

OBTENCIÓN DE UNA CONSTRUCCIÓN PARA EXPRESAR HETERÓLOGAMENTE AL GEN *MFD* DE *Bacillus subtilis*

Vega Quezada Indira Wendolyn (1), Ramírez Ramírez Norma (2), Pedraza Reyes Mario (2)

1 [Licenciatura en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato] | [iw.vegaquezada@ugto.mx]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [pedrama@ugto.mx]

Resumen

Mfd es una proteína multifuncional que, además de jugar un papel central en el acoplamiento de las maquinarias de transcripción y del sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER), ha sido involucrada en el proceso de mutagénesis adaptativa en células de *Bacillus subtilis* sometidas a estrés nutricional. Se amplificó el marco de lectura abierto (ORF) de *mfd* de *B. subtilis* utilizando la técnica de PCR, para posteriormente clonarlo en el vector de expresión pET28b, la construcción fue verificada mediante un análisis con enzimas de restricción. El vector de expresión inserta una etiqueta de 6 histidinas (His₆) al producto generado, lo que permitirá purificarlo mediante cromatografía de afinidad metálica y en el futuro determinar aspectos estructurales y funcionales de la proteína recombinante His₆-Mfd.

Abstract

Mfd is a multifunctional protein which in addition to playing a central role in linking the transcriptional machinery with the nucleotide excision repair system (NER) has also been involved in the process of adaptive mutagenesis in *Bacillus subtilis* cells subjected to nutritional stress. The open reading frame (ORF) *mfd* of *B. subtilis* was amplified by PCR and subsequently cloned in the expression vector pET28b. The resulting construct was replicated in *Escherichia coli* and verified by restriction analysis with the proper restriction enzymes. The expression vector insert a 6-histidine tag to purify the recombinant protein by metal affinity chromatography and studying in the future structural and functional aspects of the His₆-Mfd protein.

PALABRAS CLAVE

Bacillus subtilis; Mfd; expresión heteróloga

INTRODUCCIÓN

Mfd (mutation frequency decline) es un gen que codifica para una proteína de aproximadamente 130 kDa también conocida como Transcription Repair Coupling Factor (TRCF). En 1966 Witkin y colaboradores describieron por primera vez un factor genético capaz de prevenir la formación de mutaciones inducidas por la exposición a luz ultra violeta (UV). Las células de *Escherichia coli* competentes para este factor expresaron un fenotipo de disminución en la frecuencia de mutación [1]. *Mfd* produce un rápido decrecimiento en las mutaciones que inducen daños al ADN que causan lesiones al ADN o de obstáculos que bloquean el progreso de la ARN polimerasa (ARNP) durante la transcripción [2-3]. Primero, *Mfd* reconoce y se enlaza con la ARNP estancada en una lesión, después disocia el complejo de elongación de la transcripción, por último posee un dominio de unión a *uvrA*, esta interacción le permite reclutar a la maquinaria del sistema de reparación por escisión de nucleótidos (NER).

La secuencia de aminoácidos predicha del *orf1177* de *Bacillus subtilis* 168 comparte homología sustancial con los productos de los genes *Mfd*, *RecG* y *uvrB* de *E. coli*. La evidencia reportada in vivo y in vitro sugiere que el producto del gen *orf1177* es la contraparte de la proteína *Mfd* de *E. coli*. Por este motivo, se ha designado el nombre de *Mfd* al gen *orf1177* de *B. subtilis*. [4]. En *B. subtilis*, *Mfd* no sólo realiza estos procesos muy bien descritos, sino que también se encuentra involucrada en recombinación [5], represión catabólica del carbono [6] y más recientemente se ha encontrado que juega un papel central en modular la transcripción asociada a la mutagénesis en fase estacionaria [7].

Un reporte reciente señaló que *Mfd* tiene papeles opuestos durante el procesamiento del daño genético cuando las células de *B. subtilis* enfrentan condiciones de estrés nutricional que restringen la replicación cromosomal. En células vegetativas que no se están dividiendo, esta proteína multifuncional promueve la mutagénesis supuestamente al asistir un proceso de bypass transcripcional. En este mecanismo, *Mfd* permite al complejo de elongación de la transcripción proceder sobre una lesión del ADN a expensas de generar un mRNA alternativo que podría resultar

en una ventaja para escapar de un crecimiento restringido y de esta forma juega un papel central en la mutagénesis adaptativa [6, 8]. Por otro lado en células en esporulación, cuyas necesidades metabólicas son altamente dependientes de un programa de expresión génica, *Mfd* no sólo previene mutagénesis en los genes que se están transcribiendo, también contribuye a la eficiencia de esporulación y la supervivencia de la espora. [9]

En 2016 Gómez-Marroquín y colaboradores [10] propusieron un modelo para la producción de reversiones en el alelo *leuC427* resultando en un fenotipo prototrófico *Leu+* en células de *B. subtilis* que no se encuentran en replicación o crecimiento. Los malos apareamientos A-G/C generados en células que no están en crecimiento son reconocidos por *MutY* para eliminar la adenina producto del mal apareamiento y formar el sitio AP. Se ha demostrado que *MutY* permanece fuertemente unida al sitio de la lesión para proteger al ADN de futuro daño hasta que una serie de factores, aun no determinados, promueven su liberación y a su vez esto permite que la lesión sea reparada por componentes del sistema BER. Se especula que el complejo *MutY*sitio AP estanca la ARNP durante la transcripción de *leuC427* lo cual activa un evento dependiente de la proteína *Mfd* para generar la reversión A G en este alelo. En este modelo la función de *Mfd* es requerida para disociar el complejo de elongación de la transcripción seguido del reclutamiento de actividades de escisión, síntesis y reparación del ADN [10]. Esto sugiere que las lesiones no voluminosas que comprometen la transcripción son procesadas con propensión al error en células nutricionalmente estresadas a través de la vía BER y de la proteína *Mfd*. Resulta de gran interés obtener evidencia experimental que soporte esta hipótesis. Se tiene como perspectiva sobre-expresar y purificar la proteína *Mfd*, realizar estudios in vitro y poder analizar la interacción entre esta proteína, *MutY* y otros factores, así como dilucidar el mecanismo (s) empleado por *Mfd* para promover eventos mutagénicos en células en ayuno de *B. subtilis* deficientes del Sistema GO y las AP endonucleasas *Nfo* *ExoA* *Nth*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas, los plásmidos y oligonucleótidos que se utilizaron en este estudio se listan en las tablas 1, 2 y 3 respectivamente.

Tabla 1: Cepas empleadas en este estudio

Cepa o plásmido	Genotipo o fenotipo	Referencia
PERM 100	<i>E. coli</i> DH5 α	Colección de cepas del laboratorio de M. Pedraza-Reyes
PERM 1325	<i>E. coli</i> DH5 α + pET28b Kn ^R	Colección de cepas del laboratorio de M. Pedraza-Reyes
PERM 1579	<i>E. coli</i> DH5 α que contiene la construcción pJET1.2/blunt + ORF del gen <i>mfd</i> de <i>B. subtilis</i> . Con sitios de restricción BamHI y Sall. Amp ^R	Este trabajo

Tabla 2: Plásmidos utilizados en este estudio

Plásmido	Descripción	Referencia
pET28b	Vector de expresión para <i>E. coli</i> Kn ^R	Colección de cepas del laboratorio de M. Pedraza-Reyes
pJET 1.2	Vector de clonación; Amp ^R	Thermo Scientific, 2015

Tabla 3: oligonucleótidos utilizados en este estudio

Oligonucleótido	Secuencia	Descripción
376	5' CCGGATCCGACAACATTCA AACCTT3'	Oligo directo para amplificar el gen <i>mfd</i> de <i>B. subtilis</i> con sitio de corte BamHI

779	5' CGGTCGACCGTTGATGAAA TGGTTTG3'	Oligo reverso para amplificar el gen <i>mfd</i> de <i>B. subtilis</i> con sitio de corte Sal.
-----	----------------------------------	---

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación del gen *mfd*

Para la amplificación del fragmento del gen *Mfd* se utilizó ADN genómico aislado de la cepa *B. subtilis* 168 y los oligonucleótidos directo, 5'CGGGATCCGACAACATTCAAACCTT3' y, reverso 5'CGGTCGACCGTTGATGAAATGGTTTG3' conteniendo sitios de restricción BamHI y Sall, respectivamente (secuencias subrayadas). Utilizando una temperatura de alineamiento de 65°C y el ADN polimerasa de alta fidelidad Vent (New England BioLabs) se obtuvo una única banda con del tamaño esperado; i.e., 3500 pb.

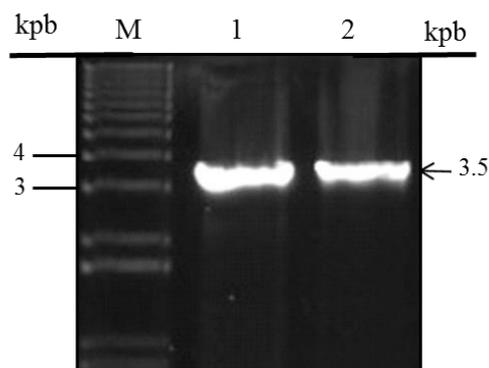


IMAGEN 1. Amplificación por PCR de un fragmento de ADN de aprox. 3,500pb del *orf Mfd*. Se obtuvo ADN genómico de *B. subtilis* 168 con el cual se montaron reacciones de PCR. Amplificación del fragmento de 3,531 pb del gen *mfd* (carriles 1 y 2). La temperatura de alineamiento utilizada fue de 65° en carriles 1 y 2.

Clonación del gen *mfd* en el vector pJET1.2/blunt

El producto de PCR del gen *mfd* obtenido, se purificó en un gel de agarosa de bajo punto de fusión y se ligó en el vector pJET1.2/blunt. Los productos de la ligación se introdujeron por

transformación a células competentes de la cepa *E. coli* DH5 α . Se seleccionaron varias colonias transformantes, se purificó su plásmido y se sujetó a análisis de restricción. En la Imagen 2 se muestran los resultados del tratamiento con las enzimas de restricción EcoRI y BglII, las bandas esperadas para EcoRI (1,330pb, 1,025pb y 4.000 pb) en los carriles 3 y 5. Las bandas correspondientes para la enzima BglII de 3,500pb y 3,000pb se muestran en los carriles 4 y 6.

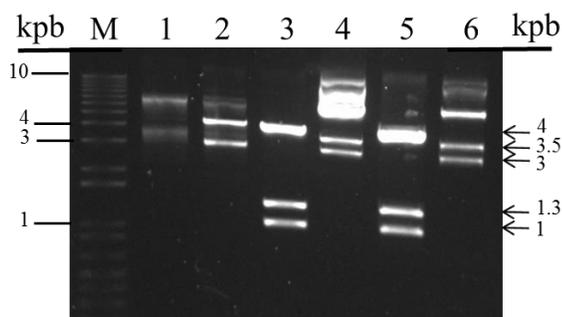


IMAGEN 2. Análisis de restricción para corroborar la obtención de la construcción pPERM1579 (pJET1.2/blunt-*mfd*). Se obtuvieron mini-preparaciones de ADN plasmídico de transformantes con las que se montaron reacciones de restricción. En los carriles 3-6 se muestra el patrón de restricción para esta construcción, mostrándose las bandas con los tamaños esperados utilizando la enzima EcoRI de 1,330pb, 1,025pb y 4.000 pb en los carriles 3 y 5. Las bandas correspondientes para la enzima BglII de 3,500pb y 3,000pb se muestran en los carriles 4 y 6. Carril M: marcadores de tamaño de ADN de 1 Kpb.

Estrategia para sobre-expresar heterológamente al gen *mfd* de *B. subtilis*

Para la sobreexpresión del gen *mfd* se utilizó el plásmido pET28b específico para expresar genes en *E. coli*. Para generar la fusión pET28b-Mdf, se extrajo ADN plasmídico de la cepa *E. coli* PERM1325 que contiene el vector de expresión pET28b y junto con el plásmido pPERM1579 fueron cortados con las enzimas BamHI y Sall. Esto linearizó el vector pET28b generando una banda de 5368 pb y liberó al gen *mfd* (3,500 pb) del vector pJET1.2/blunt. El fragmento de 3,500 pb y el vector pET28b linearizado, se purificaron en geles de agarosa de bajo punto de fusión. Las muestras obtenidas de dicha purificación se utilizaron para montar reacciones de ligación. Los productos de la ligación se introdujeron por transformación en células competentes de la cepa

E. coli DH5 α mediante choque térmico siguiendo el protocolo descrito por Sambrook y col [11].

Se obtuvieron colonias transformantes las cuales se encuentran sujetas a análisis de restricción de minipreparaciones de ADN para identificar aquellas que contienen la construcción de interés.

CONCLUSIONES

Se amplificó por PCR y se clonó el gen *mfd* en el vector pJET1.2 Blunt, la construcción resultante se replicó en *E. coli*.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; Subsidios: 205744 y 221231) y de la Universidad de Guanajuato (Subsidios: DAIP-936-2016 y 1090-2016). Trabajo financiado por CONACyT y la Universidad de Guanajuato. IW. Vega Quezada agradece la beca otorgada por la DAIP para la realización de su estancia de Verano 2017.

REFERENCIAS

- [1] Evelyn M. Witkin. (1966) Radiation-Induced Mutations and Their Repair. *Science* 153: 1345-1353
- [2] Deaconescu, A.M.; Chambers, A.L.; Smith, A.J.; Nickels, B.E.; Hochschild, A.; Savery, N.J.; Darst, S.A. (2006) Structural basis for bacterial transcription-coupled DNA repair. *Cell*, 124, 507–520.
- [3] Howan, K.; Smith, A.J.; Westblade, L.F.; Joly, N.; Grange, W.; Zorman, S.; Darst, S.A.; Savery, N.J.; Strick, T.R. (2012) Initiation of transcription-coupled repair characterized at single-molecule resolution. *Nature*, 490, 431–434.
- [4] Selby, C. P. & Sancar, A. (1993). Molecular mechanism of transcription-repair coupling. *Science*, 260, 53–63
- [5] Ayora S, Rojo F, Ogasawara N, Nakai S, Alonso JC. (1996) The Mfd protein of *Bacillus subtilis* 168 is involved in both transcription-coupled DNA repair and DNA recombination.
- [6] Zalieckas JM, Wray LV, Jr, Ferson AE, Fisher SH. (1998). Transcription-repair coupling factor is involved in carbon catabolite repression of the *Bacillus subtilis* hut and gnt operons. *Mol Microbiol* 27: 1031–1038.

[7] Ross, C., Pybus, C., Pedraza-Reyes, M., Sung, H.M., Yasbin, R.E. y Robleto, E. (2006). Novel role of *mfd*: effects on stationaryphase mutagenesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 188: 7512-7520

[8] Pybus, C., Pedraza-Reyes, M., Ross, CA., Martin, H., Ona, K., Yasbin, RE. y Robleto, E. (2010). Transcription-Associated mutation in *Bacillus subtilis* cells under stress. *J. Bacteriol.* 13: 3321-3328.

[9] Ramírez-Guadiana FH, Barajas-Omelas RC, Ayala-García VM, Yasbin RE, Robleto EA, Pedraza-Reyes M. (2013). Transcriptional coupling of DNA repair in sporulating *Bacillus subtilis* cells. *Mol Microbiol.* 90: 1088–1099.

[10] Gómez-Marroquín, M., Martin, H. A., Pepper, A., Girard, M. E., Kidman, A. A., Vallin, C., Pedraza-Reyes M., Robleto, E. A. (2016). Stationary-Phase Mutagenesis in Stressed *Bacillus subtilis* Cells Operates by *Mfd*-Dependent Mutagenic Pathways. *Genes*, 7(7), 33.

[11] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold