

Construcción y Caracterización de las Cepas Mutantes *Bacillus subtilis* $\Delta yhAZ$ y $\Delta GO \Delta yhaZ$

Isis D. Romo Franco¹, Mario Pedraza Reyes²

¹Licenciatura en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato (id.romofranco@ugto.mx), ²Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato (pedrama@ugto.mx).

Resumen

La exposición cotidiana a factores extracelulares e intracelulares puede provocar lesiones en el material genético que amenazan el correcto funcionamiento de los sistemas biológicos. Las especies reactivas de oxígeno (ROS), resultantes del estrés oxidativo, modifican las bases del ADN generando la altamente mutagénica lesión 8-OxoG. El sistema GO de *B. subtilis*, compuesto por las proteínas MutM, MutY y YtkD (MutTA), permite a esta bacteria reparar e incluso prevenir los efectos citotóxicos y genotóxicos de esta lesión. Sin embargo, se ha observado que una cepa de *B. subtilis*, carente de este sistema, muestra un fenotipo de alta resistencia al H₂O₂; actualmente se desconocen de manera cabal los genes/proteínas involucradas en este fenotipo. En el presente trabajo, se pretende determinar la función bioquímica de YhaZ e investigar si esta proteína contribuye a la alta resistencia al estrés oxidativo en la cepa ΔGO . Para tal fin, se diseñó una construcción genética, en un plásmido integrativo para interrumpir el gen *yhaZ* en los fondos genéticos *B. subtilis* WT y ΔGO .

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, Estrés oxidativo, Sistema GO.

Introducción

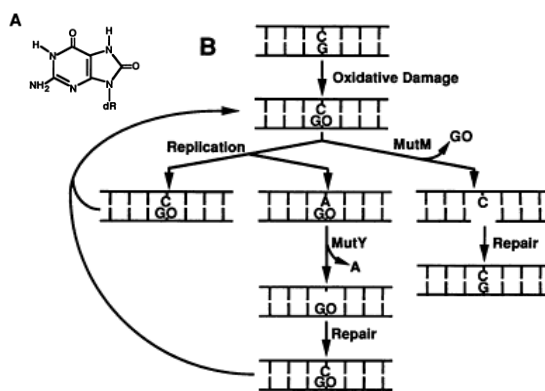


Figura 1. A) Estructura de la 8-Oxo-Guanina, la base nitrogenada predominante como consecuencia de la oxidación por ROS; B) Diagrama del sistema GO: MutM retira la 8-oxo-G, MutY retira la A mal apareada con la 8-oxo-G, MutT previene la incorporación de 8-oxo-dGTP convirtiéndola en 8-oxo-DGMP. Imagen obtenida de Michaels, 1992.

El ADN es una biomolécula esencial para la vida cuya estabilidad química se encuentra constantemente amenazada por factores ambientales, así como por subproductos del metabolismo aerobio. La exposición a la radiación ionizante, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), así como los agentes alquilantes, promueven el estrés celular afectando el buen funcionamiento de los sistemas biológicos.

Las especies reactivas de oxígeno atacan las bases de los genomas generando bases oxidadas y roturas de cadena. Estas lesiones inducen mutaciones por transversion y generan citotoxicidad. Por su bajo potencial de oxidación las guaninas del ADN son el blanco favorito de los radicales de oxígeno, generando la base análoga 8-OxoG, principal responsable de los efectos mutagénicos en los organismos. Para contender con estos problemas, los organismos cuentan con el sistema GO (Guanina Oxidada). En *B. subtilis* este sistema está integrado por las proteínas MutM, MutY y YtkD (MutTA). En conjunto, estas enzimas previenen la incorporación de 8-d-OxoGTP a la cadena de ADN (MutT), y actúan antes (MutM), o después (MutY) de la replicación del material

genético (**Figura 1**). Se ha observado que una mutante de *B. subtilis* que carece del sistema GO expresa un fenotipo hiper-mutagénico y muestra una alta resistencia a los efectos nocivos del peróxido de hidrógeno. Los factores involucrados en sustentar estos efectos no son conocidos del todo. Se ha propuesto que el gen *yhaZ* puede tener un papel importante en la respuesta ante el estrés oxidativo debido a que, según estudios de alineamientos múltiples, muestra un 58% de similitud en 208 aminoácidos con enzimas de la familia TET, capaces de transferir grupos hidroxilo al ADN¹. Interesantemente, al producto predicho de *yhaZ* no se le ha asignado una función, aunque, posee 40-50% de homología con las enzimas de reparación alquil purina ADN glicosilasa⁴. Además, Au et al. (2005) mostraron que el gen *yhaZ* cuenta con sitios de unión para LexA en la región promotora, lo cual sugiere que *yhaZ* es parte del sistema SOS.

Para determinar el papel que juega el gen *yhaZ* en respuesta al daño provocado al ADN, en este estudio se crearon mutantes nulas de *B. subtilis* deficientes en *yhaZ* tanto en la cepa silvestre (WT), como en la cepa deficiente en el sistema GO. En estudios futuros, utilizando estas mutantes, se investigará de qué manera *yhaZ* contribuye al fenotipo hiper-mutagénico e hiper-resistente a peróxido de hidrógeno en la cepa *B. subtilis* Δ GO.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas y recuperación del plásmido pMutin4-cat + *yhaZ*

Las cepas utilizadas se describen en la **Tabla 1**. Las cepas se propagaron en medio de cultivo Luria Bertani (LB), cuando se requirió el medio se suplementó con Neomicina, Tetraciclina, Estreptomina y/o Cloranfenicol. El plásmido integrativo de pMutin4-cat + *yhaZ* se aisló de la cepa PERM1814 mediante cromatografía en columna y se corroboró su correcta extracción con ensayos de restricción utilizando las enzimas BamHI y HindIII (**Figura 2.b**).

Tabla 1. Cepas, oligonucleótidos y plásmido utilizado en este estudio

| | Genotipo/Fenotipo | Fuente |
|-------------------------|--|-------------------------|
| Cepa | | |
| PERM1566 | <i>B. subtilis</i> fondo genético 451 (wild type - silvestre) | Cepario del laboratorio |
| PERM603 | <i>B. subtilis</i> Δ GO::Neo ^R Tet ^R Spc ^R | Cepario del laboratorio |
| PERM1885 | <i>B. subtilis</i> Δ GO: Δ yhaZ::Neo ^R Tet ^R Spc ^R Cm ^R | Este estudio |
| PERM1899 | <i>B. subtilis</i> Δ yhaZ::Cm ^R | Este estudio |
| Descripción | | |
| Plásmido | | |
| PERM1814 | <i>Escherichia coli</i> DH5 α conteniendo el plásmido pMutin4-cat + <i>yhaZ</i> con casete de resistencia a Cm ^R . | Cepario |
| Secuencia 5'-3' | | |
| Oligonucleótidos | | |
| Directo (840) | CGGCTGGAGGACTGGCCT | Cepario del laboratorio |
| Reverso (183) | TCCCCATGGCAGGCGGGC | Cepario del laboratorio |

Transformación de células competentes y corroboración de la obtención de las cepas mutantes

Se utilizaron los medios GMI y GMII para preparar células competentes de las cepas *B. subtilis* PERM603 y PERM1603. Las transformantes, tanto de la cepa triple mutante (Δ GO) como la cepa silvestre (WT), se

seleccionaron por resistencia a Cm (para la cepa Δ GO el antibiótico se adicionaron en conjunto con los 3 antibióticos previamente mencionados) y se caracterizaron molecularmente mediante la amplificación, por PCR en colonia de la construcción *yhaZ-lacZ* del plásmido utilizado (tamaño de 1005 pb) (**Figura 4**). La cepa cuádruple mutante (Δ GO: Δ *yhaZ*) se guardó en el cepario del laboratorio con el código *B. subtilis*1885; La cepa silvestre, con el gen *yhaZ* silenciado, se guardó en el cepario con el código *B. subtilis* 1899.

Resultados y Discusión

Recuperación del plásmido pMutin4-cat + *yhaZ*

La composición y tamaño del plásmido aislado de la cepa *E. coli* PERM1814 (**Fig. 2A**) se corroboró de manera exitosa, mediante análisis de restricción con las enzimas HindIII y BamHI. Como productos de la reacción se observó la liberación de un fragmento de 372 pb del vector integrativo pMUTIN4, el cual cuenta con un tamaño de 7700 pb (**Fig. 2B**).

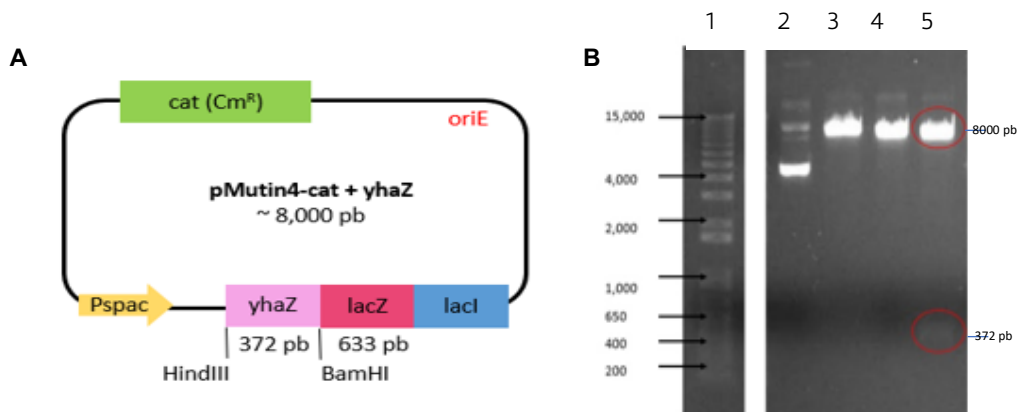


Figura 1. A) Mapa del constructo pMutin4-DyhaZ. B) Análisis de restricción que corrobora la obtención de la construcción pMutin4-DyhaZ. Carriles: 1, marcadores de ADN; 2, pMutin4-DyhaZ; 3, pMutin4-DyhaZ + BamHI; 4, pMutin4-DyhaZ + HindIII; 5, pMutin4-DyhaZ + BamHI/HindIII.

Obtención y caracterización de cepas mutantes de *B. subtilis*

A continuación, de manera independiente, se transformaron células competentes de las cepas *B. subtilis* WT y Δ GO y se seleccionaron colonias transformantes resistentes a cloranfenicol (Cm). Para demostrar la interrupción del *yhaZ*, se realizaron reacciones de PCR en ambos transformantes, utilizando oligonucleótidos específicos que amplifican un fragmento de 1000 pb (Figs. 3 y 4).

Se obtuvieron 34 colonias transformantes de la cepa WT (451) y 31 colonias resistentes de la cepa Δ GO (603). De la cepa WT se tomaron 11 colonias para verificar la amplificación de la construcción *yhaZ-lacZ*, de las cuales 10 mostraron el producto de la amplificación esperado (1005 pb) (**Figura 3.a**); Por otro lado, de la cepa Δ GO se tomaron 11 colonias para verificar la amplificación de la construcción, de las cuales 4 mostraron el producto de la amplificación esperado (1005 pb) (**Figura 3.b**).

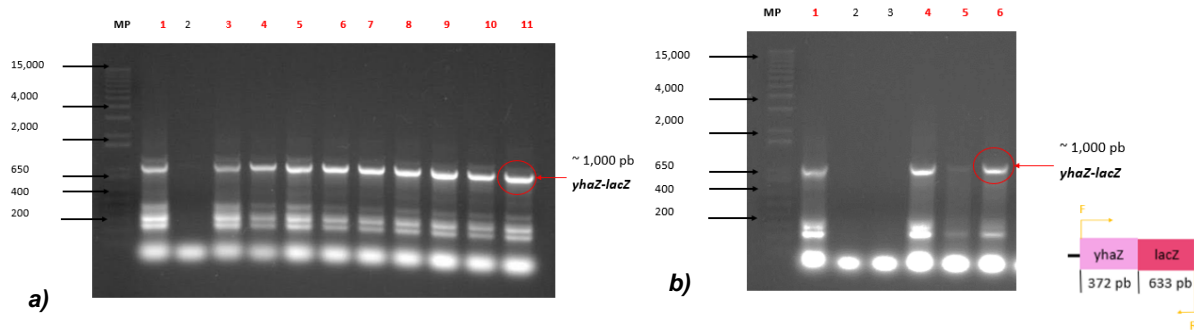


Figura 3. Corroboración por PCR en colonia de la integración de la construcción *yhaZ-lacZ* en el genoma de *B. subtilis* WT (a) y PERMDGO (b). La separación de los productos amplificados se realizó en un gel de agarosa al 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio. MP: Marcadores de peso molecular. El número sobre el carril indica el número de colonia de donde proviene la muestra. En la parte inferior izquierda se muestra el fragmento de PCR esperado (1005 pb) al utilizar oligonucleótidos directo (F) y reverso (R) para amplificar la construcción insertada en el locus *yhaZ*.

Es importante resaltar que se logró transformar a las cepas de *B. subtilis* mediante un evento de recombinación homóloga sencilla, donde el fragmento del gen *yhaZ* insertado en el plásmido reconoció a la región complementaria en el genoma de ambas cepas y se integró en compañía de todos los componentes del plásmido: caset de resistencia a cloranfenicol, promotor fuerte, gen reportero y gen represor (*Diagrama 1*).

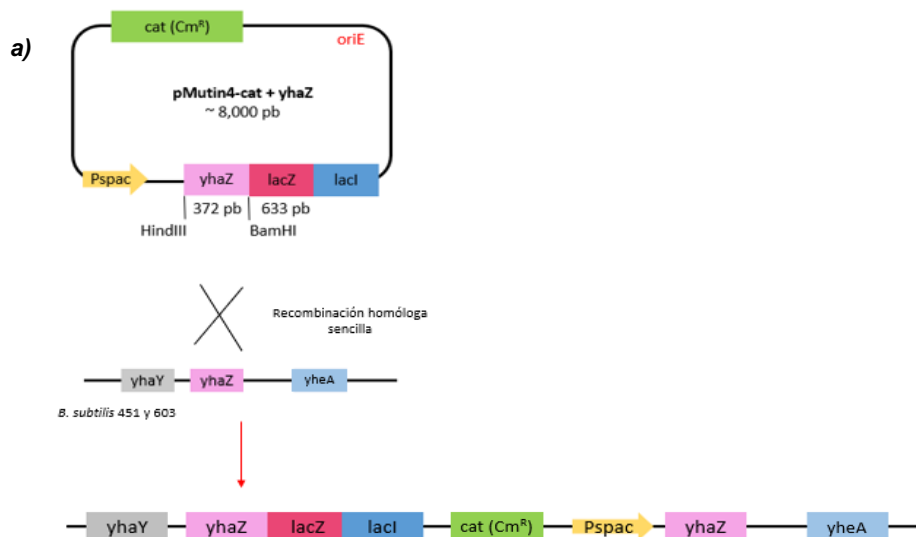


Diagrama 2. Esquema de la integración del plásmido pMutin4-cat-DyhaZ en el locus *yhaZ* del genoma de *B. subtilis*, mediante recombinación homóloga sencilla, generando colonias resistentes a Cm.

Conclusión.

Se generaron y caracterizaron molecularmente las cepas *B. subtilis* $\Delta yhaZ$ y *B. subtilis* $\Delta GO \Delta yhaZ$.

Agradecimientos

Trabajo apoyado por el CONACYT (Subsidio A-1S-27116) y la Universidad de Guanajuato (subsidio CIIC 107/2022). ID. Romo Franco agradece la beca otorgada por la DAIP durante la Estancia de Verano 2022.

Bibliografía.

- Christopher S. Nabel, Sara A. Manning, & Rahul M. Kohli. (2012). The Curious Chemical Biology of Cytosine: Deamination, Methylation, and Oxidation as Modulators of Genomic Potential. *ACS Chem Biol.* 7(1):20-30.
- Michaels, M. L., & Miller, J. H. (1992). The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7,8-dihydro-8-oxoguanine). *Journal of Bacteriology*, 174(20), 6321–6325. <https://doi.org/10.1128/jb.174.20.6321-6325.1992>
- SubtiList Web Server. <http://genolist.pasteur.fr/SubtiList/genome.cgi>
- Au, N., Kuester-Schoeck, E., Mandava, V., Bothwell, L. E., Canny, S. P., Chachu, K., Colavito, S. A., Fuller, S. N., Groban, E. S., Hensley, L. A., O'Brien, T. C., Shah, A., Tierney, J. T., Tomm, L. L., O'Gara, T. M., Goranov, A. I., Grossman, A. D., & Lovett, C. M. (2005). Genetic composition of the *Bacillus subtilis* SOS system. *Journal of bacteriology*, 187(22), 7655–7666. <https://doi.org/10.1128/JB.187.22.7655-7666.2005>
- Lenhart, J. S., Schroeder, J. W., Walsh, B. W., & Simmons, L. A. (2012). DNA repair and genome maintenance in *Bacillus subtilis*. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 76(3), 530–564.
- Vidales, LE., Cárdenas LIC, Robleto, E., Yasbin, RE., and M. Pedraza-Reyes. (2009). Defects in the Error Prevention Oxidized Guanine System Potentiate Stationary-Phase Mutagenesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 191 (2): 506-513.
- Debora, 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 (1): 236-245.
- Gómez-Marroquín M, Vidales LE, Debora BN, Obregón-Herrera A, Robleto EA, **Pedraza-Reyes M**. 2015. Role of *Bacillus subtilis* DNA glycosylase MutM in counteracting oxidative-induced DNA damage and in stationary-phase-associated mutagenesis. **J. Bacteriol.** 197(11):1963-1971.
- Suárez, V. P., Martínez, L. E., Leyva-Sánchez, H. C., Valenzuela-García, L. I., Lara-Martínez, R., Jiménez-García, L. F., Ramírez-Ramírez, N., Obregon-Herrera, A., Cuéllar-Cruz, M., Robleto, E. A., & Pedraza-Reyes, M. (2021). Transcriptional coupling and repair of 8-OxoG activate a RecA-dependent checkpoint that controls the onset of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Scientific reports*, 11(1), 2513.