

Obtención de una mutante en el gen *ohrA* de *Bacillus subtilis*

Karina San Vicente Trujillo¹, Mario Pedraza Reyes*¹

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

(*pedrama@ugto.mx)

Resumen

Los organismos aerobios utilizan mecanismos que les permitan eliminar radicales de oxígeno producidos durante la respiración, así como los que derivan de su interacción con el medio ambiente. Las alteraciones en el balance de las moléculas oxidantes y los procesos encargados de eliminarlos generan estrés oxidativo. Los radicales producidos por este tipo de estrés, pueden generar daños a las biomoléculas de la célula y causar lesiones en el ADN. A este fenómeno se le conoce como estrés oxidativo. El sistema de la guanina oxidada (GO) previene y repara lesiones en el ADN causadas por el estrés oxidativo, sin embargo, se ha demostrado que en *Bacillus subtilis* la deficiencia de este sistema convierte a las células hiperresistentes al peróxido de hidrógeno. El gen *ohrA* codifica para una peroxirredoxina que ayuda a proteger a las células contra peróxidos orgánicos. En un análisis proteómico de la cepa *B. subtilis* Δ GO, la síntesis de la proteína OhrA se encontró aumentada al someter a la cepa a estrés por peróxido de hidrógeno. Para estudiar la contribución de *ohrA* en la resistencia al peróxido de hidrógeno de la cepa Δ GO, en este estudio se diseñó una construcción para interrumpir al gen *ohrA* de la cepa *B. subtilis* WT y una mutante deficiente en el sistema GO, respectivamente.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, *ohrA*, peroxirredoxina, sistema GO, estrés oxidativo

Introducción

Bacillus subtilis es una bacteria Gram positiva, no patógena, puede proliferar en distintos ambientes, posee morfología bacilar y es capaz de formar endosporas. Gracias a la facilidad con la que puede ser manipulada genéticamente y a que se cuenta con la secuencia completa de su genoma, *B. subtilis* ha sido ampliamente utilizado como modelo de estudio ^[1].

Los organismos aerobios como *B. subtilis* utilizan mecanismos moleculares para eliminar las especies oxidantes que se generan durante su metabolismo y en su interacción con el ambiente. El estrés oxidativo es causado por una producción desmedida de especies oxidantes las cuales pueden dañar las biomoléculas incluyendo a los ácidos nucleicos ^[2]. La principal lesión producida en el ADN por el estrés oxidativo es el 8-oxo-dGTP, un precursor oxidado que frecuentemente se incorpora al ADN opuesto a la adenina ^[3]. Además, la oxidación directa del ADN genera 8-oxo-dG, la cual induce mutaciones, por transversión, principalmente GC \rightarrow TA y AT \rightarrow CG ^[4].

El sistema de la Guanina oxidada (GO) es una ruta dedicada a reparar y prevenir las lesiones en el ADN causadas por el estrés oxidativo mejorando la fidelidad de la replicación del ADN. El sistema GO en *B. subtilis* emplea las ADN glicosilasas MutM y MutY, la primera remueve la 8-oxo-G de los apareamientos 8-oxo-G:C y la segunda, hidroliza la adenina de los desapareamientos 8-oxo-G:A ^[5]. Además, los efectos mutagénicos del 8-oxo-dGTP son prevenidos por la 8-oxo-dGTP/GTPasa, YtkD, la cual hidroliza la molécula 8-oxo-GTP que se encuentra en estado oxidado hasta transformarla en 8-oxo-dGMP que no funciona como sustrato de la polimerasa y de esta manera se evita la incorporación de la molécula oxidada al ADN ^[5].

La exposición a especies reactivas de oxígeno desencadena repuestas adaptativas únicas más allá de la respuesta general al estrés. En *B. subtilis* los efectos del peróxido de hidrógeno inducen respuestas controladas por sigma B, regulón del estrés general; PerR, regulón que responde ante el H₂O₂, pero muy poco ante los peróxidos orgánicos y OhrR (represor débilmente activado por H₂O₂, pero capaz de responder ante los hidroperóxidos orgánicos como el tertbutil hidroperóxido ^[6,7].

Las proteínas Ohr son peroxididasas dependientes de tior que contienen dos cisteínas muy conservadas y que catalizan la reducción de peróxidos a alcoholes oxidando sus residuos de cisteína y liberando agua [7]. El gen *ohrA* de *Bacillus subtilis* (~426 pb) codifica para una peroxirredoxina (141 aminoácidos) cuya función es proteger a la célula contra peróxidos orgánicos al catalizar la reducción de diversos hidroperóxidos orgánicos utilizando residuos de cisteína [2,8]. Su expresión es regulada por el factor Sigma A y por el represor OhrR [8].

Estudios previos demostraron que una cepa de *B. subtilis* deficiente en el sistema GO (Δ GO) exhibió un fenotipo hipermutagénico e hiperresistente al peróxido de hidrógeno [9]. Un análisis proteómico de la cepa Δ GO demostró que la proteína OhrA aumenta su síntesis cuando se induce estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno, por ello, con el objetivo de estudiar el papel de *ohrA* en la hiperresistencia al peróxido de hidrógeno de la cepa Δ GO, en este estudio se obtendrán mutantes de *B. subtilis* en este gen.

Materiales y métodos

Tabla 1: Cepas utilizadas en este estudio

Cepa	Descripción	Referencia
PERM 451	<i>Bacillus subtilis</i> Cepa Silvestre, trpC ₂	Colección de cepas del laboratorio
PERM 603	<i>Bacillus subtilis</i> 451 <i>ytkD::Neo, mutY::Sp, mutM::Tc</i> Resistente a Neomicina, Espectinomina y Tetraciclina	Colección de cepas del laboratorio
PERM 100	<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Colección de cepas del laboratorio
PERM 1479	<i>Escherichia coli</i> DH5 α conteniendo el plásmido pMUTIN-4-cat más un fragmento interno del gen <i>ypvA</i> (516 pb), con los sitios de corte EcoRI y BamHI. Resistente a Cloranfenicol.	Colección de cepas del laboratorio
PERM 1886	<i>Escherichia coli</i> DH5 α conteniendo la construcción pJET- <i>ohrA</i> . Un fragmento de ~274pb. Corroborado por restricción con las enzimas EcoRI y BamHI. Resistente a Ampicilina.	Este estudio
PERM 1889	<i>Escherichia coli</i> DH5 α conteniendo la construcción pMUTIN 4-cat más un fragmento de ~ 274pb de <i>ohrA</i> corroborado por restricción con EcoRI y BamHI. Resistente a Cloranfenicol.	Este estudio
PERM 1904	<i>Bacillus subtilis</i> 451 <i>ohrA::Cm</i> Resistente a Cloranfenicol	Este estudio
PERM 1903	<i>Bacillus subtilis</i> 451 <i>ytkD::Neo, mutY::Sp, mutM::Tc, ohrA::Cm</i> Resistente a Neomicina, Espectinomina, Tetraciclina y Cloranfenicol	Este estudio

Tabla 2: Plásmidos utilizados en este estudio

Plásmido	Descripción	Referencia
pJET1.2/blunt	Vector de clonación con casete de resistencia a Ampicilina	Thermo Fischer Scientific, 2015
pMUTIN-4-cat	pMUTIN-4 al cual se le cambió el casete de resistencia de Eri a Cm	Colección de cepas del laboratorio

Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados en este estudio

Oligonucleótidos	Secuencia	Descripción
893	5'-GCGAATTCGCGGTAGGAGGAAGAGAAGGA-3'	Oligonucleótido directo para amplificar una región interna del gen <i>ohrA</i> de ~274pb para clonarse en vector pMUTIN-4-cat. Con sitio de corte EcoRI.
894	5'- GCGGATCCCGTCACCCAGCTTATAGCC-3'	Oligonucleótido reverso para amplificar una región interna del gen <i>ohrA</i> de ~274pb para clonarse en vector pMUTIN-4-cat. Con sitio de corte BamHI.

Medios de Cultivo

El medio de cultivo utilizado para el crecimiento de las diferentes cepas con las que se trabajó en el desarrollo de este estudio fue el medio Luria-Bertani (LB). Este medio fue suplementado con Ampicilina (Amp), Cloranfenicol (Cm), Neomicina (Neo), Espectinomomicina (Sp) o Tetraciclina (Tc).

Replicación *in vitro* y clonación del gen *ohrA*

El ADN genómico aislado de la cepa PERM 451 de *B. subtilis* (Tabla 1) se usó como molde para la amplificación *in vitro* de un fragmento interno de ~274 pb del marco de lectura abierto del gen *ohrA* mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos 893 y 894 (Tabla 3). Se generó un gradiente de temperatura en la etapa de alineamiento para obtener una amplificación óptima del fragmento, que una vez obtenido, fue purificado en un gel de bajo punto de fusión y ligado en el vector de mantenimiento pJET1.2/blunt (Tabla 2). Los productos de la ligación se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α . Las colonias fueron seleccionadas por su resistencia a Ampicilina. Se extrajo ADN plasmídico de varias colonias transformantes y se realizó el análisis por restricción con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*.

Transformación de células de *Escherichia coli* con la construcción pMUTIN-4-cat-*ohrA*

El vector integrativo pMUTIN-4-cat se purificó de la cepa PERM 1479 (Tabla 1) y se sujeto a restricción con las enzimas *EcoRI* y *BamHI*. El gen *ohrA*, cortado con las mismas enzimas, se ligó en pMUTIN4-Cat. El producto se transformó en células competentes de *E. coli* DH5 α , las cuales fueron seleccionadas en placas de medio LB adicionado con Cloranfenicol. Se extrajo el ADN plasmídico de varias colonias y se realizó la corroboración de la construcción de interés mediante análisis de restricción empleando las enzimas *EcoRI* y *BamHI*.

Transformación en *Bacillus subtilis*

Para la obtención de una mutante de *B. subtilis* Δ *ohrA* se prepararon células competentes de las cepas *B. subtilis* 451 (parental) y *B. subtilis* Δ GO/*ohrA*, de la cepa 603 (Δ GO), y, estas se transformaron con el plásmido pMUTIN-4-cat-*ohrA*. Se seleccionaron colonias de ambas transformantes en placas suplementadas con Cloranfenicol, Neomicina, Espectinomomicina, Tetraciclina y Cloranfenicol.

Posteriormente se realizaron extracciones del ADN genómico de las transformantes y se corroboró la interrupción de *ohrA* mediante de PCR con los oligonucleótidos 893 y 183 (Tabla 3).

Resultados y discusión

Amplificación del gen *ohrA* por PCR

Se diseñaron los oligonucleótidos 893 y 894 (Tabla 3) para amplificar una región interna del marco de lectura del gen *ohrA*, como se muestra en la figura 1.1.

Se establecieron las condiciones óptimas de alineamiento de los oligonucleótidos para realizar una correcta amplificación de la región interna del marco de lectura del gen *ohrA*. Como muestra la Figura 1.2, el análisis electroforético del producto de la PCR permite observar una única banda de aproximadamente 274 pb correspondiente al amplicón esperado al utilizar los oligonucleótidos 893 y 894 que alinean en los sitios mostrados en la Figura 1.1.

1)

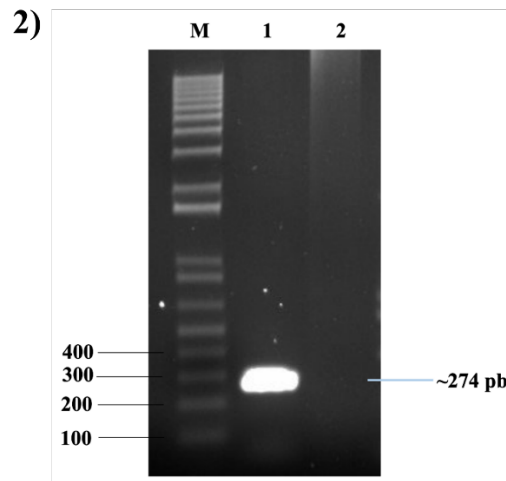
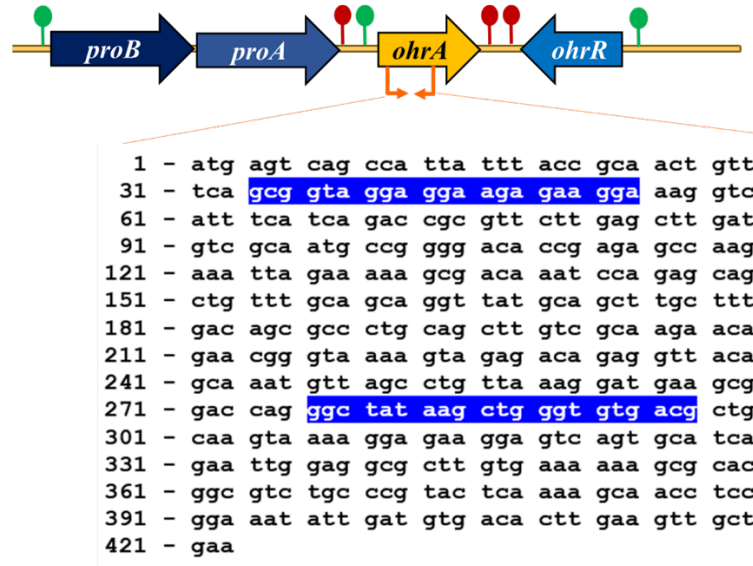
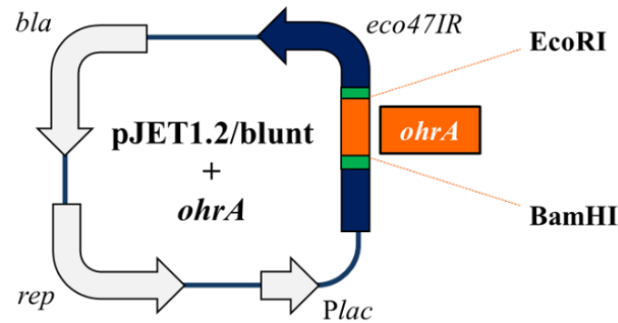


Fig. 1. PCR para amplificar una región interna del marco de lectura del gen *ohrA* de *Bacillus subtilis*. 1.1) Representación esquemática y secuencia amplificada. Los oligonucleótidos utilizados se muestran en azul. 1.2) Amplificación por PCR. El amplicón generado es de 274 pb. (M) Marcadores de tamaño molecular 1kb. (1) Amplificación de *ohrA* (2) Control negativo conteniendo únicamente el oligonucleótido directo.

Corroboración de la construcción pJET1.2/blunt-*ohrA*

Se purificó el amplicón de 274 pb de *ohrA* en un gel de agarosa de bajo punto de fusión y se insertó en el vector pJET1.2/blunt mediante una reacción de ligación. La construcción resultante (figura 2.1) fue insertada en células competentes de *E. coli* DH5 α . Las células transformantes fueron seleccionadas por su resistencia a ampicilina. La construcción fue corroborada por restricción empleando las enzimas EcoRI y BamHI ya que los sitios de corte de estas enzimas se encuentran insertados en el fragmento de interés como muestra la figura 2.

1)



2)

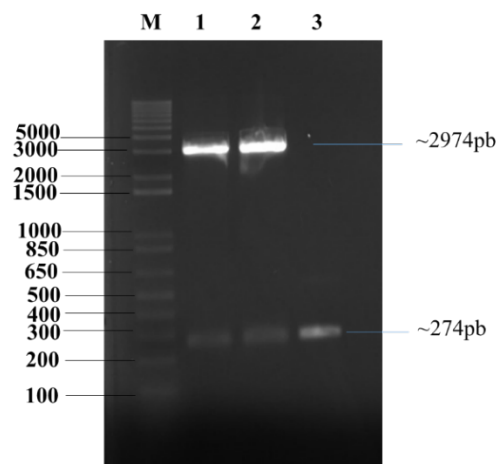


Fig. 2. Obtención de la construcción pJET1.2/blunt-ohrA. 2.1) Representación esquemática de la construcción con el vector de mantenimiento pJET1.2/blunt más un fragmento del marco de lectura de *ohrA*, se muestran los sitios de corte utilizados. 2.2) Corroboración de la construcción pJET1.2/blunt-ohrA por restricción con las enzimas EcoRI y BamHI. (M) Marcadores de tamaño molecular, (1) Restricción con EcoRI y BamHI del Clon 1, (2) Restricción con EcoRI y BamHI del Clon 24, (3) Fragmento purificado de *ohrA*.

Una restricción exitosa resultaría en la liberación del fragmento de 274 pb de *ohrA* como muestra la figura 2.2. La banda de 2974 pb corresponde al vector pJET1.2/blunt mientras que la banda de 274 pb corresponde al fragmento de interés.

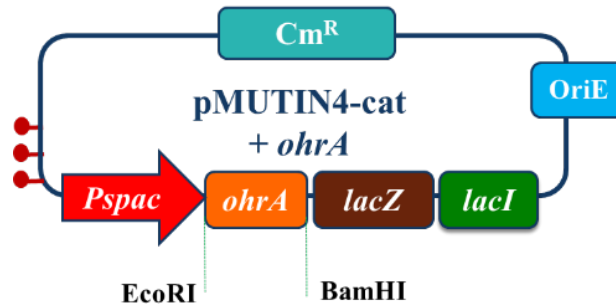
Estos resultados corroboran la correcta clonación del fragmento de *ohrA* en el vector pJET1.2/blunt. La cepa de *E. coli* DH5 α conteniendo esta construcción se guardó en la colección de cepas del laboratorio con el nombre PERM1886.

El fragmento de *ohrA* con sitios de corte EcoRI y BamHI liberado de estas reacciones de restricción se purificó en un gel de agarosa de bajo punto de fusión.

Corroboración de la construcción pMUTIN 4-cat portando el fragmento de *ohrA*

Se purificó el vector pMUTIN-4-cat de la cepa PERM 1479 previamente cortado con las enzimas EcoRI y BamHI para generar sitios de restricción compatible con el fragmento EcoRI/BamHI de *ohrA*. Se llevó a cabo una reacción de ligación entre el fragmento de *ohrA* y el vector pMUTIN-4-cat utilizando la enzima T4 DNA ligasa. La construcción resultante (Figura 3.1) fue insertada en células competentes de *E. coli* DH5 α . Las células transformantes fueron seleccionadas por su resistencia a cloranfenicol.

1)



2)

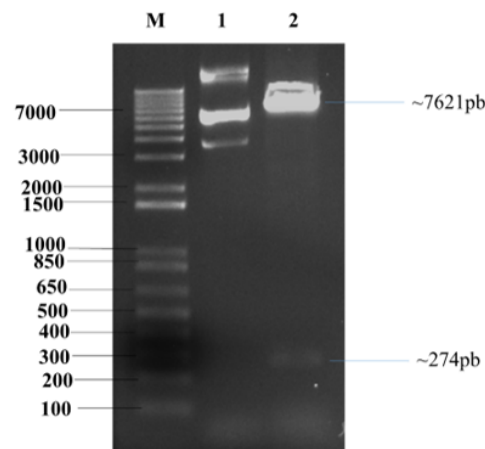


Fig. 3. Corroboración de la obtención de la construcción pMUTIN-4-cat-*ohrA*. 3.1) Representación esquemática de la construcción con el vector integrativo pMUTIN-4-cat más un fragmento del marco de lectura de *ohrA*. 3.2) Corroboración de la construcción por medio de restricción con las enzimas EcoRI y BamHI (M) Marcadores de tamaño molecular, (1) ADN plasmídico pMUTIN-4-cat-*ohrA*, (2) Restricción de pMUTIN-4-cat-*ohrA* con EcoRI y BamHI

Se aisló ADN plasmídico de las colonias transformantes y se realizó la corroboración de la construcción por restricción utilizando las enzimas EcoRI y BamHI. La figura 3.2 muestra los resultados de la corroboración en los cuales, se puede observar una banda de 274 pb correspondiente al fragmento de *ohrA* y una banda de 7621 pb correspondiente al vector pMUTIN-4-cat.

El observar las dos bandas representa una correcta construcción del vector necesario para la obtención de las mutantes en *B. subtilis*. La cepa de *E. coli* DH5 α conteniendo esta construcción se guardó en la colección de cepas del laboratorio con el nombre PERM 889.

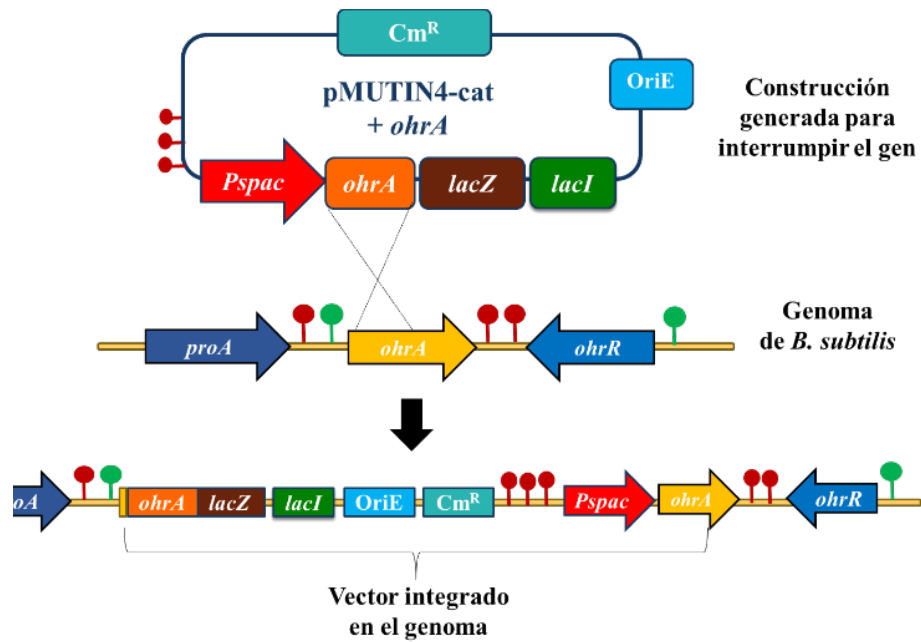
Obtención de cepas de *B. subtilis* deficientes en el gen *ohrA*

El vector pMUTIN4-cat-*ohrA* se utilizó para transformar células competentes de las *Bacillus subtilis* WT y DGO, como muestra la figura 4.1. La interrupción del gen *ohrA* ocurre mediante un evento de recombinación homóloga sencilla (Fig. 4.1).

La interrupción exitosa de *ohrA*, con la construcción, en ambos fondos genéticos, se muestra en la Figura 4.2. El análisis electroforético de los productos de la PCR en el ADN genómico de las transformantes para la obtención de la mutante nula en el gen *ohrA* permite observar una banda de ~907 pb correspondiente al amplicón esperado al utilizar el oligonucleótido 893 que se une a una región interna del marco de lectura del gen *ohrA* y el oligonucleótido 183 reverso de *lacZ*. Estos resultados demuestran la obtención de las mutantes

B. subtilis Δ *ohrA* y *B. subtilis* Δ GO/*ohrA*, las cuales se guardaron en la colección de cepas del laboratorio con los nombres PERM 1904 y PERM 1903, respectivamente.

1)



2)

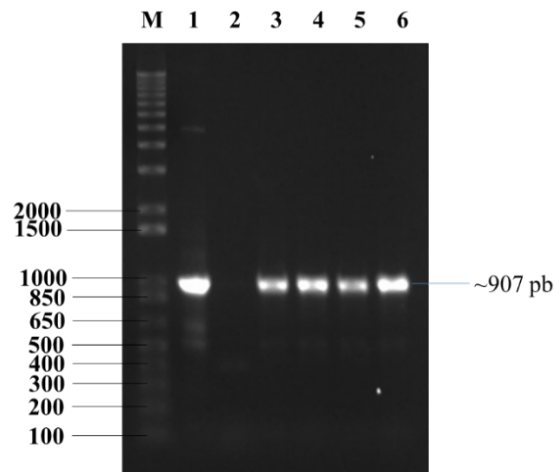


Fig. 4. Obtención de cepas mutantes de *B. subtilis* en el gen *ohrA*. 4.1) Representación esquemática de la interrupción del gen *ohrA* con la construcción pMUTIN4-cat-*ohrA*. 4.2) Obtención de las cepas de *B. subtilis* Δ *ohrA* y Δ GO/*ohrA*. (M) Marcadores de tamaño molecular 1kb, (1) Control positivo: amplificación de *ohrA-lacZ* en pDNA de la construcción pMUTIN4-cat-*ohrA*. (2) Control negativo: amplificación de *ohrA-lacZ* en DNA cromosómico de la cepa WT. (3-4) Amplificación de *ohrA-lacZ* en DNA cromosómico de las mutantes *B. subtilis* Δ *ohrA*, (5-6) Amplificación de *ohrA-lacZ* en DNA cromosómico de las cuádruples mutantes *B. subtilis* Δ GO/*ohrA*.

Conclusiones

En este estudio se diseñó, se obtuvo y se corroboró molecularmente la construcción genética pMUTIN-4-cat-*ohrA* para interrumpir el gen *ohrA* de *B. subtilis*.

Con esta construcción se obtuvieron y caracterizaron molecularmente cepas mutantes de *B. subtilis* deficientes del gen *ohrA*, así como mutantes deficientes del sistema GO y *ohrA*, que se utilizarán para estudiar la contribución de *ohrA* en proteger a la cepa Δ GO del peróxido de hidrógeno.

Agradecimientos

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Subsidio: A1-S-27116); Universidad de Guanajuato (Subsidio: CIIIC 107/2022); Veranos de la Ciencia (Karina agradece la beca otorgada para la realización de este trabajo).

Referencias

- Piggot, P.J. (2009) *Bacillus subtilis*. Encyclopedia of microbiology (3^o ed). <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123739445000365>
- Portillo, S. (2018) Peroxirredoxinas: eficientes reductoras de peróxidos y eficientemente reducidas. Función de los aminoácidos conservados en ambas reacciones. Tesis de Doctorado.
- Shibutani, S., M. Takeshita, and A. P. Grollman. 1991. Insertion of specific bases during ADN synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*. 349:431-434.
- Tajiri, T., H. Maki, and M. Sekiguchi. 1995. Functional cooperation of MutT, MutM and MutY proteins in preventing mutations caused by spontaneous oxidation of guanine nucleotide in *Escherichia coli*. *Mutat. Res.* 336:257-267
- Michaels ML, & Miller JH. (1992). The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-Hydroxyguanine (7,8-Dihydro-8-Oxoguanine). *J. Bacteriology*. 174: 621-6325.
- Reder, A., Höper, D., Gerth, U., & Hecker, M. (2012). The contribution of individual σ B-dependent general stress genes to oxidative stress resistance of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol*, JB-00528
- Cooper, D. R., Surendranath, Y., Devedjiev, Y., Bielnicki, J., & Derewenda, Z. S. (2007). Structure of the *Bacillus subtilis* OhrB hydroperoxide-resistance protein in a fully oxidized state. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 63(Pt 12), 1269–1273.
- Fuangthong, M. y col. (2001) OhrR Is a Repressor of *ohrA*, a Key Organic Hydroperoxide Resistance Determinant in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*. Jul; 183(14): 4134–4141.
- Gómez Romo, G. (2017) Elucidación de factores involucrados en la hiperresistencia al peróxido de hidrógeno de una mutante de *Bacillus subtilis* deficiente en el sistema de reparación de la guanina oxidada (GO). Tesis de Maestría.