

OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE *Bacillus subtilis* DEFICIENTES EN GENES QUE SINTETIZAN DINUCLEÓTIDOS CÍCLICOS

Abundiz Yáñez, Karen (1), Leyva Sánchez, Hilda Cecilia (2), Pedraza Reyes, Mario (2)

1 [Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [k.abundizyanez@ugto.mx]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Direcciones de correo electrónico: [hilcesanchez@gmail.com; pedrama@ugto.mx]

Resumen

Los nucleótidos de señalización son una de las múltiples estrategias que los microorganismos han desarrollado para interactuar y responder a los estímulos del medio ambiente. El c-di-AMP es un dinucleótido cíclico que ha sido asociado al crecimiento celular, la supervivencia y la regulación de la virulencia en las bacterias, principalmente Gram-positivas. El genoma de *Bacillus subtilis* posee genes que codifican para tres sintetasas de c-di-AMP (DAC) que se expresan en distintas etapas del ciclo de vida de esta bacteria. Al detectar condiciones inapropiadas para su crecimiento, *B. subtilis* activa una diversidad de respuestas, incluyendo la esporulación, la respuesta general al estrés, la competencia celular y la mutagénesis asociada al estrés o a la fase estacionaria. Evidencia previa demostró una relación entre el estrés nutricional y la desregulación de las DAC y otras proteínas que interactúan con el c-di-AMP. Para investigar un posible papel del c-di-AMP y las DAC DisA y CdaA en los eventos de mutagénesis asociados a la fase estacionaria, en este estudio se utilizaron enfoques moleculares para la obtención de cepas de *Bacillus subtilis* YB955 deficientes en los genes *disA*, *cdaA* y *disA cdaA*.

Abstract

Signaling nucleotides are one of the multiple strategies that organisms have evolved to monitor its environment and respond to stimuli. c-di-AMP is a cyclic dinucleotide associated with cell growth, survival and control of virulence mainly in Gram-positive bacteria. The genome of *B. subtilis* possess three genes encoding diadenylate cyclases (DAC) expressed in distinct steps of its life cycle. Upon detecting non-appropriate conditions for growth, *B. subtilis* activates several cellular responses, including, sporulation, the general stress response, cell competence and stationary-phase- or stress-associated mutagenesis (SPM). Previous evidence revealed a relationship between SPM in nutritionally stressed bacteria and the regulation of DACs and other c-di-AMP interacting proteins. To study the role of c-di-AMP with the DACs DisA and CdaA in SPM, we employed molecular approaches to obtain three strains of *B. subtilis* YB955 deficient in *disA*, *cdaA* and both, *disA* and *cdaA*, genes.

Palabras Clave

B. subtilis YB955; Diadenilato Ciclasas; c-di-AMP

INTRODUCCIÓN

La capacidad de interactuar con su medio ambiente y responder a sus estímulos es una característica de todas las células vivas. [1]. Al detectar condiciones inapropiadas para su crecimiento, *Bacillus subtilis* activa una diversidad de respuestas como la esporulación, el regulón σ^B , la competencia celular y la mutagénesis asociada al estrés o a la fase estacionaria (SPM) [2].

Los nucleótidos de señalización son moléculas que contribuyen a la regulación de las vías celulares tanto en procariontas como en células eucariotas [3]. El AMP cíclico y el guanósil tetrafosfato (ppGpp) dos de los nucleótidos más conocidos que participan en la represión de catabolitos de carbono y en la respuesta a la limitación de nutrientes, respectivamente. Más recientemente, se observó que muchas bacterias sintetizan dinucleótidos cíclicos como el c-di-GMP y el c-di-AMP, involucrados en procesos celulares complejos [4].

El c-di-AMP ha sido asociado al crecimiento celular, la supervivencia y la regulación de la virulencia en los microorganismos [5], es producido por las Diadenilato Ciclasas (DAC), una función descrita por primera vez en la proteína DisA de *B. subtilis* [6]. DisA produce c-di-AMP en respuesta a la integridad del ADN, puede interaccionar con diversas proteínas de reparación del ADN y de recombinación y es requerida para garantizar que las esporas estén libres de daño al material genético antes de su germinación-eclosión en el regreso a la vida vegetativa [7]. Aunque el c-di-AMP se ha estudiado principalmente en bacterias Gram positivas, se han encontrado proteínas con dominios DAC similares al de DisA en bacterias Gram negativas y arqueas [3,4].

Además de DisA, el genoma de *B. subtilis* codifica para otra DAC de la fase vegetativa denominada CdaA, implicada en el metabolismo de la pared celular y la división celular, así como en el control del metabolismo central y la homeostasis del potasio [1]. CdaA es la única DAC con la que cuentan algunos patógenos como *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*. Una tercera DAC, CdaS, específica de esporulación y requerida para una germinación eficiente de la spora, ha sido descrita *B. subtilis* [1].

La mutagénesis adaptativa o de fase estacionaria (SPM) permite a los microorganismos promover la variabilidad genética, bajo condiciones de estrés nutricional, para escapar de condiciones que limitan su crecimiento, como la presencia de antibióticos en el entorno [2].

Un análisis del perfil proteómico de una cepa de *B. subtilis* carente del represor NrdR (y, por lo tanto, sobreexpresante de la Ribonucleótido Reductasa RNR [9]), sometida a estrés nutricional mostró una disminución en los niveles de DisA, así como una alteración en la cantidad de otras proteínas relacionadas con el metabolismo de c-di-AMP, incluyendo al regulador de CdaA, CdaR, el cuál incrementó 2.6 veces. Además, se observó que las fosfodiesterasas encargadas de la degradación del c-di-AMP incrementaron 4.3 veces. Un efecto similar se detectó en proteínas que interaccionan con el c-di-AMP [2].

Con el propósito de investigar una posible participación del c-di-AMP y las DAC en la modulación de los procesos mutagénicos asociados a la fase estacionaria, en el presente estudio se utilizó como fondo genético a la cepa *B. subtilis* YB955 ampliamente utilizada en estudios de SPM [8] para generar una colección de cepas mutantes en los genes *disA*, *cdaA*, y *disA cdaA*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas

Tabla 1: Cepas empleadas en este estudio

CEPA	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
YB955	<i>B. subtilis hisC952 metB5 leuC427</i>	Cepario del laboratorio M.P.R.

Plásmidos

Tabla 2: Plásmidos empleados en este estudio

PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
pJET1.2/blunt	Vector de clonación con casete de resistencia a Ampicilina	ThermoFischer Scientific

PERM 100	<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Cepario laboratorio M.P.R.	del de	pMutin4-cat	pMutin4 al cual se le cambió el casete de resistencia de Eri ^R a Cm ^R	Extraído de PERM1149
PERM 732	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo el plásmido pMutin4 más un fragmento interno del gen <i>disA</i> de <i>B. subtilis</i> .	Cepario laboratorio de M.P.R.	del	pPERM 732	pMutin4-cat más un fragmento interno del gen <i>disA</i> de <i>B. subtilis</i> .	Extraído de PERM 732
PERM 1149	<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 laboratorio de M.P.R.	del	pPERM 1663	pMutin4-cat más un fragmento interno del gen <i>cdaA</i> de <i>B. subtilis</i> .	Extraído de PERM 1663
PERM 1658	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo el vector 1.2/blunt más un fragmento interno del gen <i>cdaA</i> de <i>B. subtilis</i>		Este estudio			
PERM 1663	<i>E. coli</i> DH5 α conteniendo el plásmido pMutin4-cat más un fragmento interno del gen <i>cdaA</i> de <i>B. subtilis</i> .		Este estudio			

Replicación *in vitro* y clonación de gen *cdaA*

El ADN genómico aislado de la cepa YB955 de *B. subtilis* se usó como molde para la amplificación *in vitro* de un fragmento interno de ~319 pb del marco de lectura abierto del gen *cdaA*, mediante PCR, utilizando oligonucleótidos específicos. El producto de amplificación se clonó en el vector de mantenimiento pJET1.2/blunt y la construcción se amplificó en *E. coli* DH5 α [10].

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

Se utilizó el vector integrativo pMutin4-cat cortado con las enzimas *HindIII* y *BamHI*. El fragmento de *cdaA* de ~319 pb se ligó en el vector pMutin4-cat linearizado y los productos de la ligación se transformaron en células competentes de *E. coli* DH5 α [10]. Mediante análisis de restricción con *HindIII* y *BamHI*, de minipreps de distintas colonias transformantes resistentes a cloranfenicol, se corroboró la obtención de la construcción de interés.

Transformación de células competentes de *B. subtilis*

Para la obtención de las mutantes sencillas $\Delta disA$ y $\Delta cdaA$, se prepararon células competentes de *B. subtilis* YB955 y se adicionaron, por separado, los plásmidos pPERM732 y pPERM1663 (Tabla 1). Se seleccionaron las transformantes por resistencia a Eritromicina o Cloranfenicol, respectivamente.

Para la obtención de la doble mutante $\Delta disA cdaA$, se prepararon células competentes de la cepa *B. subtilis* $\Delta disA$, previamente obtenida y se transformaron con el plásmido pPERM1663 (Tabla 1). Se seleccionaron las transformantes por resistencia a Eritromicina y Cloranfenicol.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Obtención de una mutante nula en el gen *disA*

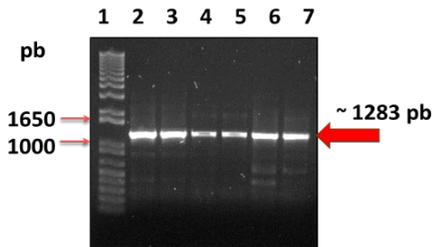


Figura 1: Análisis electroforético para la corroboración de la interrupción del gen *disA*. En el carril 1 se observa la escalera de 1 kpb, en los carriles 2-7 se observan los amplicones de la PCR en colonia realizada en transformantes del fondo genético *B. subtilis* YB955 transformadas con el plásmido pPERM732 (Tabla 2).

Como se muestra en la Figura 1, se obtuvo la correcta interrupción del gen *disA*, el análisis electroforético de los productos de la PCR en colonia de las transformantes para la obtención de la mutante nula en el gen *disA* permite observar una banda de ~1283 pb correspondiente al amplicón esperado al utilizar un oligonucleótido que hibrida con el inicio de marco de lectura del gen *disA* y el oligonucleótido reverso del gen *lacZ*.

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

Se clonó exitosamente un fragmento de ~319 pb del gen *cdaA* en el vector de mantenimiento pJET1.2/blunt, como se observa en la Figura 3A. El análisis de restricción permitió corroborar la correcta liberación del vector y del fragmento del gen *cdaA* de ~319 pb, así como de un subproducto de la reacción de restricción de 253 pb debido a que el vector pJET1.2/blunt presenta un sitio de corte para *HindIII* en esta posición. En la Figura 3B se puede observar una sola banda correspondiente a la purificación del fragmento de *cdaA* de interés.

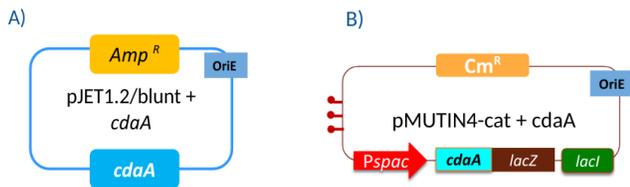


Figura 2: (A) Mapa de construcción pJET1.2/blunt + fragmento de *cdaA*. (B) Mapa de construcción pMutin4-cat + fragmento de *cdaA*.

Para generar una construcción capaz de interrumpir el gen *cdaA* en *B. subtilis* se utilizó el vector integrativo pMutin4-cat como se describe en Materiales y Métodos. El plásmido extraído de las transformantes se analizó mediante restricción, como se observa en la Figura 3C, el patrón de bandas generado corrobora la correcta ligación del fragmento de interés en el vector integrativo.

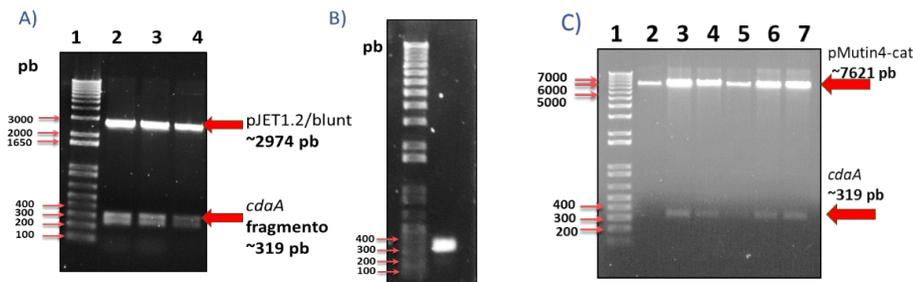


Figura 3: (A) Análisis de restricción de la amplificación y clonación de un fragmento de *cdaA* en el vector pJET1.2/blunt. En el carril 1 se observa la escalera de 1 kpb, en los carriles 2-4 se observan los productos de la restricción con *HindIII* y *BamHI*. (B) Análisis electroforético de la purificación del fragmento de *cdaA* en gel de agarosa de bajo punto de fusión. En el carril 1 se observa la escalera de 1 kpb, en el carril 2, el amplicón del fragmento purificado. (C) Análisis de restricción de un fragmento de *cdaA* en el vector de integración pMutin4-cat. En el carril 1 se observan los marcadores de ADN de 1 kpb; en el carril 2, el vector linealizado y en los carriles 3-7, los productos de la reacción de restricción con *HindIII* y *BamHI*.

Obtención de una mutante nula en el gen *cdaA*

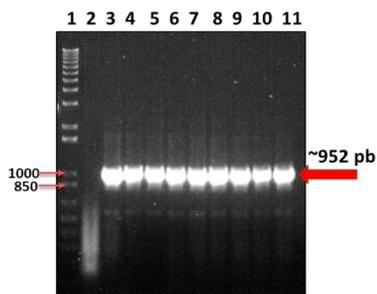


Figura 4: Análisis electroforético para la corroboración de la interrupción del gen *cdaA*. En el primer carril se observa la escalera de 1 kpb, en los carriles 2-11 se observan los amplicones de la PCR con ADN genómico aislado de las transformantes del fondo genético *B. subtilis* YB955 con la construcción generada para la interrupción del gen *cdaA*.

Se consiguió la correcta interrupción del gen *cdaA* en *B. subtilis* YB955 con la construcción pMutin4-*cdaA*. Como lo demuestra la Figura 4, el análisis electroforético de los productos de la PCR con el ADN genómico de las transformantes generó una banda de ~952 pb correspondiente al amplicón esperado al utilizar oligonucleótidos específicos que hibridan con una región interna del marco de lectura del gen *cdaA* y con el gen *lacZ* del vector integrado.

Obtención de una doble mutante nula en los genes *disA* y *cdaA*

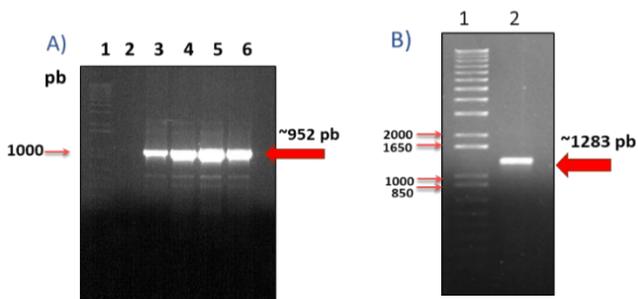


Figura 5: (A) Análisis electroforético para la corroboración de la interrupción del gen *cdaA* en la doble mutante. En el primer carril se observan los marcadores de ADN de 1 kpb, en el carril 2, el producto de la PCR para el control negativo (YB955), en el carril 3, el amplicón para el control positivo (pADN $\Delta cdaA$ en pMutin4-cat) y en los carriles 4-6, los amplicones de la PCR con ADN genómico aislado de las transformantes *cdaA* en el fondo genético *B. subtilis* $\Delta disA$. **(B) Análisis electroforético para la corroboración de la interrupción del gen *disA* en la doble mutante.** En el primer carril se observa la escalera de 1 kpb, en el carril 2, el amplicón de PCR.

Se obtuvo una doble mutante carente de los genes *disA* y *cdaA*. En la Figura 5A se observa una banda de ~952 pb que corrobora la correcta interrupción de *cdaA* con la construcción pMutin4-*cdaA* en las transformantes con fondo genético $\Delta disA$. Para verificar que el gen *disA* se mantuviera interrumpido, se realizó una corroboración por PCR con oligonucleótidos específicos obteniéndose el amplicón esperado de ~1283 pb.

CONCLUSIONES

Se generó una construcción génica para la interrupción del gen *cdaA* de *B. subtilis*. La construcción se utilizó para obtener las mutantes nulas *B. subtilis* $\Delta disA$, $\Delta cdaA$ y $\Delta disA cdaA$.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por CONACYT (Subsidios 205744 and 221231) y la UG (Subsidio: CIIC 188/2018) otorgados a M.P.R. K.A.Y. agradece la beca otorgada por la DAIP para la realización de la estancia de investigación.

REFERENCIAS

- [1] Gundlach, J., Dickmanns, A., Schröder-Tittmann, K., Neumann, P., Kaesler, J., Kampf, J., Herzberg, C., Schwede, F., Kaefer, V., Tittmann, K., Stülke, J. & Ficner, R. (2015). Identification, Characterization, and Structure Analysis of the Cyclic di-AMP-binding PII-like Signal Transduction Protein DarA. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(5), pp. 3069-3080. doi: 10.1074/jbc.M114.619619
- [2] Castro-Cerritos, K. V., López-Torrez, A., Obregón-Herrera, A., Wrobel, K., Wrobel, K. & Pedraza-Reyes, M. (2017). LC-MS/MS proteomic analysis of starved *Bacillus subtilis* cells overexpressing ribonucleotide reductase (*nrdEF*): implications in stress-associated mutagenesis. *Current Genetics*, 64(1), pp.215-222. doi: 10.1007/s00294-017-0722-7

- [3] Corrigan, R. M. & Gründling, A. (2013). Cyclic-di-AMP: another second messenger enters the fray. *Nature reviews. Microbiology*, 11(8), pp. 513-524. doi: 10.1038/nrmicro3069
- [4] Mehne, F. M. P., Gunka, K., Eilers, H., Herzberg, C., Kaefer, V. & Stülke, J. (2012). Cyclic Di-AMP Homeostasis in *Bacillus subtilis*: Both lack and high-level accumulation of the nucleotide are detrimental for cell growth. *The Journal of Biological Chemistry*, 288(3), pp. 2004-2017. doi: 10.1074/jbc.M112.395491
- [5] Fahmi, T., Port, G. C. & Cho, K. H. (2017). c-di-AMP: An Essential Molecule in the Signaling Pathways that Regulate the Viability and Virulence of Gram-Positive Bacteria. *Genes*, 8(8), pp. E197. doi: 10.3390/genes8080197
- [6] Witte, G., Hartung, S., Büttner, K. & Hopfner, K.P. (2008). Structural biochemistry of a bacterial checkpoint protein reveals diadenylate cyclase activity regulated by DNA recombination intermediates. *Molecular cell*, 30(2), pp. 167-178. doi: 10.1016/j.molcel.2008.02.020
- [7] Campos, S. S., Ibarra-Rodríguez, J. R., Barajas-Ornelas, R. C., Ramírez-Guardiana, F. H., Obregón-Herrera, A., Setlow, P. & Pedraza-Reyes, M. (2014). Interaction of Apurinic/Apyrimidinic 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), pp. 568. doi: 10.1128/JB.01259-13
- [8] Sung, H. M. & Yasbin, R. E. (2002). Adaptive, or Stationary-Phase, Mutagenesis, a Component of Bacterial Differentiation in *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology*, 184(20), pp. 5641-5653. doi: 10.1128/JB.184.20.5641-5653.2002
- [9] Castro-Cerritos, K. V., Yasbin, R. E., Robleto, E. A. & Pedraza-Reyes, M. (2017). Role of Ribonucleotide Reductase in *Bacillus subtilis* Stress-Associated Mutagenesis. *Journal of Bacteriology*, 199(4), pii. e00715-16. doi: 10.1128/JB.00715-16
- [10] Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. (3rd ed). New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.