

OBTENCIÓN DE UNA CONSTRUCCIÓN GÉNICA PARA INTERRUMPIR EL GEN *NUSG* DE *Bacillus subtilis*

Flores Álvarez Guillermo de Jesús (1), Leyva Sánchez Hilda (2), Obregón Herrera Armando (2), Pedraza Reyes Mario (2)

1 [Licenciatura en Biología Experimental, Universidad de Guanajuato] | [gdj.flores.alvarez@gmail.com]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [pedrama@ugto.mx]

Resumen

La expresión de genes es un proceso altamente regulado a lo largo de la vida de todas las células. Evolutivamente hablando, las bacterias han sofisticado sus sistemas de regulación génica a nivel transcripcional para equilibrar los costos y beneficios que éste conlleva. Se ha reportado en *Bacillus subtilis* la presencia de siete factores de transcripción que le permiten regular y maximizar este proceso. Los análisis estructurales de NusG en bacterias revelaron que su estructura está conformada por los dominios N-terminal (NTD) y C-terminal (CTD), los cuales están conservados en distintos organismos y han sido relacionados con su función dentro de las etapas de elongación y terminación extrínseca de la transcripción. Para investigar un posible papel de NusG en modular eventos de mutagénesis asociados a la transcripción en este estudio se utilizó la tecnología del DNA recombinante para generar una construcción que permitirá obtener células de *B. subtilis* interrumpidas en el gen *nusG*.

Abstract

Gene expression is a key process that is highly regulated during the life span of all organisms. To balance the costs and benefits of this cellular process, bacteria have evolved sophisticated systems of gene regulation. *Bacillus subtilis* possesses seven transcription factors to fine tuning transcription in demand of distinct metabolic conditions. Structural and functional analysis has revealed that the transcriptional factor NusG's are composed by highly conserved N-terminal (NTD) and C-terminal (CTD) domains. Such domains have been associated with elongation and extrinsic termination of transcription, respectively. To understand the role of NusG in modulating transcription-associated mutagenesis (TAM), we employed here recombinant DNA technology to generate a construct to disrupt *nusG* in *B. subtilis*.

“PALABRAS CLAVE”

Bacillus subtilis; RNA polimerasa; *nusG*.

INTRODUCCIÓN

La síntesis de RNA es el primer paso en la expresión génica. En todas las formas vivientes la RNA polimerasa se encarga de realizar este proceso, el cuál se encuentra sujeto a regulación por distintos factores de transcripción [1] [2].

En *Bacillus subtilis* se han descrito 7 diferentes factores de transcripción, denominados, NusA, NusB, NusE, NusG, Rho, GreA y Mfd. Las proteínas Nus fueron inicialmente descubiertas por su papel en la formación de complejos resistentes a la terminación durante la transcripción del fago λ . Actualmente, se conoce que son esenciales para la regulación de la transcripción de la célula huésped y son altamente conservados tanto en organismos gram-positivos como en organismos gram-negativos [3].

El gen *nusG* de *Bacillus subtilis* tiene un tamaño de 531 pb que codifica para una proteína de 177 aminoácidos y se ha identificado como un factor de elongación transcripcional que forma parte del complejo de transcripción e interactúa con el factor de terminación Rho y la RNA polimerasa [4].

La familia de proteínas NusG comprende, NusG en bacterias, Spt5 en Archaeas y eucariotas inferiores, y DSIF en mamíferos, así como parálogos de genes específicos presentes en muchas especies bacterianas [1].

Los análisis estructurales han revelado que NusG posee dos dominios, denominados, NTD (N-terminal) y CTD (C-terminal) [1]. Ambas regiones participan regulando la expresión génica, ya sea, modulando la procesividad de la transcripción, participando en la traducción del RNA o reclutando factores de terminación [5].

A diferencia de *B. subtilis*, la proteína NusG es esencial en *E. coli*. NusG es un factor general de la transcripción capaz de interactuar con el factor Rho y la RNA polimerasa, alternando tanto la eficiencia como el lugar de la terminación en esta bacteria [6, 7].

En *B. subtilis*, *nusG* forma parte del complejo de transcripción, participa mejorando la terminación independiente de Rho y posiblemente también en la elongación y anti-terminación de la transcripción [8].

Reportes adicionales en *B. subtilis* mostraron que NusG participa en el alargamiento de la transcripción y que cooperativamente con NusA estimula la pausa de la RNA polimerasa en los sitios U107 y U144 de la horquilla de terminación. Además, se encontró que este factor es necesario para la correcta regulación de la expresión del operón *trp* [4].

Con el propósito de conocer un posible rol de NusG en modulares procesos mutagénicos asociados a la transcripción, en el presente estudio se realizó una construcción para interrumpir el gen *nusG* de *B. subtilis*

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas

Las cepas bacterianas que se utilizaron en este estudio se describen en la tabla 1. El kit de clonación pJET1.2/blunt se utilizó para la clonación del producto de PCR de un fragmento interno del gen *nusG*. El plásmido integrativo pMUTIN4-cat se aisló de la cepa PERM1149.

Tabla 1: Cepas empleadas en este estudio

CEPA	FENOTIPO O GENOTIPO	REFERENCIA
PERM311	<i>B. subtilis</i> 168 <i>trpC2</i> (wild type)	Cepario PERMLab
PERM100	<i>E. coli</i> DH5 α	Cepario PERMLab
PERM1149	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo el plásmido pMUTIN4-cat al cual se le cambió el casete de resistencia de Eri ^R a Cm ^R .	Cepario PERMLab
PERM1601	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo el vector pJET1.2/blunt más un fragmento interno del gen <i>nusG</i> de ~220 pb con los sitios de corte para EcoRI y BamHI. Amp ^R .	Este estudio
PERM1605	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo el plásmido pMUTIN4-cat (~7641pb) más un fragmento interno de ~220 pb del gen <i>nusG</i> de <i>B. subtilis</i> con los sitios de restricción EcoRI y BamHI. Cm ^R .	Este estudio

Tabla 2: Plásmidos empleados en este estudio

PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pJET 1.2/blunt	Vector de clonación con el casete de resistencia a Amp ^R .	ThermoFischer Scientific
PERM1149	<i>E. coli</i> DH5α conteniendo el plásmido pMUTIN4-cat. Cm ^R .	Cepario PERMLab

Procedimientos para la transformación y aislamiento de ADN plasmídico

Para realizar la clonación y posterior construcción para la interrupción del gen *nusG* se utilizaron los vectores pJET 1.2/blunt y pMUTIN4-cat respectivamente.

Las células de *E. coli* se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) suplementado con cloranfenicol (5 µg/ml) como marcador de selección.

En células competentes de *E. coli* DH5α se llevó a cabo la clonación de un fragmento de una región interna del gen *nusG* de ~220 pb, utilizando el kit pJET 1.2/blunt de ThermoFischer Scientific. Las colonias transformantes fueron seleccionadas por su resistencia a ampicilina, de las cuales se hizo extracción de DNA plasmídico mediante el método de lisis alcalina [9]. La corroboración de la construcción fue realizada mediante análisis de restricción utilizando las enzimas EcoRI y BamHI. Posteriormente, en el vector integrativo pMUTIN4-cat se llevó a cabo la clonación del fragmento de ~220 pb del gen *nusG*.

La densidad óptica (DO) de los cultivos líquidos se determinó a 590 nm; cuando se requirió, los medios utilizados fueron suplementados con cloranfenicol (5 µg/ml) o ampicilina (100 µg/ml).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

El DNA genómico aislado de la cepa silvestre *B. subtilis* 168 (PERM311) sirvió como molde para la amplificación *in vitro* de un fragmento interno del

marco de lectura abierto del gen *nusG* de ~220 pb, mediante la técnica de PCR. Para tal fin, se utilizaron los oligonucleótidos 5'-GCGAATTCGTTGTTGAATCAATGGGGATGC-3' y 5'-GCGGATCCCCTACGAATCCAGTAACGCC-3', conteniendo los sitios de corte EcoRI y BamHI respectivamente. Se utilizó un gradiente de temperatura en la etapa de alineamiento para obtener una amplificación óptima del fragmento de interés. Siguiendo esta estrategia se obtuvo una única banda de ~220 pb a una temperatura de hibridación de 67.3°C como se observa el carril 4 del gel de agarosa al 1% de la Figura 1. Este fragmento fue purificado en un gel de bajo punto de fusión.

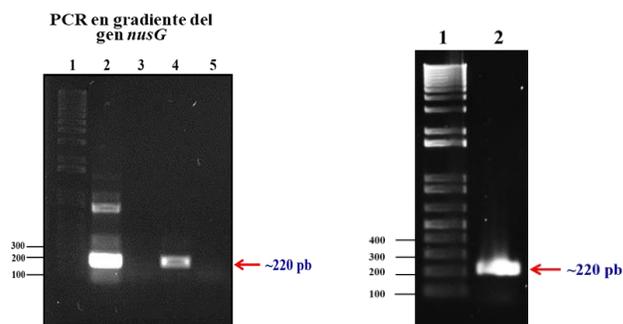


Figura 1. Análisis electroforético de los amplicones de *nusG* en geles de agarosa al 1%. Del lado izquierdo. Carril 1 Marcador de peso molecular (MPM); carriles 2 al 5, productos de PCR en gradiente utilizando las temperaturas de 60.8, 65, 67.3 y 69.6 °C respectivamente. En el carril 4 se observa una única banda sin inespecificidades. Del lado derecho se observa la amplificación de ~220 pb del fragmento interno del gen *nusG* a la temperatura óptima de 67.3°C.

Generación de una construcción para obtener una mutante nula en el gen *nusG*

El fragmento purificado de *nusG* fue ligado en el vector de mantenimiento pJET1.2/blunt. Los productos de la ligación se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* DH5α. Mediante análisis de restricción de mini-preparaciones de ADN plasmídico, con las enzimas EcoRI y BamHI, se corroboró que tres colonias contenían el fragmento de ~220 pb clonado en el vector pJET1.2/blunt (Figs. 2 y 3).

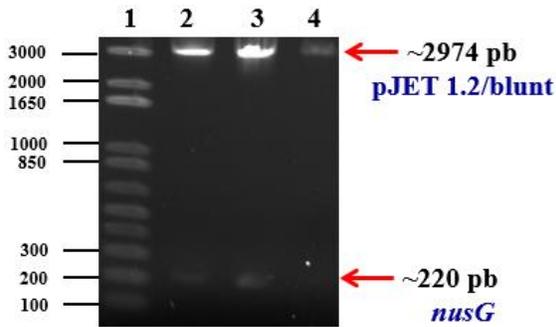


Figura 2. Análisis de restricción para corroborar la correcta liberación del gen *NusG* y el plásmido pJET1.2/blunt. Carril 1 MPM, carril 2 y 3 muestran las clonas de *E. coli* DH5α que dieron positivo para la clonación. En el carril 4 se observa una clona negativa, la cual no mostró el patrón de bandas esperado.

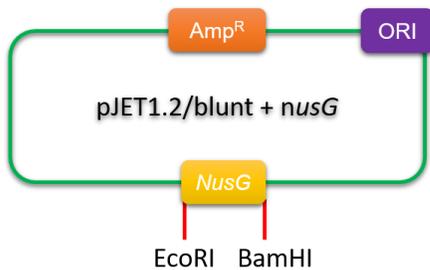


Figura 3. Mapa de construcción pJET1.2/blunt + *nusG* (PERM1601).

Para generar una construcción capaz de interrumpir el gen *nusG* en *B. subtilis* se utilizó el vector integrativo pMUTIN4-cat cortado con las enzimas EcoRI y BamHI. El fragmento de 220-pb liberado del plásmido pPERM1601 con las mismas enzimas se ligó en el vector pMUTIN4-Cat linealizado.

Los productos de la ligación se transformaron en células competentes de *E. coli* DH5α, las colonias transformantes fueron seleccionadas por su resistencia a cloranfenicol. Se procedió con la extracción de DNA plasmídico de varias colonias transformantes las cuales se sujetaron a análisis por restricción con las enzimas EcoRI y BamHI.

El patrón de bandeado mostrado en el gel de agarosa al 1% de la Figura 4 corrobora la obtención de la construcción de interés.

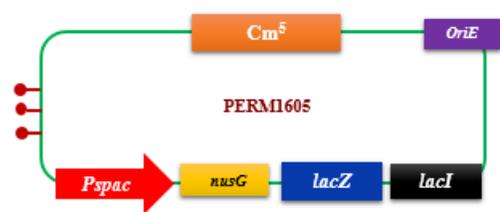
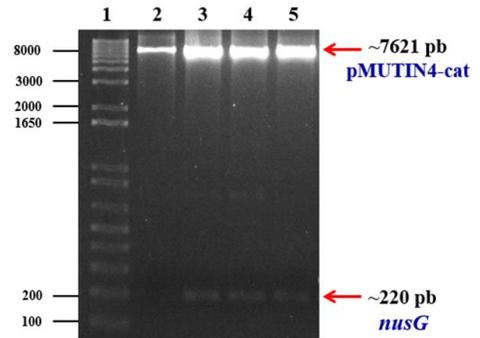


Figura 4. Análisis de restricción para corroborar la correcta integración y liberación del vector e inserto en *E. coli* DH5α (arriba). Carril 1 MPM; carril 2 vector linealizado; carril 3 al 5 clonas positivas que liberan el vector e inserto. (Abajo) mapa de integración de *nusG* al vector de expresión pMUTIN4-cat.

CONCLUSIÓN

Se diseñó mediante técnicas de ADN recombinante una construcción génica para interrumpir el gen *nusG* de *B. subtilis*.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT; Subsidios: 205744 y 221231) y de la Universidad de Guanajuato (Subsidios: DAIP-936-2016 y 1090-2016). GJ. Flores Álvarez agradece la beca otorgada por la DAIP durante la Estancia de Verano 2017.

REFERENCIAS

[1] Knauer, S. H., Rösch, P., Artsimovitch I. (2012). Transformation, the next level of regulation. *RNA Biology*, 9(12), 1418-1423.

[2] Drögemüller, J., Schneider C., Schweiner, K., Straub M., Wöhr, B. M., Rösch P., Knauer, S. H. (2016). *Thermotoga maritima nusG*: domain interaction mediates autoinhibition and thermostability. *Nucleic Acids Research*, 45(1), 446-460.

[3] Doherty, G. P., Meredith, D. M., Lewis, P. J. (2006). Subcellular partitioning of transcription factors in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 188(11), 4101-4110.

[4] Yakhnin, V. A., Babitzke, P. (2010). Mechanism of *nusG*-stimulated pausing, hairpin-dependent pause site selection and intrinsic termination at overlapping pause and termination sites in the *Bacillus subtilis trp* leader. *Molecular Microbiology*, 76(3), 690-705.

[5] Werner, F. (2012). A nexus for gene expression – Molecular mechanisms of *Spt5* and *nusG* in the three domains of life. *Journal of Molecular Biology*, 417, 13-27.

[6] Sevostyanova, A., Belogurov, G. A., Mooney, R. A., Landick, R., Artsimovitch, I. (2011). The β subunit gate loop is required for RNA polymerase modification by *RfaH* and *NusG*. *Molecular Cell*, 43(2), 253-262.

[7] Ingham, C. J., Dennis, J., Furneaux, P. A. (1999). Autogenous regulation of transcription termination factor Rho and the requirement for Nus factors in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology*, 31(2), 651-663.

[8] Ingham, C. J., Furneaux, P. A. (2000). Mutations in the β subunit of the in *Bacillus subtilis* RNA polymerase that confer both rifampicin resistance and hypersensitivity to *nusG*. *Microbiology*, 146, 3041-3049.

[9] Sambrook, J. Fritsch, E. F. & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York.