

Obtención de Mutantes de *Bacillus subtilis* Deficientes en el Gen *yciB*

María J. Toledo Ramírez¹, Lissett E. Martínez Magaña.¹, Mario Pedraza-Reyes.^{1*}

¹División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología. Universidad de Guanajuato, Guanajuato, México.

(*pedrama@ugto.mx)

Resumen

El gen *yciB* codifica para una supuesta L,D transpeptidasa, perteneciente a la familia proteica YkuD. En *B. subtilis*, la transpeptidasa YciB ha sido involucrada en la biosíntesis del peptidoglicano de la pared celular. En nuestro grupo de trabajo se cuenta con una cepa deficiente del sistema GO la cual presenta un fenotipo hiperresistente a H₂O₂ e hipermutagénico. Estudios recientes de nuestro grupo de trabajo sugieren que YciB podría contribuir a este fenotipo. Para investigar este aspecto, en este trabajo se generó un plásmido integrativo para interrumpir al gen *yciB* en una cepa parental de *B. subtilis*, así como en el fondo genético isogénico *B. subtilis* DGO.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*; *yciB*; estrés oxidativo

Introducción

La pared celular bacteriana es una estructura compleja, se encarga de otorgarle protección y forma a las bacterias, está compuesta mayormente por peptidoglicano. La pared celular también se encarga de brindar protección ante los cambios de presiones, provee estructuras de anclaje a flagelos o pilis y define propiedades con relación a la virulencia y mortalidad celular. Las transpeptidasas son enzimas bacterianas, encargadas de realizar enlaces cruzados en la formación de las cadenas que construyen el peptidoglicano en la pared celular de bacterias. La familia de proteínas YkuD de *B. subtilis*, define a un grupo de transpeptidasas que participan en la síntesis de la pared celular (Ldt) y en la formación de la del septo divisional en la esporulación (YqjB), y por último YciB, una L,D transpeptidasa. La función de YciB aún no se ha definido; sin embargo, se sabe que participa en la síntesis de la pared celular ya que está localizada en los polos de esta estructura y se predice que posee actividad de transpeptidasa.

Las alteraciones en el ambiente promueven estrés en las bacterias y disminuyen su tasa de crecimiento, el estrés genera variabilidad genética que permite a los microorganismos escapar de condiciones limitantes del crecimiento. La respiración aeróbica resulta en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), incluyendo a los radicales superóxidos e hidróxilos y al H₂O₂. En proteínas, las ROS inducen la formación de grupos carbonilo en residuos de lisina, arginina, treonina y prolina, así como la oxidación de metionina para formar aductos de sulfoxido. Los aumentos transitorios en la mutagénesis se deben equilibrar con una reparación de alta fidelidad para garantizar la preservación del genoma, al mismo tiempo brinda la oportunidad de promover la diversidad genética. Las vías de reparación del ADN y vías de mutagénesis son mayormente entendidas en bacterias, de tal forma que esta información ha permitido la identificación de superfamilias de genes involucrados en la tolerancia al daño cuyos productos muestran conservación en todos los organismos. El sistema GO se encarga de la reparación de la lesión 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxo-G), así como de los anillos de imidazol guanina abiertos; permitiendo a las células incrementar la fidelidad de la replicación del material genético, Este sistema de reparación/prevenición existe en procariotas y eucariotas superiores, en *B. subtilis* se compone de las proteínas, MutM, MutT/YtkD y MutY. La lesión 8-oxo-G es la forma más frecuente del daño oxidativo en el DNA, y si no se repara, puede ser mutagénica ya que las polimerasas replicativas pueden introducir dATP frente a la base dañada durante la síntesis de DNA. Si

este desapareamiento no se repara antes del próximo ciclo de replicación, se creará una transversión GC-TA. En resumen, este sistema evita los efectos mutagénicos causados por la guanina oxidada de la cadena de DNA. En el presente trabajo, se estudia una cepa de *B. subtilis* deficiente en este sistema que posee un fenotipo hiperresistente al peróxido de hidrogeno, e hipermutagenica. Es de interés conocer si YciB está involucrada en este fenotipo, ya que un análisis proteómico mostró un incremento en la producción de esta proteína, en la cepa GO. Para abordar este aspecto, el gen codificante se interrumpió en esta mutante, así como en la cepa parental silvestre.

Materiales y métodos

Medio de cultivo

Para el crecimiento rutinario de las bacterias se utilizó medio Luria-Bertani (LB), dependiendo de la cepa de interés, este medio se suplementó con los siguientes antibióticos, Ampicilina (Amp; 2µl/mL), cloranfenicol (Cm; 1µl/mL), neomicina (Neo; 2µl/mL), tetraciclina (Tet; 3µl/ml) y espectinomycin (Sp; 4µl/mL). La preparación de células competentes y transformación de *E. coli* y *B. subtilis*, se llevó a cabo mediante procedimientos previamente publicados.

Condiciones de cultivo

Se tomaron las siguientes consideraciones para todos los experimentos: 1) los cultivos en medio líquido fueron incubados a 37°C con agitación constante (250rpm); 2) Los preinoculos se dejaron en crecimiento durante toda la noche en medio LB líquido diluidos 100 veces en el medio correspondiente al día siguiente; c) las cepas mutantes fueron protegidas de la luz ambiental; y 4) los cultivos en medio sólido se incubaron a 37°C. El crecimiento en medio líquido se determinó mediante la medición de la densidad óptica a 600 nm (DO_{600nm}) en un espectrofotómetro Pharmacia Biotch Ultrospec 200, Bichrom (Cambridge, UK).

Construcción de plásmidos y obtención de cepas bacterianas.

Las cepas de *B. subtilis* y *E. coli*, así como plásmidos empleados se describen en la Tabla 1. La cepa *B. subtilis* 451 se utilizó como referencia para comenzar el experimento, empleada para extracción de ADN genómico para las amplificaciones por PCR con los oligonucleótidos seleccionados. Los plásmidos empleados en este proyecto se muestran en la Tabla 2.

Las reacciones en cadena polimerasa (PCR) se realizaron con los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 3, utilizando un equipo Mastercycler EPgradient Eppendrf (Hamburg, Germany). Cuando se requirió, los productos de PCR se clonaron en el vector de mantenimiento pJET1.2/blunt, transformando células competentes de *E. coli* DH5α. Una vez terminadas y caracterizadas las células transformantes, se almacenaron a -80°C en glicerol al 50%.

Las reacciones de restricción enzimática se llevaron a cabo por 1 a 2h, a 37°C, mientras que las reacciones de ligación se llevaron a cabo por 1 h a 23°C. Los productos obtenidos de las PCRs o de las reacciones de restricción se analizaron en geles de agarosa al 1% (p/v) conteniendo bromuro de etidio (0.25 µg/ml). En ocasiones, los productos de las restricciones enzimáticas y de PCRs fueron purificados en geles de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% (p/v) conteniendo bromuro de etidio (2.5µg/ml).

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados

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 1479	<i>E. coli</i> DH5- α + pMUTIN4-cat con un fragmento del gen <i>ypvA</i> con sitios de restricción EcoRI y BamHI.	Colección de cepas del laboratorio de M. Pedraza-Reyes
PERM 1884	<i>E. coli</i> DH5- α conteniendo la construcción pJET 1.2/blunt – <i>yciB</i> (se clonó un fragmento interno de ~281 pb del ORF de <i>yciB</i> , con sitios de restricción EcoRI y BamHI. Corroborado por restricción, Amp ^R	Colección de cepas del laboratorio de M. Pedraza Reyes.
PERM 1893	<i>E. coli</i> DH5- α conteniendo la construcción pMUTIN 4-cat con un fragmento de <i>yciB</i> de ~281 con sitios de restricción EcoRI y BamHI. Cm ^R .	Colección de cepas del laboratorio de M. Pedraza Reyes.
PERM451	Wild type <i>trpC2</i> revertant of strain 168	Colección de cepas del laboratorio de M. Pedraza Reyes.
PERM603	PERM 451 <i>ytkD::Neo</i> , <i>mutY::Sp</i> , <i>mutM::Tc</i> <i>Neo^RSp^RTc^R</i>	Colección de cepas del laboratorio de M. Pedraza Reyes.

Tabla 2: plásmidos utilizados en este estudio

Plásmido	Descripción	Referencia
pMUTIN 4-cat	pMUTIN al cual se le cambió el cassette de resistencia de Eri a Cm	Colección de cepas del laboratorio de M. Pedraza Reyes.
pJET 1.2 Blunt	Vector de clonación con cassette de resistencia a Amp	Thermo Scientific, 2015

Tabla 3. Oligonucleotidos utilizados en este estudio

Oligonucleótido	Secuencia	Descripción
895	5' <u>GCGAATT</u> CCGGTTCGAAAACATAACGGACG-3'	Oligo directo para amplificar el gen <i>yciB</i> de <i>B. subtilis</i> para clonarse en el vector pMUTIN4-cat con sitio de corte EcoRI
896	5' <u>GCGGATCC</u> GCCTTCTGGTATCCTTCGGA-3'	Oligo reverso para amplificar el gen <i>yciB</i> de <i>B. subtilis</i> para clonarse en el vector pMUTIN4-cat con sitio de corte BamHI
183	5'GCAGCAACGAGACGTAC-3'	Oligo reverso interno a <i>lacZ</i> para corroborar mutantes de <i>B. subtilis</i> con el plásmido pMUTIN4-cat

Resultados

Amplificación de un fragmento de *yciB* mediante PCR.

Se seleccionó un fragmento interno del ORF de *yciB* de ~281 pb para amplificarlo por PCR (Fig. 1^a), utilizando DNA polimerasa de alta fidelidad, DNA genómico de la cepa *B. subtilis* 451, así como los oligonucleótidos, directo 5' GCGGATCCGCCTTCCTGGTATCCTTCGGA-3' y reverso 5'GCGGATCCGCCTTCCTGGTATCCTTCGGA-3', conteniendo sitios de corte EcoRI y BamHI, respectivamente. Para la amplificación se probaron tres temperaturas 60.3°C, 65.3°C y 70.3°C con el fin de encontrar la temperatura de alineamiento. La amplificación del fragmento de interés se obtuvo con las tres temperaturas seleccionadas, sin embargo, se decidió que la segunda temperatura era la más adecuada para amplificar el fragmento de *yciB* de interés.

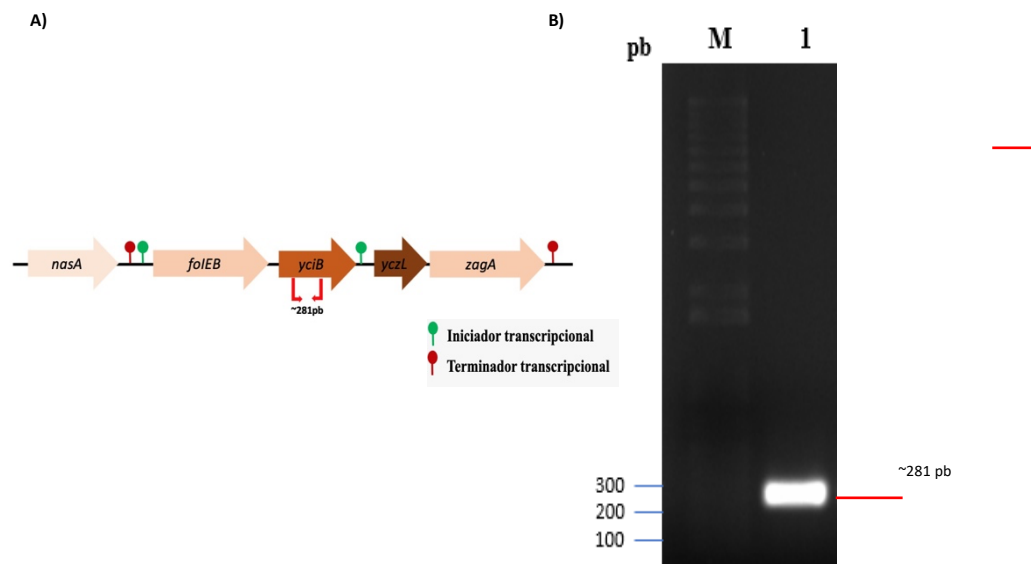


Figura 1. Estrategia de construcción de un plásmido para interrumpir al gen *yciB* de *B. subtilis*. A) Representación esquemática del locus de *yciB* y regiones aledañas, así como de la región interna de este gen que se amplificó por PCR indicado con las flechas rojas (*yciB*). B) Análisis electroforético del fragmento de la región interna de *yciB* amplificado por PCR. M: Marcadores de ADN (pb); Carril 1: Fragmento de *yciB* amplificado por PCR.

Clonación del fragmento de *yciB* en el vector pJET1.2/blunt

Una vez amplificado el fragmento de *yciB* (~281 pb), este se ligó en el vector pJET1.2/blunt utilizando la estrategia mostrada en la Figura 2A. Los productos de la ligación se transformaron en células competentes de *E. coli* DH5a. Se seleccionaron colonias transformantes resistentes a Amp. Se eligió una de estas colonias y se sujetó a un análisis de restricción de mini-preparaciones de ADN plasmídico cortando con las enzimas

EcoRI y BamHI. La Figura 2B muestra la obtención positiva del plásmido pJET1.2blunt conteniendo el fragmento del gen *yciB*, la construcción obtenida se denominó pPERM1884.

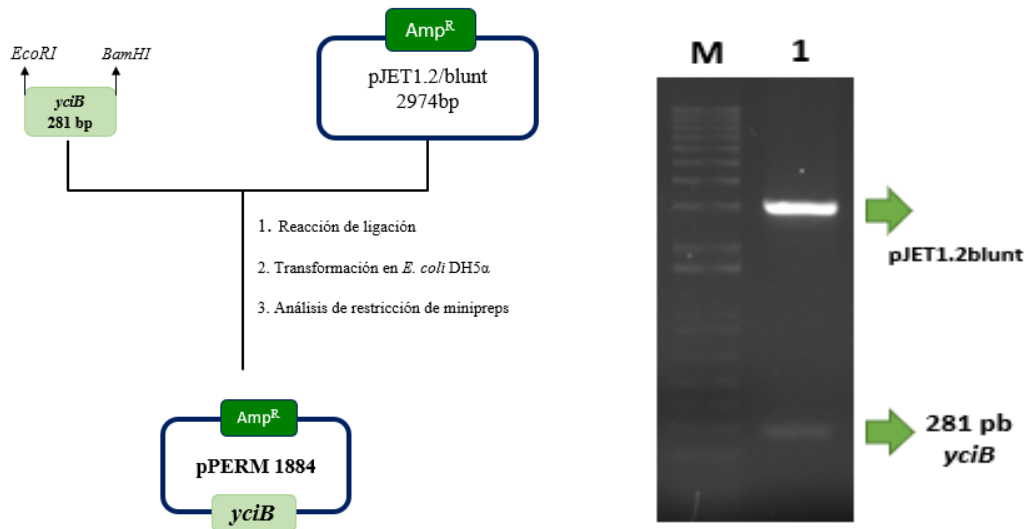


Figura 2. Estrategia de construcción y corroboración enzimática de la construcción pJET/1.2blunt-*yciB*. A) Diagrama para elaborar construcción con pJET/1.2blunt indicando los sitios de corte EcoRI y BamHI. B) Corroboración por restricción enzimática del plásmido pPERM1884 dando el patrón de bandeado esperado de aproximadamente ~281 pb (carril 1). Corte simultaneo con EcoRI y BamHI. M: marcadores de tamaño molecular.

Obtención y corroboración de una construcción integrativa para interrumpir a *yciB*.

Una vez obtenida el plásmido pPERM1884, se procedió a generar una construcción en el vector de integración pMUTIN4-cat. Para esto, el fragmento de *yciB* se liberó de este plásmido con las enzimas, EcoRI y BamHI, por otra parte, el vector integrativo pMUTIN4 también se sujetó a restricción con ambas enzimas. Tanto el vector como el inserto, se purificaron en un gel de bajo punto de fusión, y ambos se utilizaron en reacción de ligación, como se describió en Materiales y Métodos. Los productos de la ligación se transformaron en células competentes de *E. coli* DH5a, posteriormente, se seleccionaron colonias resistentes a Cm. Se eligió una de estas colonias y se procesó mediante análisis de restricción de minipreparaciones de plásmidos con las enzimas EcoRI y BamHI (Figura 3A). Los resultados mostrados en la Figura 3A corroboran la obtención de la construcción integrativa positiva, la cual se guardó en el cepario del laboratorio con el código PERM1894.

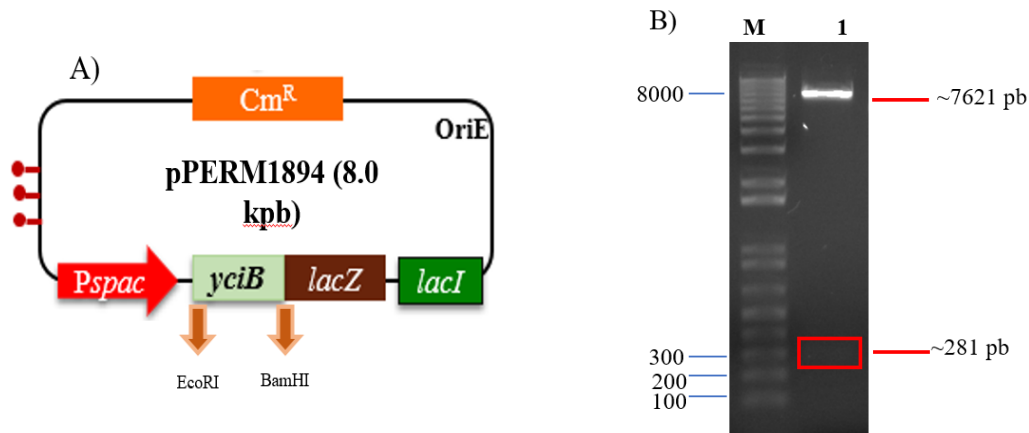


Figura 3. Estrategia de construcción y corroboración enzimática de la construcción Pmutin4-cat - *yciB*. (A, B) Corroboración por restricción enzimática del plásmido pPERM1894, dando el patrón de bandeado esperado (carril 1). Corte simultaneo con *EcoRI* y *BamHI*. M, marcadores de tamaño molecular.

Obtención de transformantes de *B. subtilis* portando una deleción en el gen *yciB*

Para interrumpir a *yciB* en los fondos genéticos *B. subtilis* Δ GO y WT, la construcción pPERM894 se utilizó para transformar células competentes de estas cepas, mediante la estrategia mostrada en la **Figura 4A**. Las transformantes obtenidas, en ambos casos, se seleccionaron en placas de medio LB suplementadas con Cm. El evento de recombinación homóloga sencilla que dio lugar a la inactivación genética de *yciB* en los fondos genéticos de interés se muestra en la **Figura 4A**. La correcta interrupción de *yciB* en ambos fondos genéticos, se corroboró por PCRs (Fig. 4B), como se muestra en las Figuras 4C y 4D, respectivamente. Las cepas de *B. subtilis* Δ *yciB* y Δ GO/ Δ *yciB* fueron almacenadas en la colección del laboratorio con los códigos *B. subtilis* PERM1897 y PERM1898 respectivamente.

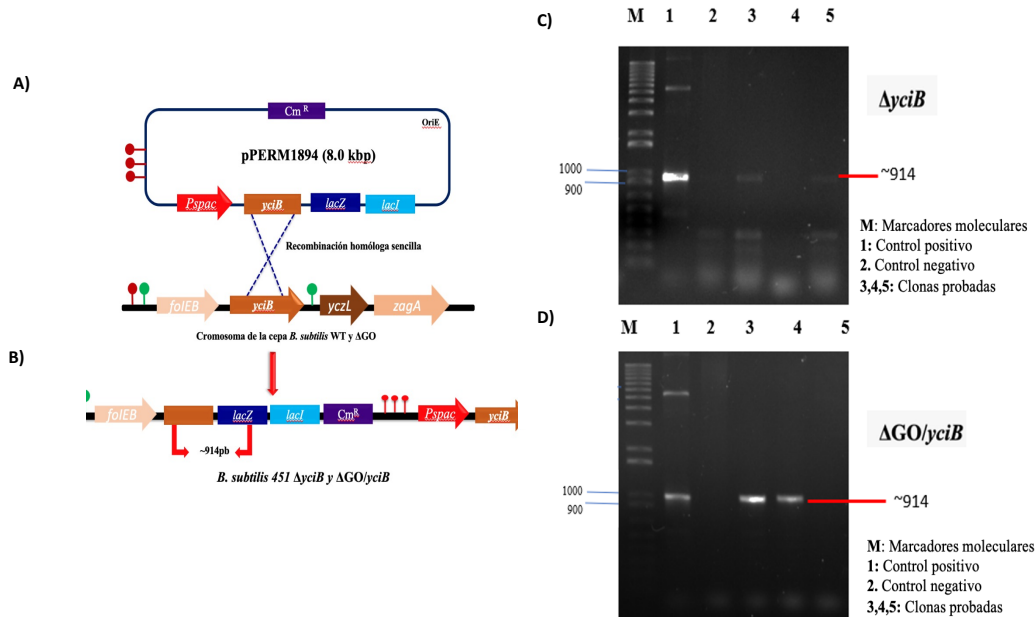


Figura 4. Interrupción del gen *yciB* de *B. subtilis*. A) Evento de recombinación homóloga sencilla que conduce a la integración del plásmido pPERM1894 en el locus *yciB* de *B. subtilis*. B) Fragmento de ADN que se amplificó por PCR, para corroborar la interrupción de *yciB*. C,D) Amplificación por PCR del fragmento esperado de ~ 914 pb que corrobora la interrupción de *yciB* en el fondo genéticos DGO (C) y WT (D), respectivamente. Carril 1, control positivo; carril 2 control negativo; Carril 3-5, clonas probadas para ambos fondos genéticos. M. Marcadores de ADN (pb).

Conclusiones

Se obtuvieron y caracterizaron molecularmente cepas mutantes de *B. subtilis* deficientes del gen *yciB*, así como mutantes deficientes del sistema GO y *yciB*. Estas cepas se utilizarán para estudiar la contribución de *yciB* al fenotipo de hiperresistencia al estrés oxidativo de la cepa ΔGO de *B. subtilis*.

Referencias

- D'Autréaux, B., & Toledano, M. B. (2007). ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(10), 813-824.
- Lenhart, J. S., Schroeder, J. W., Walsh, B. W., & Simmons, L. A. (2012). DNA repair and genome maintenance in *Bacillus subtilis*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 76(3), 530-564.
- 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.
4. Gelambi, M. (2020, 18 diciembre). Pared celular bacteriana: características, biosíntesis, funciones. Liferder. <https://www.liferder.com/pared-celular-bacteriana/>
<https://www.uniprot.org/uniprotkb/COSP99/entry>
- Bramkamp, M. The putative *Bacillus subtilis* L,D-transpeptidase YciB is a lipoprotein that localizes to the cell poles in a divisome-dependent manner. *Arch Microbiol* 192, 57 (2010).
- 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.
<https://artsandculture.google.com/entity/m0468r0?hl=es>