

Resultados de Investigación de Alumnos del Verano de la Ciencia UG en el Laboratorio de Mutagénesis y Reparación de ADN en Procariotes

Karina San Vicente Trujillo¹, Karen Abundiz Yáñez¹, Estefanía Ramírez Meraz¹, Alejandra Rangel Mendoza¹, María J. Toledo Ramírez¹, Lisset E. Martínez Magaña¹, Flavio C. Rodríguez Núñez¹, Norma Ramírez Ramírez¹, Cindy L. Arellano Hernández¹, Rocío Barajas Ornelas¹, Mario Pedraza Reyes¹.

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

pedrama@ugto.mx¹

Resumen

Las condiciones metabólicas óptimas durante el crecimiento provee a las bacterias un suplemento balanceado de precursores para la síntesis de ADN, permitiendo a la maquinaria replicativa y a los sistemas de reparación duplicar fielmente sus genomas, al permitir aproximadamente un error por cada 10^9 pares de bases de ADN duplicadas. Sin embargo, en la naturaleza las bacterias enfrentan situaciones poco propicias para el crecimiento incluyendo la limitación de nutrientes y factores físico-ambientales como la desecación, el calor y las radiaciones solares. Bajo estas circunstancias, las bacterias del género *Bacillus* despliegan respuestas celulares que les permiten adoptar estados morfofisiológicos distintivos como la competencia genética, formación de esporas, así como la mutagénesis asociada a la fase estacionaria (MFE), también conocida como mutagénesis adaptativa. A través de este proceso, las bacterias generan diversidad en sus genomas para escapar de las condiciones que limitan su crecimiento y esculpir rutas evolutivas. La participación de sistemas que previenen y/o eliminan los insultos que sufre el ADN, las moléculas químicas de señalización celular, así como distintos factores que regulan la maquinaria transcripcional, han sido el objeto de las investigaciones que desarrollaron 5 alumnos de la División de Ciencias Naturales y Exactas, durante el verano de la ciencia UG-2023, en el laboratorio de Mutagénesis y Reparación de ADN del responsable de estos proyectos.

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, esporulación, germinación, mutagénesis, reparación de ADN

Obtención de una construcción para sobreexpresar el gen *yqhB* de *B. subtilis* en *Escherichia coli*

Los microorganismos deben sobrevivir a las condiciones cambiantes del ambiente en el que viven, además, necesitan generar una respuesta apropiada para asegurar su supervivencia. Para ello, han desarrollado sistemas de señalización mediados por segundos mensajeros como el di adenosín monofosfato cíclico (c-di-AMP)[1]. El c-di-AMP regula muchos procesos fisiológicos en bacterias como la detección de daño al ADN y la mutagénesis y actúa por medio de moléculas efectoras que son ampliamente desconocidas [2]. YqhB es una proteína que podría unir al c-di-AMP ya que contiene dos dominios CBS mediante los cuales une al c-di-AMP in silico. Esta reportado que esta proteína protege contra estrés oxidativo y forma parte de la respuesta de Sigma B y el regulón SOS por lo que sería un efector importante para que el c-di-AMP funcione en la modulación de la mutagénesis [3]. En este trabajo se diseñó y generó una construcción para expresar y purificar la proteína YqhB en *E. coli* para demostrar experimentalmente esta unión.

RESULTADOS

Amplificación del gen *yqhB* por PCR

El gen *yqhB* se amplificó mediante PCR utilizando como templado ADN genómico de la cepa silvestre *B. subtilis* 168 y los oligos 5'- GC GGATCC GCA AAG GAA ATT ATG GTG CC- 3' y 5'-GC AAGCTT TTC ATC CGC ATC AAA TTC ATC-3, conteniendo los sitios de corte BamHI y HindIII. En la Figura 1B se muestran el amplicon obtenido, un producto de 405 pb. El producto de PCR del gen *yqhB* se purificó de un gel de agarosa de bajo punto de fusión y se ligó en el vector pJET1.2/blunt para transformar células competentes de *E. coli* DH5α. Las colonias transformantes se seleccionaron en placas de medio LB suplementadas con Amp y la confirmación de la construcción se realizó mediante análisis de restricción de mini-preparaciones de DNA plasmídico empleando las enzimas BamHI y HindIII. El patrón esperado en las bandas, demostró la obtención de la construcción de interés a la cual se le denominó pPERM1934 (Figura 1C).

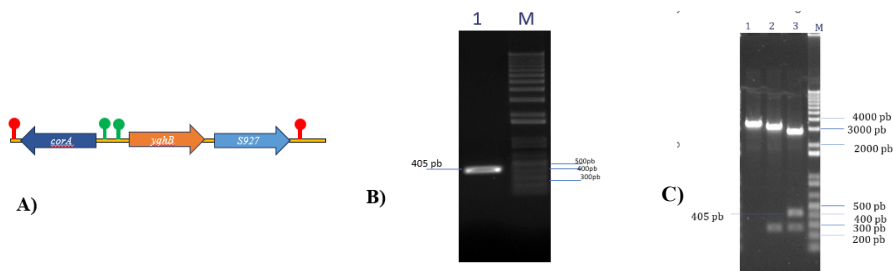


Figura 1. PCR para amplificar el marco de lectura del gen *yqhB* de *Bacillus subtilis*. **A)** Representación esquemática del gen de interés y que será amplificado. **B)** Amplificación por PCR. El amplicon generado es de 405pb. **(1)** Amplificación del gen *yqhB* **(M)** Marcadores de tamaño molecular 1kb. **C)** Corroboración de la construcción pJET1.2/blunt-*yqhB* por restricción con las enzimas BamHI y HindIII. **(1)** plásmido cortado con BamHI **(2)** plásmido cortado con HindIII **(3)** plásmido cortado con BamHI y HindIII **(M)** Marcadores de tamaño molecular 1kb

Construcción pQE30-*yqhB*

Para sobreexpresar el gen *yqhB* en *E. coli* se utilizó el vector de expresión pQE30. El gen *yqhB* se liberó del pPERM1934 y se ligó en los sitios BamHI y HindIII de pQE30; el producto de la ligación se introdujo por transformación a células competentes de la cepa *E. coli* XL10-Gold. Se eligieron algunas colonias transformantes para extraer el DNA plasmídico, el cual se digirió con HindIII/BamHI para corroborar la obtención de la construcción de interés. Los resultados de este análisis se muestran en la Figura 2. Se obtuvieron las bandas de restricción esperadas, a la construcción generada se le denominó pPERM1952.

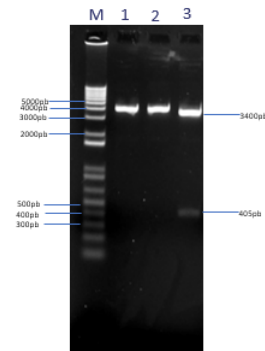


Figura 2. Obtención de cepas sobreexpresantes del gen *yqhB* en *E. coli* y corroboración de la sobreexpresión por medio de restricción enzimática (M) Marcadores de tamaño molecular 1 kb, (1) Restricción del plásmido usando la enzima BamHI. (2) Restricción del plásmido usando la enzima HindIII (3) Restricción del plásmido usando las enzimas BamHI y HindIII. Se puede observar la obtención de una banda de 3400 pb que corresponde al plásmido pQE30 y una banda de 405pb que corresponde al fragmento de *yqhB*.

CONCLUSION

Se demostró la obtención de la construcción genética pQE30-*yqhB* para la sobreexpresión de YqhB en *E. coli*. Las cepas sobreexpresantes se utilizarán para purificar la proteína en *E. coli* XL10 GOLD y cristalizarla para determinar experimentalmente si existe interacción con el c-di-AMP.

Diseño molecular de una cepa de *Bacillus subtilis* deficiente en el sistema GO y Xantina Oxidasa.

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) se producen como consecuencia del metabolismo aeróbico. El desequilibrio entre la producción de ROS y sistemas de defensa antioxidantes provoca estrés oxidativo y daño celular⁴. Para contrarrestar los efectos nocivos del estrés oxidativo, *B. subtilis* activa regulones genéticos como las respuestas SOS y de estrés por peróxidos⁴. Se ha propuesto que la proteína PucR de *B. subtilis* regula la expresión de 15 genes incluyendo al operón *pucA-B-C-D-E*, cuyos genes codifican subunidades de la xantina oxidasa (XO). Durante la hidroxilación oxidativa de la hipoxantina (HX) y la Xantina (X) para generar ácido úrico, como subproductos de la reacción, la XO genera peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y oxígeno molecular (O₂)⁵.

B. subtilis cuenta con el sistema de reparación/prevención GO, el cual se encarga tanto de prevenir como de eliminar la altamente mutagénica lesión 8-oxoG del ADN⁶. En nuestro grupo de trabajo se cuenta con una cepa deficiente del sistema GO, la cual presenta un fenotipo hiperresistente a H₂O₂ e hipermutagénico. Para investigar si la XO contribuye al establecimiento de este fenotipo, en el presente proyecto se utilizaron enfoques moleculares para inactivar genéticamente el operon *pucA-E*, en el fondo genético *B. subtilis* ΔGO.

RESULTADOS

Para investigar si la XO contribuye a la hiperresistencia al H₂O₂ de la cepa GO se generó una construcción para interrumpir al operon *pucA-B-C-D-E*. Para tal fin se amplificaron los fragmentos 5' y 3' de los genes *pucE* y *pucA* del operón de la XO a partir de DNA genómico de la cepa 451 (WT) de *B. subtilis*, los oligonucleótidos 5'-GC CCGCGG CTCCTGGAAGACCAGGAGGAG - 3' y 5'-CC GAAGCC GCGTCTCAT CTG -3', con sitios de restricción SacII/BamHI se usaron para amplificar *pucA*, mientras que para amplificar a *pucE* se utilizaron los oligonucleótidos 5'-GA GTTGCT TGAAGCGATCGAC y 5'- GA GTTGCT TGAAGCGATCGAC-3', con sitios de restricción EcoRI/XhoI (Figura 1).

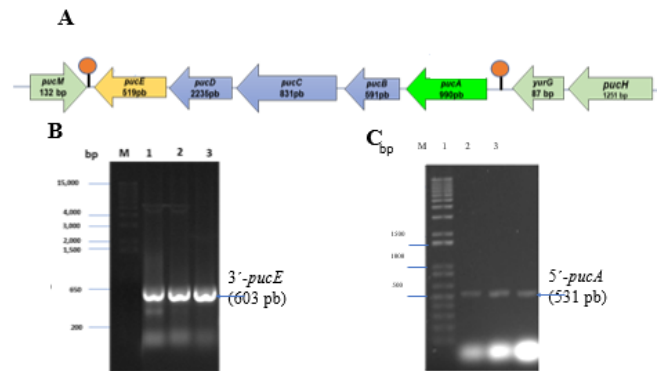


Figura 1. Amplificación de fragmentos 5' y 3' de los genes *pucA* y *pucE* del operón de la XO. A) Representación esquemática del operon *pucA-E*. B) Amplificación por PCR un fragmento de 603 pb de *pucA* (Carriles 1-3). C) Amplificación por PCR de un fragmento de 513 pb de *pucE* (Carriles 1-3).

Para obtener una construcción que interrumpa el operón *pucA-E* en *B. subtilis*, los fragmentos 5'-*pucA* y 3'-*pucE* amplificados por PCR se subclonaron secuencialmente en el vector integrativo pDG1515-Cm de acuerdo con la estrategia de la Figura 2.

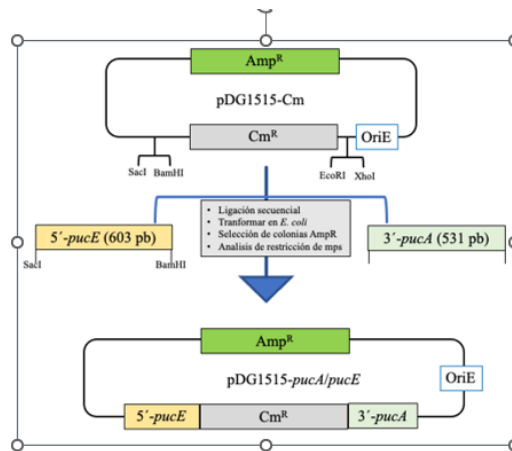


Figura 2. Obtención de una construcción para interrumpir el operón *pucA-E* mediante recombinación homóloga

CONCLUSION

Se generó y caracterizó molecularmente una construcción en el vector pDG1515 el cual contiene los brazos 3' *pucE* y 5' *pucA* del operón de la Xantina Oxidasa. Esta construcción se usará para deletar el operón que sintetiza la Xantina Oxidasa en las cepas silvestre y una mutante deficiente en el sistema_{GO}

Generación de una construcción *polA-lacZ* para analizar la expresión espacio-temporal de *polA* en *Bacillus subtilis*

B. subtilis es capaz de formar esporas, estas pueden permanecer latentes durante miles de años. La biogénesis de las esporas ocurre en un esporangio que consta de dos compartimentos, las células madre y la preespora⁷. Este proceso es estrictamente dependiente de un programa de expresión genética diferencial en ambos compartimentos del esporangio. Lesiones de ADN provocadas por factores espontáneos y ambientales, pueden comprometer la esporulación⁸. Para contender con este problema, *B. subtilis* cuenta con mecanismos de reparación que operan durante la esporogénesis, los cuáles utilizan polimerasas de baja fidelidad (BF), incluyendo a YqjH y a YqjW⁹. PolA es otra polimerasa de BF que trabaja en conjunto con los sistemas BER y NER en esta bacteria¹⁰. El objetivo de este trabajo consiste en generar y caracterizar una cepa de *B. subtilis* portando una fusión *polA-lacZ* para elucidar el patrón de expresión compartamental de *polA*, durante la esporulación de *B. subtilis*.

RESULTADOS

Amplificación (PCR) de un fragmento 5' de *polA*

Para generar una cepa de *B. subtilis* que porte la fusión *polA-lacZ* se amplificó por PCR el fragmento 5' del gen *polA* utilizando como templado el ADN genómico de la cepa silvestre de *B. subtilis* 168. En la figura 1 se muestra el amplicon obtenido, observando que al utilizar una temperatura de alineamiento de 60°C se obtuvo un fragmento del tamaño esperado ~480 pb.

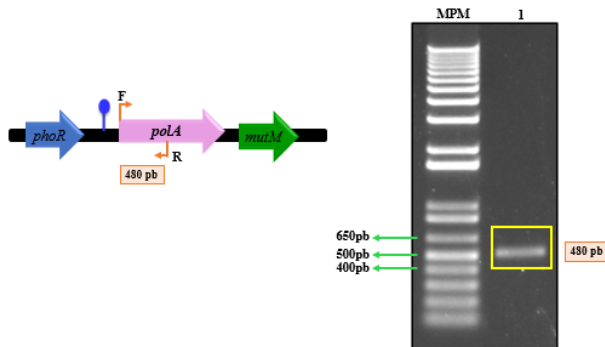


Figura 1.- Amplificación por PCR de un fragmento del extremo 5' de *polA*, con un tamaño aproximado de 480 pb. M.- Marcadores de ADN, carril 1.- Amplicón de *polA* (~480pb) . Ta=60°C, Vent Pol.

Subclonación del fragmento 5'-*polA* en el plásmido integrativo pMutin4-cat

El producto de PCR se clonó en el vector pJET1.2/blunt y se amplificó en *E. coli* generando una construcción pJET1.2/blunt-*polA*. A continuación, utilizando la estrategia que se muestra en la figura 8 el fragmento de 480 pb de *polA* se clonó en el plásmido integrativo pMUTIN-CAT. La corroboración de la construcción obtenida también se muestra en la figura 2.

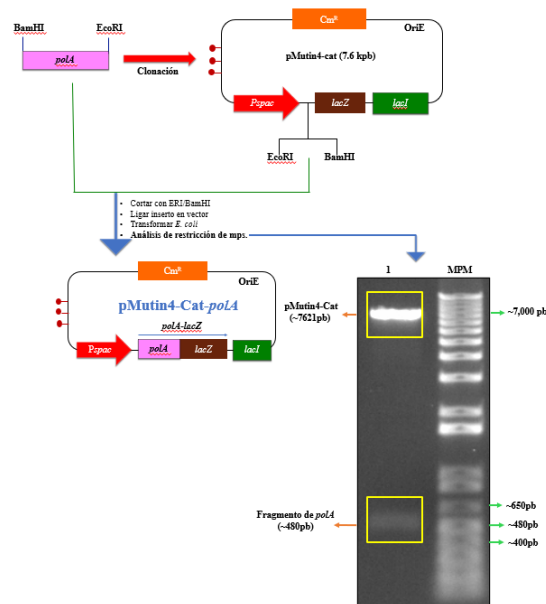


Figura 2. Análisis de restricción del plásmido pMutin4-Cat-*polA* con las enzimas BamHI y EcoRI. MPM.- Marcadores de ADN. Carril 1.- Fragmentos liberados de la construcción pMutin4-Cat-*polA* luego del corte con las enzimas de EcoRI y BamHI.

CONCLUSION

Se generó y caracterizó molecularmente una construcción génica que porta una fusión transcripcional *polA-lacZ* en el plásmido integrativo pMutin4-Cat. La integración de esta construcción en el locus *polA*, permitirá en ensayos posteriores, analizar los niveles de expresión de este gen durante el ciclo celular de *Bacillus subtilis*.

Determinación del perfil de lesiones genéticas en esporas dormantes y eclosionantes de *Bacillus subtilis*

La capacidad de las esporas de *Bacillus subtilis* para regresar al crecimiento vegetativo, depende de su integridad genómica. En este proceso denominado germinación/eclosión, es crucial reparar el daño al ADN acumulado durante la latencia¹¹. Durante la germinación/eclosión, la entrada de agua y la activación del metabolismo aeróbico pueden generar lesiones oxidativas, que pueden ser reparadas por el sistema BER, en este sistema se incluyen las AP-endonucleasas Nfo y ExoA. La deficiencia de estas proteínas genera un retardo en la germinación/eclosión de las esporas¹². Sin embargo, aun en ausencia de Nfo y ExoA, existe reparación de las lesiones oxidativas en el ADN de las esporas eclosionantes¹³. Estas observaciones sugieren la participación de otras enzimas involucradas en procesar este tipo de lesiones, como Nth y la proteína checkpoint DisA. Por lo tanto, nos enfocamos en analizar la presencia de lesiones oxidativas y establecer la dinámica de germinación/eclosión de esporas de *B. subtilis* deficientes de DisA y las principales AP-endonucleasas.

RESULTADOS

Para analizar la presencia de lesiones oxidativas en ADN de esporas de *B. subtilis* deficientes en DisA, es necesario obtener ADN cromosómico de alta pureza, para ello se implemento una estrategia para extraer

ADN de esporas eclosionantes de los distintos genotipo (Figura 1). El ADN purificado se analizo en geles de agarosa teñidos con Et-BrEt (Figura 2).

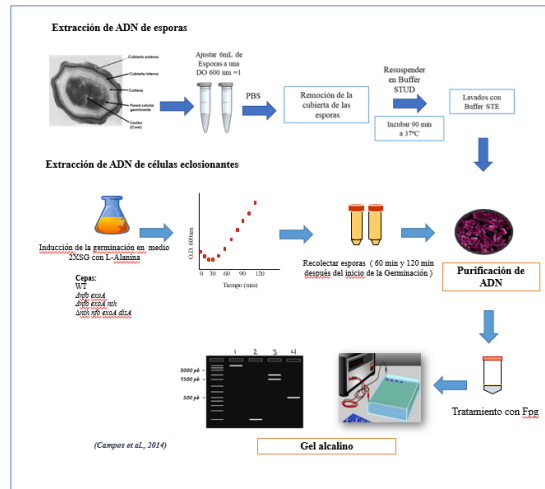


Figura 1. Estrategia para purificar ADN cromosómico de esporas eclosionantes de *B. subtilis*

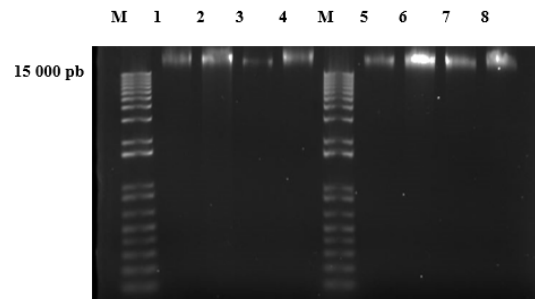


Figura 2. Análisis de ADN cromosomal purificado de esporas eclosionantes con distintos genotipos, en geles de agarosa teñidos con Et-Br. M: Marcadores moleculares. Células eclosionantes 60 min (carril 1-4) Carril 1. WT, Carril 2. *nfo exoA*, Carril 3. *nfo exoA nth* Carril 4. *nfo exoA nth disA*. Células eclosionantes 120 min (carril 5-8) Carril 5. WT, Carril 6. *nfo exoA*, Carril 7. *nfo exoA nth* Carril 8. *nfo exoA nth disA*.

CONCLUSION

Se obtuvo ADN cromosómico de alta pureza de esporas de *B. subtilis* con diferentes genotipos y se lograron estandarizar las concentraciones adecuadas para posteriormente analizar la presencia de lesiones en geles de ADN alcalinos.

Determinación de la capacidad de la proteína His₆-Cdd en la desaminación de ADN de doble cadena

La desaminación de bases del DNA es un tipo importante de alteración química, tres de las cuatro bases presentes en el DNA, citosina (C), adenina (A) y guanina (G) poseen un grupo amino exocíclico, que es susceptible a ser hidrolizado de manera espontánea bajo condiciones fisiológicas o inducidas por radiación ultravioleta, radicales de oxígeno, ácido nitroso (HNO₂), óxido nítrico (NO) y bisulfito de sodio (SB), estas alteraciones químicas conduce a la producción de bases análogas como el uracilo, hipoxantina y la xantina, las cuales son potencialmente pre-mutagénicas sino son reparadas antes de la siguiente ronda de replicación produciendo mutaciones por transición o transversión¹⁴. En nuestro grupo de trabajo se determinó que tanto YwqL como el sistema de reparación de bases mal apareadas (MMR) contrarrestan los efectos mutagénicos que causa el uracilo y bases desaminadas en el genoma de *B. subtilis*¹⁵. En el presente trabajo se investigó si la proteína recombinante His₆-Cdd, que comparte homología estructural con desaminasas de mamíferos, es capaz de desaminar DNA de doble cadena y convertirlo en sustrato de la endonucleasa YwqL, una enzima capaz de hidrolizar DNA conteniendo bases desaminadas.

RESULTADOS

Para investigar si la proteína recombinante His₆-Cdd es capaz de desaminar DNA de doble cadena, es necesario purificar la proteína a homogeneidad, para ello se siguió el protocolo descrito en la figura 1.

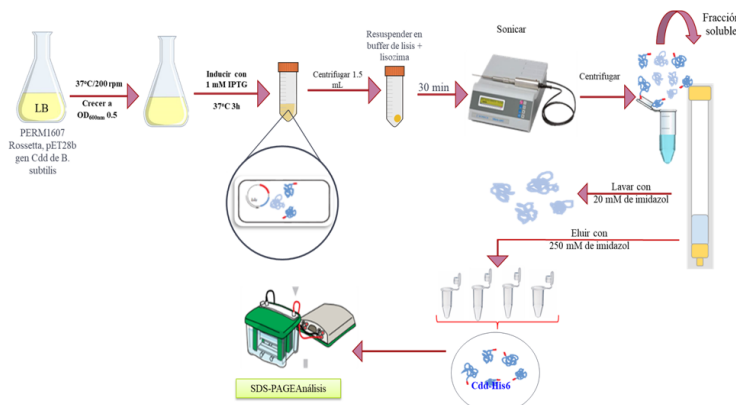


Figura 1. Estrategia de purificación de la proteína His₆-Cdd de una cepa de *E. coli* que porta una construcción para sobreproducir una proteína His₆-Cdd.

En la figura 2 se muestra que utilizando este protocolo se logro obtener una banda única de alrededor de 30 KDa (carriles 6 – 9).

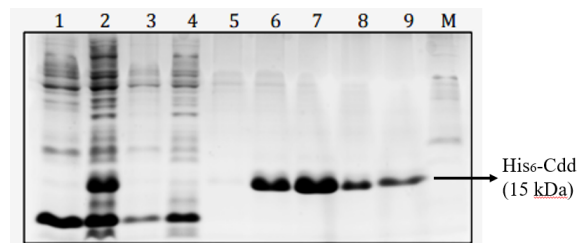


Figura 2. Análisis por SDS-PAGE 15% de la purificación de la proteína His₆-Cdd por cromatografía de afinidad metálica. Carriles: 1, extracto celular sin inductor, 2, Extracto celular inducido, 3, fracción no unida a la columna (FT), 4, fracción de lavado, 5-9, eluciones de His₆-Cdd. La proteína purificada se obtuvo de la cepa *E. coli* PERM1607.

Por otro lado, para investigar si el ADN desaminado es sustrato de YwqL, se obtuvo el extracto celular de una cepa de *E. coli* que sobreexpresa a YwqL (Figura 3).

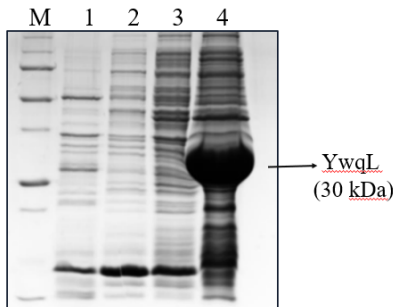


Figura 3. Análisis por SDS-PAGE 15% de la purificación de la proteína YwqL. La cepa de *E. coli* PERM 1071 que sobreexpresa a la proteína YwqL, se creció en medio LB hasta una D.O_{600nm} de 0.5, el cultivo se dividió en dos subcultivos a uno de ellos se le adicionó IPTG a una concentración final de 0.25 mM y se incubaron por 4 horas a 28 °C. Las células se cosecharon por centrifugación, se prepararon los extractos celulares y se analizaron por SDS-PAGE 15%. M marcadores de peso molecular de proteínas (kDa), 1 y 3 cultivo control; 2 y 4 cultivo inducido con IPTG. 1 y 2 fracción soluble, 2 y 4 fracción particulada.

CONCLUSION

Se purificó la proteína recombinante His₆-Cdd de *B. subtilis*, mediante cromatografía de afinidad metálica y se obtuvo el extracto celular de una cepa de *E. coli* que sobreexpresa a His₆-YwqL.

Agradecimientos. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Subsidio: A1-S-27116); Universidad de Guanajuato (Subsidio: CIIC 023/2023); Becas otorgadas a K. San Vicente, Estefanía Ramírez, María J. Toledo, Flavio C. Rodríguez, y Cindy L. Arellano, para participar en el programa de Verano de la Ciencia UG 2023.

Bibliografía

- ¹ Gundlach, J., Dickmanns, A., Schröder-Tittmann, K., Neumann, P., Kaesler, J., Kampf, J., Herzberg, C., Schwede, F., Kaever, V., Tittmann, K., Stülke, J. y Ficner, R.,(2015) Identification, Characterization, and Structure Analysis of the Cyclic di-AMP-binding PII-like Signal Transduction Protein DarA, *J. Biol. Chem.*, vol. 290(5), pp. 3069-3080.
- ² Abundiz-Yañez, K.; Leyva-Sánchez, H.C.; Robleto, E.A.; Pedraza-Reyes, M. (2023) Stress-Associated and Growth-Dependent Mutagenesis Are Divergently Regulated by c-di-AMP Levels in *Bacillus subtilis*. *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 455. <https://doi.org/10.3390/ijms24010455>
- ³ Reder A, Höper D, Gerth U, Hecker M. (2012) Contributions of individual σB-dependent general stress genes to oxidative stress resistance of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* Jul;194(14):3601-10. doi: 10.1128/JB.00528-12. Epub 2012 May 11. PMID: 22582280; PMCID: PMC3393503.
- ⁴ Storz G, Imlay JA. (1999). Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* 2:188–194.
- ⁵ Beier, L., Nygaard, P., Jarmer, H., & Saxild, H. H. (2002). Transcription analysis of the *Bacillus subtilis* PucR regulon and identification of a cis-acting sequence required for PucR-regulated expression of genes involved in purine catabolism. *Journal of bacteriology*, 184(12), 3232–3241. <https://doi.org/10.1128/JB.184.12.3232-3241.2002>

- ⁶ Vidales, L. E., Cárdenas, L. C., Robleto, E., Yasbin, R. E., & Pedraza-Reyes, M. (2009). Defects in the error prevention oxidized guanine system potentiate stationary-phase mutagenesis in *Bacillus subtilis*. *Journal of bacteriology*, 191(2), 506-513.
- ⁷ Setlow P. (1995). Mechanisms for the prevention of damage to DNA in spores of *Bacillus* species. *Annual review of Microbiology*, 49, 29–54.
- ⁸ Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR, 64(3), 548–572.
- ⁹ Fukushima, S., Itaya, M., Kato, H., Ogasawara, N., & Yoshikawa, H. (2007). Reassessment of the in vivo functions of DNA polymerase I and RNase H in bacterial cell growth. *Journal of bacteriology*, 189(23), 8575–8583.
- ¹⁰ Patlán-Vázquez, A. G., Ayala-García, V. M., Vallin, C., Cortés, J., Vásquez-Morales, S. G., Robleto, E. A., Nudler, E., & Pedraza-Reyes, M. (2022). Dynamics of Mismatch and Alternative Excision-Dependent Repair in Replicating *Bacillus subtilis* DNA Examined Under Conditions of Neutral Selection. *Frontiers in microbiology*, 13, 866089.
- ¹¹ Setlow, B., & Setlow, P. (1996). Role of DNA repair in *Bacillus subtilis* spore resistance. *Journal of Bacteriology*, 178(12), 3486-3495.
- ¹² Ibarra, J. R., Orozco, A. D., Rojas, J. A., López, K., Setlow, P., Yasbin, R. E., & Pedraza-Reyes, M. (2008). Role of the Nfo and ExoA apurinic/aprimidinic endonucleases in repair of DNA damage during outgrowth of *Bacillus subtilis* spores. *Journal of Bacteriology*, 190(6), 2031-2038.
- ¹³ Campos, S. S., Ibarra-Rodríguez, J. R., Barajas-Ornelas, R. C., Ramírez-Guadiana, F. H., Obregón-Herrera, A., Setlow, P., & Pedraza-Reyes, M. (2014). Interaction of apurinic/aprimidinic endonucleases Nfo and ExoA with the DNA integrity scanning protein DisA in the processing of oxidative DNA damage during *Bacillus subtilis* spore outgrowth. *Journal of bacteriology*, 196(3), 568-578.
- ¹⁴ Hartman, Z., Henrikson, E. N., Hartman, P. E., & Cebula, T. A. (1994). Molecular Models That May Account for Nitrous. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 175(1 994), 168–175
- ¹⁵ Patlán AG, Ayala-García VM, Valenzuela-García LI, Meneses-Plascencia J, Vargas-Arias PL, Barraza-Salas M, et al. (2019) YwqL (EndoV), ExoA and PolA act in a novel alternative excision pathway to repair deaminated DNA bases in *Bacillus subtilis*. *PLoS ONE* 14(2).