mutS* [4].

En el genoma de *B. subtilis* existe el gen *mutSB* (*yshD*), un parálogo de *mutS* cuyo producto pertenece a la familia de proteínas MutS2 [5], pese a ser un ortólogo de *mutS*, la función de MutSB no está relacionada con la ruta de reparación MMR. Aunque se sabe que *mutSB* se expresa durante todo el ciclo de vida de *B. subtilis* [5], a la fecha se

desconoce si otros factores que estresan fisiológicamente a esta bacteria afectan los niveles basales de expresión de este gen. .

Recientemente, se observó un incremento en la producción de MutSB durante la fase estacionaria de una mutante deficiente en el sistema GO. Se encontró que, durante el crecimiento, la carencia de MutSB no genera un fenotipo mutador en *B. subtilis* y que su interrupción tampoco afectó la mutagénesis de una cepa carente del sistema MMR en este microorganismo. Sin embargo, en ausencia de un sistema MMR funcional MutSB juega un papel relevante en prevenir las mutaciones que se generan en células de *B. subtilis* carentes de división celular [6].

Con el propósito de elucidar las bases moleculares que regulan la expresión del gen *MutSB* en *B. subtilis* y avanzar en el entendimiento de los eventos de reparación con tendencia al error mediados por MutSB y MutY en el presente estudio, *i)* se determinaron los niveles basales de expresión de una fusión *mutSB-LacZ* durante el ciclo de vida de esta bacteria y en presencia de factores que generan estrés celular, y, *ii)* se obtuvo y caracterizó una cepa con mutaciones nulas en los genes *mutSB* y *mutY*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizadas en este estudio se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente. El crecimiento de las cepas de *B. subtilis* y *E. coli* se realizó en Medio Luria Bertani. Para propagar y mantener en estado vegetativo a *B. subtilis* se utilizó Medio A3 (Antibiotic médium 3, DIFCO). En la preparación de las células competentes de *B. subtilis* se utilizó Medio GMI y Medio GMII [7]. Cuando se requirió se adicionó a los cultivos los siguientes antibióticos, Ampicilina (Amp) 100 µg/mL, Cloranfenicol (Cm) 5 µg/mL, Eritromicina (Eri) 5 µg/mL y Espectinomicina (Sp) 100 µg/mL.

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados.

Cepa o plásmido	Genotipo o fenotipo	Fuente y/o referencia
B. subtilis		
PERM 704	$\Delta mutY::Sp Sp^f$.	8
PERM 1227	YB955 $\Delta mutSB::LacZ$ Eri ^r	6
PERM1459	$\Delta mutSB::Eri \Delta mutY::Sp$ Eri ^r Sp ^f	Este estudio
Plásmidos		
pPERM1217	pMutin4 conteniendo un fragmento del extremo 5' del gen <i>mutSB</i> . Amp ^r Eri ^r . Utilizado para interrumpir el gen <i>mutSB</i> de la cepa PERM704 ($\Delta mutY$).	6

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados.

Oligonucleótido	Secuencia	Descripción
	5' -3'	
496	CGGAATTCGAC ATCGAGCTTGG CCGC	Oligonucleótido directo ubicado 961 pb río abajo del primer codon del marco de lectura abierto de <i>mutSB</i> .
183	GCAGCAACGA GACGTCAC	Oligonucleótido reverso ubicado a 633 pb del inicio del marco de lectura abierto de <i>lacZ</i> .

Preparación, y transformación de células competentes y construcción de la cepa mutante $\Delta mutY mutSB$.

La preparación y transformación de células competentes de *B. subtilis* se realizó de acuerdo a un protocolo previamente descrito [7].

Para la construcción de la cepa mutante se utilizó el plásmido pPERM1217 [6] para transformar células competentes de *B. subtilis* PERM704 [17] (Tabla 1). Las transformantes se seleccionaron por resistencia a eritromicina y se caracterizaron molecularmente mediante PCR amplificando un fragmento de 1060 pb de la región *mutSB-lacZ*, utilizando el par de oligonucleótidos descritos en la Tabla 2. La cepa obtenida se denominó *B. subtilis* PERM1459.

Experimentos de expresión e inducción de la cepa *B. subtilis mutSB-lacZ*.

Se colectaron muestras celulares a diferentes tiempos de un cultivo en medio A3, de la cepa *B. subtilis* PERM1227 (*mutSB-lacZ*) y se procesaron para determinarles actividad de β -galactosidasa [18]. Para investigar si la M-C, el H₂O₂ o el NaCl eran capaces de inducir la expresión de la fusión *mutSB-lacZ*, la cepa PERM1227 fue cultivada en medio A3 a una D.O. 600 de 0,5. Posteriormente, los cultivos se dividieron en dos subcultivos de igual volumen, a uno se le añadió alguno de los agentes estresante y el otro se utilizó como control. Los cultivos se agitaron a 37°C durante 2.5 h, se colectaron muestra celulares y se procesaron para determinarles actividad de β -galactosidasa [18]. La actividad enzimática se expresó en unidades Miller [1 U Miller = $A_{420nm} (1000) / \text{Vol muestra} \times \text{Tiempo (min)} \times \text{DO}_{600nm}$].

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Expresión de *mutSB* durante el ciclo de vida de *B. subtilis*

Para conocer los niveles de expresión basales del gen *mutSB* durante el ciclo de vida de *B. subtilis*, se determinaron los niveles de síntesis de β -galactosidasa de la cepa PERM1227 (*mutSB-lacZ*) crecida en medio A3, durante crecimiento logarítmico y fase estacionaria. Los resultados de este análisis mostraron que la expresión de *mutSB* crece con la edad del cultivo alcanzando su máximo nivel en la fase estacionaria del cultivo. (Fig. 1).

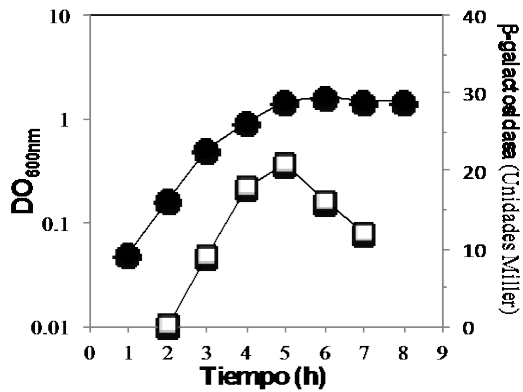


Figura 1. Expresión de una fusión *mutSB-lacZ* (PERM1227) durante el crecimiento exponencial y fase estacionaria de *B. subtilis*. El crecimiento (●) se determinó mediante absorbancia a 600 nm. Los datos de β-galactosidasa (□) son representativos y muestran el promedio de tres repeticiones.

Estudios recientes de nuestro grupo de trabajo mostraron que la inactivación genética de *mutSB* no genera un fenotipo mutagénico durante el crecimiento de *B. subtilis*; sin embargo, se encontró que MutSB si tiene una participación en la mutagénesis de fase estacionaria [6]. Estas observaciones, junto con resultados de nuestro laboratorio que indican que los niveles del operón *mutSL* disminuyen significativamente durante la fase estacionaria, apoyan la idea de que MutSB modula eventos mutagénicos que ocurren en células de *B. subtilis* estresadas nutricionalmente, exclusivamente durante la fase estacionaria.

Análisis de la expresión de *mutSB* en presencia de factores que generan distintos tipos de estrés celular.

Como se indicó líneas arriba, MutSB participa en la mutagénesis adaptativa de *B. subtilis*, por ello, se investigó si la transcripción del gen que codifica esta proteína es activada por factores que generan distintos tipos de estrés celular.

Para ello, se adicionó Mitomicina C (0.5 mg/mL), H₂O₂ (0,1 mM); o NaCl (4%) a cultivos en fase exponencial de la cepa PERM1227 (*mutSB-lacZ*) y se determinaron los niveles de β-galactosidasa, en referencia a un cultivo control no tratado con dichos agentes. Los resultados de estos experimentos mostraron que ninguno de los agentes probados fue capaz de incrementar significativamente los niveles de expresión de la fusión *mutSB-lacZ* por encima del valor basal encontrado en los cultivos sin tratamiento (Fig 2).

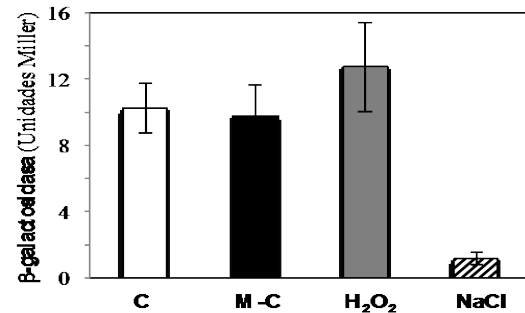


Figura 2. Expresión de *mutSB* en presencia de distintos factores que generan estrés celular. Los experimentos realizados como se indica en Materiales y Métodos son representativos y corresponden al promedio de 3 repeticiones.

A pesar su probada participación en eventos de reparación de DNA en fase estacionaria [6], la adición de un agente de que daña el ADN (M-C) fue incapaz de activar la transcripción de *mutSB*. Un resultado similar se observó con agentes que activan las respuestas a peróxido de hidrógeno y estrés general [8]. Es de notarse que el NaCl reprimió la expresión del *mutSB* un resultado que merece ser analizado con mayor profundidad. En conjunto estos resultados sugieren fuertemente que *mutSB* no forma parte de las respuestas globales SOS, PerR o σ^B. Por otra parte corroboran que *B. subtilis* posee mecanismos para incrementar de manera natural los niveles de transcripción de *mutSB* durante la fase estacionaria.

Obtención y caracterización de una cepa de *B. subtilis* con mutaciones nulas en los genes *mutSB* y *mutY*.

Como un requisito necesario para comenzar a investigar si los eventos de reparación dependientes de MutSB y MutY se encuentran conectados durante la generación de mutaciones asociadas a la fase estacionaria de *B. subtilis* era necesario contar con una cepa carente de ambas funciones. Para construir esta mutante, se utilizó el plásmido pPERM1217 (Tabla 1) para transformar la cepa *B. subtilis* PERM704, carente de MutY, e interrumpir mediante un evento de recombinación homóloga sencillo al gen *mutSB*. La integración correcta de pPERM1217 al locus *mutSB* de la cepa *B. subtilis* PERM704 se verificó mediante la amplificación por PCR de un fragmento *mutSB-lacZ* utilizando como templado DNA genómico de la cepa transformante. El producto de amplificación de 1.06 Kpb esperado en el fondo genético *mutY mutSB* (Fig. 3) corrobora la obtención de la mutante deseada, la cual se denominó *B. subtilis* PERM1459 (Tabla 1).

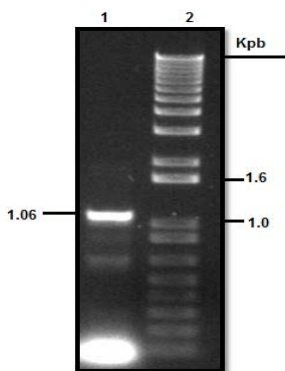


Figura 3. Corroboración por PCR de la integración de la construcción pPERM1217 en el locus *mutSB* del cromosoma de *B. subtilis* PERM704 (Δ mutY). Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio al 0.1% (p/v). Carril 2, marcadores de tamaño de DNA de 10 Kb. Carril 1, *B. subtilis* Δ mutSB mutY.

CONCLUSIONES

mutSB se expresa en todo el ciclo de vida de *Bacillus subtilis* pero sus niveles son máximos durante la fase estacionaria. Muy probablemente *mutSB* no pertenece a los regulones SOS, PerR o σ^B de *B. subtilis*. Se generó y caracterizó molecularmente una cepa de *B. subtilis* con mutaciones nulas en los genes *mutSB* y *mutY*.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por CONACyT (Subsidios 205744 y 221231) y la Universidad de Guanajuato (Subsidio DAIP-602-2015). Y de J. A. H. agradece la beca otorgada por la DAIP para la realización de su estancia de investigación. Los autores agradecen el invaluable apoyo técnico y co-asesoría de la Dra. Norma Ramírez Ramírez.

REFERENCIAS

- Pedraza-Reyes, M., Ramírez-Ramírez, N., Vidales-Rodríguez, L. E., y Robleto, E. A. (2012) Mechanisms of bacterial spores survival. In *Bacterial Spores: Current Research and Applications*. Abel-Santos, E. (ed). Norfolk UK: Caizer Academic Press, pp.73-84.
- Yasbin, RE., Pedraza-Reyes, M. (2004). STATIONARY PHASE-INDUCED MUTAGENESIS: IS DIRECTED MUTAGENESIS ALIVE AND WELL WITHIN NEO-DARWINIAN THEORY. Pp. 181-191. In *Microbial Evolution: Gene establishment, Survival, and Exchange*. Ed. R. Miller. ASM Press, Washington, DC.
- Robleto EA, Yasbin R, Ross C, Pedraza-Reyes M. (2007). Stationary Phase Mutagenesis in *B. subtilis*: A Paradigm to Study Genetic Diversity Programs in Cells Under Stress. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 42:327-339.
- Pedraza-Reyes, M. & R.E. Yasbin, (2004) Contribution of the mismatch DNA repair system to the generation of stationary-phase-induced mutants of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* 186: 6485-6491.
- Rosolillo, P. & A.M. Albertini, (2001) Functional analysis of the *Bacillus subtilis yshD* gene, a *mutS* paralogue. *Mol Gen Genet* 264: 809-818.
- Rodríguez, L.A. (2014) Papel del gen *mutSB* en el proceso de mutación adaptativa de *Bacillus subtilis*. *Tesis de licenciatura*. Universidad de Guanajuato.
- Boylan, R.J., N.H. Mendelson, D. Brooks & F.E. Young, (1972) Regulation of the bacterial cell wall: analysis of a mutant of *Bacillus subtilis* defective in biosynthesis of teichoic acid. *J Bacteriol* 110: 281-290.
- Dehora, B.N., Vidales, L.E., Ramírez, M., Ramírez, R., Robleto, E., Yasbin, R. E. and M. Pedraza-Reyes. (2011). Mismatch repair regulation of MutY activity drives *Bacillus subtilis* stationary-phase mutagenesis. *J. Bacteriol.* 193: 236-245.