

CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA MUTANTE NULA DE *BACILLUS SUBTILIS* DEFICIENTE EN *MUTSB* Y COMPONENTES DEL SISTEMA GO

Meza Vázquez Mariana Cecilia Magdalena (1), Ramírez Ramírez Norma (2), Pedraza Reyes Mario (3)

¹ [Licenciatura en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: nena_mezita@msn.com, ²Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: noramram@hotmail.com, ³Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: pedrama@ugto.mx

Resumen

Todos los organismos se encuentran constantemente expuestos a factores intra- y extracelulares capaces de alterar la estructura del DNA provocando mutaciones y/o muerte celular. *Bacillus subtilis*, una bacteria capaz de proliferar en distintos ambientes cuenta con mecanismos para prevenir y/o eliminar los daños que sufre su material genético, incluyendo el gen *mutSB*, y el gen *mutM*. MutSB es un ortólogo del gen MutS, perteneciente a la familia de proteínas *mutS2*, pese a ello la función de MutSB no ha sido relacionada con la ruta de reparación de bases erróneamente apareadas (MMR). Se conoce que *mutSB* se expresa durante todo el ciclo de vida de *B. subtilis*. Por otro lado, *mutM* y *mutY* son DNA glicosilasas que pertenecen al sistema de reparación de la Guanina Oxidada (GO) de *B. subtilis*; estas enzimas protegen a las células de los efectos genotóxicos de agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno. Además en comparación con las células de la cepa silvestre, células de *B. subtilis* carentes de *mutM* aumentaron su frecuencia de mutación espontánea a Rifampicina (Rif). Con el propósito de investigar si existe una relación funcional entre los genes *mutM* y *mutY* con el gen *mutSB*, en este estudio se generó y se caracterizó molecularmente una cepa transformante de *B. subtilis* con mutaciones nulas en los genes *mutM* y *mutSB*.

Abstract

All organisms are constantly exposed to a wide range of intra- and extracellular agents capable of altering the DNA structure causing mutations and/or cell death. *Bacillus subtilis*, a bacterium capable of proliferating in different environments has mechanisms to prevent and/or eliminate genetic damage, including *mutSB*, and *mutM*. MutSB is an ortholog of the MutS belonging to the family of proteins MutS2,. However, the function of MutSB function has not been associated with the mismatch repair pathway (MMR). Previous results have shown that *mutSB* is expressed throughout the life cycle of *B. subtilis*. Furthermore, *mutM* and *mutY* are DNA glycosylases belonging to the Guanine Oxidized (GO) repair system of *B. subtilis*. These enzymes protect cells from the toxic effects of oxidizing agents such as hydrogen peroxide. It has been shown that compared to wild type cells, cells of *B. subtilis* lacking *mutM* increased their spontaneous mutation frequency to Rifampicin resistance (Rif). In this work, we investigated whether there is a functional connection between *mutM*, *mutY* and *mutSB*. To this end, we generated and characterized a *B. subtilis* strain bearing null mutations in *mutM* and *mutSB*.

INTRODUCCIÓN

La información genética de los organismos se encuentra almacenada en el DNA, indispensable para perpetuar la vida. Los organismos están expuestos a una amplia variedad de agentes genotóxicos (especies de oxígeno reactivas (ROS), la luz UV, radiaciones ionizantes y diversos compuestos químicos) capaces de alterar la estructura del DNA y sus precursores provocando mutaciones [1]. Aunque algunas mutaciones son letales, otras son favorables para la célula, ya que pueden brindarles ventajas para sobrevivir ante una presión selectiva existente, lo cual permitirá a la célula adaptarse [2,3]. Por lo anterior, es importante dilucidar los mecanismos involucrados en la generación de mutaciones puesto que juegan un papel esencial en la generación de diversidad genética, patogénesis y evolución. Las bacterias representan un extraordinario modelo de estudio para entender los mecanismos moleculares que rigen este proceso [2,3]. En nuestro grupo de trabajo hemos utilizado a *B. subtilis* para entender el papel que juegan distintos sistemas de reparación en modular la mutagénesis en células en ayuno, carentes de división [3]. Notablemente, se ha demostrado que la tasa de mutación en este organismo está influenciada por la respuesta al estrés fisiológico [2,3].

Antecedentes

En *B. subtilis* el gen *mutM*, es una DNA glicosilasa que pertenece al sistema de la Guanina Oxidada (GO) y protege a la célula de efectos tóxicos de agentes oxidantes, este gen se expresa durante la fase exponencial y estacionaria de crecimiento.[8] En comparación con las células silvestres, las células de *B. subtilis* que carecen de *mutM* aumentaron su frecuencia de mutación espontánea de Rifampicina. A pesar de la

participación probada de *mutM* en la prevención de daños en el ADN inducido por agentes promotores de estrés oxidativo ó ROS, la transcripción de este gen no está bajo el control de los regulones RecA, PerR, o σ^B [8].

El sistema MMR (*mutSL*) de *B. subtilis* reconoce y corrige los malos apareamientos causados por la DNA polimerasa, contribuyendo a la fidelidad de la replicación en células en crecimiento. Estudios recientes han sugerido que la mutación adaptativa es favorecida por la saturación de este sistema, cuya contribución principal está dada por la proteína *mutS* [4].

En el genoma de *B. subtilis* existe el gen *mutSB* (*yhsD*), un ortólogo de *mutS* cuyo producto pertenece a la familia de proteínas *mutS2* [5], la función de *mutSB* no está relacionada con la ruta de reparación MMR. *mutSB* se expresa en todo el ciclo de vida de *B. subtilis* pero sus niveles son máximos en la fase estacionaria, muy probablemente *mutSB* no pertenece a los regulones de estrés SOS, PerR, σ^B de *B. subtilis* [9].

Se encontró que, durante el crecimiento, la carencia de *mutSB* no genera un fenotipo mutador en *B. subtilis* y que su interrupción tampoco afectó la mutagénesis de una cepa carente del sistema MMR en este microorganismo. Sin embargo, en ausencia de un sistema MMR funcional *mutSB* juega un papel relevante en prevenir las mutaciones que se generan en células de *B. subtilis* carentes de división celular [6]. Recientemente, se observó un incremento en la producción de *mutSB* durante la fase estacionaria de una mutante deficiente en el sistema GO.

Con el propósito de elucidar la función del gen *mutSB* y su conexión con el gen *mutM*

perteneciente al sistema GO, se generó una doble mutante nula de estos genes para así poder corroborar su relación en la mutagénesis durante el crecimiento en este microorganismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este estudio, se muestran en la **Tabla 1**. El crecimiento de las cepas de *B. subtilis* y *E. coli* se realizó en Medio Luria Bertani. Para propagar y mantener en estado vegetativo a *B. subtilis* se utilizó medio A3 (Antibiotic médium 3, Difco). En la preparación de las células competentes de *B. subtilis* se utilizó medio GMI y Medio GMII [7]. Cuando se requirió se adicionó a los cultivos los siguientes antibióticos, Ampicilina (Amp) 100 µg/mL, Rifampicina (Rf) 10 µg/mL, Tetraciclina (Tc) 3 µg/mL, Eritromicina (Eri) 5 µg/mL.

Tabla1. Cepas y plásmidos utilizados

Cepa	Genotipo ó fenotipo	Fuente y/o referencia
<i>B. subtilis</i>		
PERM571	$\Delta mutM::Tc Tc^r$	8
PERM1516	$\Delta mutSB::Eri^r \Delta mutM::Tc Eri^r Tc^r$	Este estudio
Plásmidos		
pPERM 1217	pMutin 4 conteniendo un fragmento del extremo 5' del gen <i>mutSB</i> . Amp ^r Eri ^r . Utilizado para interrumpir el gen <i>mutSB</i> de la cepa ($\Delta mutM$).	6

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados.

Oligonucleótido	Secuencia 5' - 3'	Descripción
496	CGGAATTCGACATC GAGCTTGGCCGC	Oligonucleótido directo ubicado 961 pb río abajo, del primer codón del marco de lectura abierto de <i>mutSB</i> .
183	GCAGCAACGAGAC GTCAC	Oligonucleótido reverso ubicado a 633 pb del inicio del marco de lectura abierto de <i>lacZ</i> .

Preparación, y transformación de células competentes y construcción de la cepa mutante $\Delta mutM mutSB$.

La preparación y transformación de células competentes de *B. subtilis* se realizó de acuerdo a un protocolo previamente descrito [7]. Para la construcción de la cepa mutante se utilizó el plásmido pPERM1217 [6] para transformar células competentes de *B. subtilis* PERM571 [8] (**Tabla 1**). Las transformantes se seleccionaron por resistencia a Eri y se caracterizaron molecularmente mediante PCR amplificando un fragmento de 1060 pb de la región *mutSB-lacZ*, utilizando el par de oligonucleótidos descritos en la (**Tabla 2**). La cepa obtenida se denominó *B. subtilis* PERM1516.

Análisis de la frecuencia de mutación mediante el fenotipo de resistencia a Rifampicina en la cepa *mutM mutSB*.

Se rescató la cepa $\Delta mutM mutSB$ para sembrarla en placas suplementadas con Tc y Eri. Las cepas fueron cultivadas durante 12 horas en 10 mL de medio A3 suplementada con los antibióticos correspondientes. El cultivo se centrifugó a 4800 rpm, durante 10 min., la pastilla celular se lavó una vez con SS1X y se resuspendió en 1 mL de estas mismas sales. A continuación se plaquearon

alícuotas de 100µL en seis placas de LB suplementadas con Rifampicina (10µg/mL). Las placas se incubaron a 37°C. y las colonias resistentes a Rifampicina se contaron después de 24 horas. La cantidad de células en el cultivo bacteriano se determinó mediante dilución seriada y cuenta viable en placas de LB.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención y caracterización de una cepa de *B. subtilis* con mutaciones nulas en los genes *mutM* y *mutSB*

Como un requisito necesario para comenzar a investigar si los eventos de reparación dependientes de *mutSB* y *mutM* se encuentran conectados durante la generación de mutaciones asociadas a la fase de crecimiento de *B. subtilis* era necesario contar con una cepa carente de ambas funciones. Para construir esta mutante, se utilizó el plásmido pPERM1217 (**Tabla1**) para transformar la cepa *B.subtilis* PERM571, carente de *mutM*, e interrumpir mediante un evento de recombinación homóloga sencillo al gen *mutSB*. La integración correcta de pPERM1217 al locus *mutSB* de la cepa *B.subtilis* PERM571 se verificó mediante la amplificación por PCR de un fragmento *mutSB-lacZ* utilizando como templado DNA genómico de la cepa transformante. El producto de amplificación de 1.06 Kpb esperado en el fondo genético *mutM mutSB* (**Fig.1**) corrobora la obtención de la mutante deseada, la cual se denominó *B. subtilis* PERM1516 (**Tabla 1**)

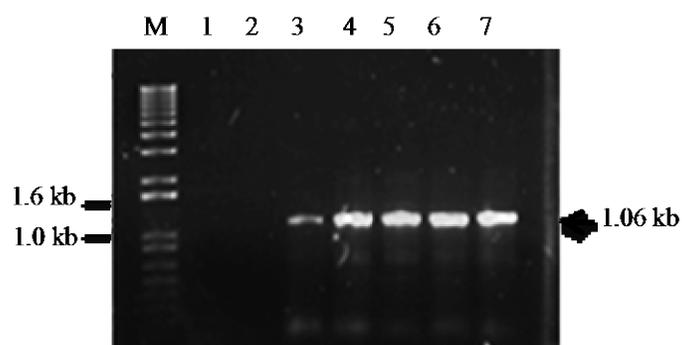


Figura 1. Corroboración por PCR de la integración de la construcción pPERM1217 en el locus *mutSB* del cromosoma de *B.subtilis* PERM571 (Δ *mutM*). Los productos de amplificación se separaron en un gel de agarosa de 1% (p/v) teñido con bromuro de etidio al 0.1% (p/v). M. marcadores de tamaño de DNA de 1 kb. Carril 4-7, distintas transformantes conteniendo la banda de PCR que corrobora la interrupción de *mutSB* en la cepa *B. subtilis* Δ *mutM*.

Frecuencia de mutación mediante el fenotipo de Resistencia a Rifampicina

Para verificar si la ausencia de la doble mutante *mutM-mutSB* en *B.subtilis* generaba un fenotipo mutador, se determinó su frecuencia de mutación espontánea, de colonias resistentes rifampicina (Rif^r). Nuestros resultados preliminares indicaron que la falta del gen *mutSB* no produjo un aumento significativo en la frecuencia de mutación espontánea comparada con la cepa parental. Por otra parte, la cepa carente de *mutM* (PERM571), incrementó alrededor de 8 veces su frecuencia de mutación espontánea con respecto a la cepa parental. Notablemente, la frecuencia de mutación de la cepa *mutM-mutSB* (PERM1516) fue superior a la suma de los valores encontrados para las mutantes sencillas. En conjunto, estos resultados sugieren que MutSB y MutM operan, mediante rutas independientes, sobre lesiones espontáneas generadas durante el crecimiento de *B. subtilis*

CONCLUSIONES

Se generó y caracterizó molecularmente una cepa de *Bacillus subtilis* con fondo genético *mutM-mutSB*.

Resultados preliminares sugieren que MutSB y MutM reparan lesiones genéticas espontáneas mediante mecanismos independientes.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por CONACYT (Grants 205744 and 221231) y la Universidad de Guanajuato (Grants 602-2015, 936-2016 and 1090-2016). M.M.V. agradece la beca otorgada por la DAIP para la realización de su estancia de investigación.

REFERENCIAS

- [1] Pedraza-Reyes, M., Ramírez-Ramírez, N., Vidales-Rodríguez, L.E., Robleto, E.A. (2012) Mechanisms of bacterial spores survival. *In* Bacterial Spores: Current Research and Applications. pp. 73-84. Abel- Santos, E. (ed). Norfolk UK: Caizer Academic Press, pp. 73-84.
- [2] Yasbin, RE., Pedraza-Reyes, M. (2004). Stationary phase-induced mutagenesis alive and well within the neo-Darwinian theory. pp. 181-191. *In* Microbial Evolution: Gene establishment, Survival, and Exchange. Ed. R. Miller. ASM Press, Washington, D.C.
- [3] Robleto EA, Yasbin R, Ross C, Pedraza-Reyes M. (2007). Stationary Phase Mutagenesis in *B. subtilis*: A Paradigm to Study Genetic Diversity Programs in Cells Under Stress. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*. 42: 327-339.
- [4] Pedraza-Reyes, M. & R.E. Yasbin, (2004) Contribution of the mismatch DNA repair system to the generation of stationary-phase-induced mutants of *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*.186:6485-6491.
- [5] Rosolillo, P., Albertini, A.M. (2001). Functional analysis of the *Bacillus subtilis yhsD* gene, a *mutS* paralogue. *Mol Gen Genet*. 264: 809-818.
- [6] Rodríguez, L.A. (2014) Papel del gen *mutSB* en el proceso de mutación adaptativa de *Bacillus subtilis*. Tesis de licenciatura. Universidad de Guanajuato.
- [7] Boylan, R.J., Mendelson, N.H., Brooks, D., & Young, F.E. (1972) Regulation of the bacterial cell wall: analysis of a mutant of *Bacillus subtilis* defective in biosynthesis of teichoic acid. *J Bacteriol* 110: 281-290.
- [8] Gómez-Marroquin M., Vidales L.E., Debora B.N., Santos-Escobar, F., Obregón-Herrera, A., Robleto, E.A., Pedraza-Reyes, M. (2015) Role of *Bacillus subtilis* DNA Glycosylase *mutM* in Counteracting Oxidatively Induced DNA Damage and in Stationary-Phase-Associated Mutagenesis. *J*

Bacteriol.11:1963-71.

[9]. Aniceto Hernandez, Y.J., Pedraza Reyes Mario (2015), Reparación de DNA con tendencia al error: Efecto en supervivencia y evolución microbiana, Jóvenes en la Ciencia, pp. 582-583.