

# GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE CEPAS DE *Bacillus subtilis* CON GENOTIPO *mutTA/mutM*, *mutY/mutM* y *mutTA/mutY*

Moreno Ciénega Luis Gerardo (1), Ramírez Ramírez Norma (2), Pedraza Reyes Mario (3)

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

## Resumen

Los organismos se encuentran en constante exposición a factores intra- y extracelulares potencialmente capaces de modificar la estructura del ADN provocando mutaciones y/o muerte celular. Para contrarrestar los efectos adversos del estrés oxidativo, el cuál impacta el ADN generando la base análoga 8-OxoG, *Bacillus subtilis* cuenta con el sistema de reparación de la Guanina oxidada (GO) constituido por MutY (YfhQ), MutM y MutTA (YtkD). Las frecuencias de mutación espontánea debidas a la interrupción individual y colectiva de los tres genes que codifican a este sistema han sido previamente descritas en nuestro laboratorio. A la fecha se desconoce la contribución en pares de dichos genes; para abordar este punto, en el presente estudio se construyó una colección de cepas de *B. subtilis* con los siguientes genotipos:  $\Delta mutY-ytkD$ ,  $\Delta mutM-ytkD$ , y  $\Delta mutM-mutY$ . Para caracterizar las mutantes dobles se realizaron ensayos de mutación espontánea de resistencia a rifampicina (Rif); los resultados obtenidos se contrastaron con respecto a la cepa parental silvestre (WT).

## Abstract

All organisms are constantly exposed to intra- and extracellular factors that can potentially modify the structure of the nucleic acids promoting mutagenesis and/or cell death. To counteract the adverse effects of oxidative stress, which after attack of DNA generates the base analog 8-OxoG, *B. subtilis* relies on the GO system composed by MutY (YfhQ), MutM and MutTA (YtkD). The spontaneous mutation frequencies of strains carrying single or triple disruptions on the genes encoding the GO system have previously been reported. However, the contribution of double disruptions in these genes is currently unknown; to address this aspect, in the present study a collection of null mutants with the following genotypes were constructed:  $\Delta mutY-ytkD$ ,  $\Delta mutM-ytkD$ , y  $\Delta mutM-mutY$ . The spontaneous mutation frequencies to rifampicin resistance were determined for the strains obtained and contrasted with those obtained for the wild type parental strain.

## Palabras Clave

*B. subtilis*, Sistema GO, Mutagénesis.

## INTRODUCCIÓN

El ácido desoxirribonucleico (ADN) es la molécula que almacena la información genética de todos los organismos. Estos últimos están expuestos a una gran variedad de agentes genotóxicos como las especies reactivas de oxígeno (ERO), luz ultravioleta, radiaciones ionizantes y diversos compuestos químicos. Estos agentes son capaces de alterar la estructura química del ADN y sus precursores provocando mutaciones [1]. Muchas de estas mutaciones pueden ser letales, otras resultan favorables para la célula, así brindándole ventajas de supervivencia ante una condición de presión de selectiva y así permitiéndole adaptarse ante aquella condición [2,3]. Para el entendimiento de estos fenómenos, se ha utilizado a las bacterias como modelo de estudio, incluyendo al microorganismo del suelo *Bacillus subtilis* [3]. Notablemente, se ha demostrado que la tasa de mutación en este organismo está influenciada por la respuesta al estrés fisiológico [2,3].

### Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO)

El estrés celular se define como cualquier perturbación en el ambiente (inanición de fuentes de carbono, sobrepoblación y acumulación de radicales y toxinas) con consecuencias metabólicas negativas en el crecimiento de un organismo. Dicho estrés puede fomentar la mutagénesis, propiciar variabilidad genética y beneficiar al organismo mediante la selección de alteraciones genéticas que le permiten escapar de las condiciones que limitan su crecimiento [4].

Todos los organismos aeróbicos enfrentan el estrés producido por radicales de oxígeno. Dicho estrés puede ser propiciado en las células por distintos factores, i) aumento en la producción de precursores de radicales libres, ii) incremento en las especies reactivas del oxígeno [5], iii) disminución de la capacidad antioxidante o, iv) de una combinación de todos ellos [6].

El radical superóxido ( $O_2^-$ ) generado a nivel de la cadena de transporte de electrones, mediante dismutación espontánea o por acción de la superóxido dismutasa (SOD) genera  $H_2O_2$  o radicales perhidroxilo [7]. Además del  $H_2O_2$  otros agentes oxidantes como el *tert*-Butil Hidroperóxido (*t*-BPH), el paraquat (PQ), etc., propician la producción intracelular de ROS [8, 9].

La guanina es la base nucleotídica más susceptible a la oxidación por las ERO, el dGTP y GTP de las pozas de nucleótidos al oxidarse producen 8-OxodGTP y 8-OxoGTP, respectivamente. La forma oxidada 8-OxodGTP puede ser incorporada en las cadenas de ADN naciente opuesto a la adenina, lo que conduce a mutaciones por transversión de bases, mediante el cambio de un par de A:T por G:C. Por otro lado, se ha propuesto que el 8-Oxo-GTP tiene la capacidad de incorporarse en el RNA mensajero generando errores en la transcripción, lo que ocasiona la síntesis de proteínas alteradas [10].

La oxidación directa de las bases nucleotídicas o la incorporación de 8-OxodGTP al ADN puede generar sitiosapurínicos/apirimidínicos (AP) y roturas de cadena simple o de cadena doble en el ADN que son potencialmente mutagénicos y tóxicos para la célula [2,3].

### Sistema de la Guanina Oxidada (GO)

Para contrarrestar estos daños, algunos microorganismos cuentan con un sistema de prevención y reparación denominado sistema de la guanina oxidada (GO). Aunque este sistema ha sido bien caracterizado en *E. coli* [11,12], existen evidencias de su existencia en organismos procarióticos como *Pseudomonas aeruginosa* y *Salmonella typhimurium*, así como también en eucariotes superiores como ratones y humanos [13]. En *E. coli*, el sistema GO se encarga de evitar los efectos mutagénicos de la forma oxidada de la guanina, es decir, 8-oxodG, también conocida como lesión GO y el sistema se encarga de hidrolizar el 8-oxo-dGTP de la poza de nucleótidos y las restantes remueven del ADN el mal apareamiento 8-oxoG:A [11,12].

## Antecedentes

En *B. subtilis* los efectos mutagénicos de la 8-oxo-G son contrarrestados por el sistema GO que utiliza la reparación por escisión de bases recurriendo a las ADN glicosilasas MutM y MutY. Estas enzimas liberan la 8-oxo-G de los pares 8-oxo-G:C y la adenina de los malos apareamientos 8-oxo-G:A, respectivamente [11].

Además, las proteínas MutT y MutTA (YtkD), protegen a las células vegetativas de *B. subtilis* de los efectos nocivos del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y *t*-BHP [14]. La inactivación genética de la proteína MutM indujo un incremento significativo en la susceptibilidad de células de *B. subtilis* al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y al PQ, un compuesto que genera estrés oxidativo mediante la producción de radicales superóxido [15].

Se ha descrito que la inactivación genética de *mutM*, *mutY* y *ytkD* está asociada con un fenotipo hipermutagénico [16], y es altamente resistente al peróxido de hidrógeno, en referencia a la cepa parental silvestre [17]. Interesantemente, la cepa  $\Delta$ GO produce niveles anómalamente elevados de ROS y acumula una mayor cantidad de bases oxidadas 8-oxo-G [18]. En 2017, Gómez Romo, demostró que la cepa  $\Delta$ GO sobreexpresa catalasas, las cuales están relacionadas con la hiperresistencia a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [17].

Para conocer la contribución de las proteínas del sistema GO a este fenotipo, en el presente proyecto se utilizan enfoques moleculares y fisiológicos para construir cepas con mutaciones dobles en los genes que componen dicho mecanismo de prevención/reparación; además, se caracterizaron fenotípicamente mediante la determinación de la frecuencia de mutagénesis de colonias resistentes a rifampicina (Rif).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento

Las cepas bacterianas de *B. subtilis* utilizadas en este estudio, se muestran en la Tabla 1. El crecimiento de estas cepas 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 (sales spizizen 10X, glucosa 50%, extracto de levadura 10%, casaminoácidos 5% y aforado con agua HPLC) y medio GMII (medio GMI, añadiéndole CaCl<sub>2</sub> 0.5M y MgCl<sub>2</sub> 0.1M) [19]. Cuando fue necesario se adicionó a los medios de cultivo los siguientes antibióticos, Neomicina (Neo) 5 µg/mL, Rifampicina (Rif) 10 µg/mL, Tetraciclina (Tc) 10 µg/mL, Espectinomina (Sp) 100 µg/mL.

Tabla 1. Cepas utilizadas de *B. subtilis*.

Cepa	Genotipo ó fenotipo	Fuente y/o referencia
PERM311	WT168 Trp	PERM-Lab
PERM498	$\Delta$ ytkd::Neo, Neo <sup>r</sup>	PERM-Lab
PERM1303	$\Delta$ mutY::Sp, Sp <sup>r</sup>	PERM-Lab
PERM1304	$\Delta$ mutM::Tc, Tc <sup>r</sup>	PERM-Lab
PERM602	$\Delta$ mutY::Sp $\Delta$ mutM::Tc, Sp <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	PERM-Lab
PERM1697	WT168 $\Delta$ mutY::Sp $\Delta$ ytkd::Neo, Sp <sup>r</sup> Neo <sup>r</sup>	Este estudio
PERM1698	WT168 $\Delta$ mutM::Tc $\Delta$ ytkd::Neo, Tc <sup>r</sup> Neo <sup>r</sup>	Este estudio
	WT168 $\Delta$ mutM::Tc $\Delta$ mutY::Sp, Tc <sup>r</sup> Sp <sup>r</sup>	Este estudio

### Preparación, transformación de células competentes y obtención de las cepas mutantes $\Delta$ mutM- $\Delta$ ytkD, $\Delta$ mutM- $\Delta$ ytkD, $\Delta$ mutY- $\Delta$ mutM

La preparación y transformación de células competentes de *B. subtilis* se realizó de acuerdo a un protocolo previamente descrito [19]. Para la obtención de las cepas mutantes  $\Delta$ mutY- $\Delta$ ytkD y  $\Delta$ mutM- $\Delta$ ytkD se utilizó el ADN genómico de PERM498 ( $\Delta$ ytkD) para transformar células competentes de *B. subtilis* PERM1303 ( $\Delta$ mutY) y PERM1304 ( $\Delta$ mutM), véase la **Tabla 1**. Las transformantes se seleccionaron por resistencia a Sp y Neo y Tc y Neo, respectivamente. Las cepas obtenidas se denominaron *B. subtilis* PERM1697 y PERM1698.

Mientras que para la obtención de la cepa mutante  $\Delta mutM-\Delta mutY$ , se utilizó el ADN genómico de la cepa PERM602 ( $\Delta mutM-\Delta mutY$ ) para transformar células competentes de *B. subtilis* PERM311 correspondiente a la cepa silvestre (WT) 168 (**Tabla 1**). Las transformantes se seleccionaron por resistencia a Tc y Sp.

### Determinación de frecuencias de mutación de colonias resistentes a Rifampicina (Rifr)

Se seleccionaron colonias transformantes de las cepas mutantes  $\Delta mutM-\Delta ytkD$ ,  $\Delta mutY-\Delta ytkd$ ,  $\Delta mutM-\Delta mutY$  para sembrarlas en placas suplementadas con Tc y Neo, Sp y Neo y Tc y Sp, respectivamente (**Tabla 1**). En la realización de los ensayos de mutación espontánea, por la mañana se seleccionaron colonias para inocularlas en tubos de ensayo con medio LB líquido suplementado con los antibióticos correspondientes, y se incubaron en agitación a 250 rpm a 37°C durante 10 horas. Después de este tiempo, se tomaron 100  $\mu$ L de cada preinoculo y se adicionaron en matraces que contenían 10 mL de medio A3, se incubó en agitación por la noche durante 13 horas. El cultivo se centrifugó a 4800 rpm a 25°C, durante 10 min., la pastilla celular se lavó dos veces con 10 mL de buffer fosfato salino (PBS) y se centrifugó después de cada lavado, utilizando las condiciones anteriormente mencionadas. La pastilla celular se resuspendió en un volumen final de 1 mL de PBS. A continuación se plaquearon alícuotas de 100  $\mu$ L en seis placas con medio LB suplementado con Rif (10  $\mu$ g/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 cuenta viable, que consistió en diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$  en placas con medio LB; estas placas también se incubaron a 37°C.

Los valores de frecuencia de mutagénesis (Rif<sup>r</sup>) de las tres cepas obtenidas en este estudio ( $\Delta mutY-ytkD$ ,  $\Delta mutM-ytkd$ ,  $\Delta mutM-mutY$ ), se compararon con el valor obtenido para la cepa silvestre (WT).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2, se reportan los valores obtenidos de los ensayos de mutación espontánea (Rifr) de las cepas WT y las dobles mutantes generadas en este estudio.

Los resultados mostraron un incremento significativo en la mutagénesis espontánea de las cepas, conteniendo dobles mutaciones en los genes del sistema GO, con respecto al valor mostrado por la cepa WT.

Estudios previos mostraron un valor de frecuencia de mutagénesis Rif<sup>r</sup>, en una cepa deficiente en el sistema GO, alrededor de 1000 veces superior al mostrado por la cepa silvestre [17]. Ninguna de las dobles mutantes obtenidas en este trabajo mostró valores tan elevados como los descritos para la cepa  $\square GO$ . En conjunto estos resultados corroboran que la inactivación simultánea de los genes *mutM*, *mutY* y *ytkD* es necesaria para obtener un fenotipo hipermutador en *B. subtilis*.

**Tabla 2. Frecuencia de mutación Rif<sup>r</sup> de cepas de *B. subtilis* con distintos genotipos.**

Cepa	Frecuencia de colonias Rif <sup>r</sup> ( $10^{-9}$ )
WT168	0.692
$\Delta mutY \Delta mutM$	30
$\Delta mutY \Delta ytkD$	73
$\Delta mutM \Delta ytkD$	19

## CONCLUSIONES

Se obtuvieron cepas con mutaciones nulas en los genes, *mutY-mutM*, *mutM-ytkD*, *mutY-ytkD*. Las tres cepas mostraron frecuencias de mutagénesis espontánea superiores a la cepa parental silvestre.

## AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por CONACYT (Grants 205744 and 221231) y la Universidad de Guanajuato (Subsidio CIIC 188/2018) otorgados a MPR. L.G.M.C. 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] Torres-Barceló C, Cabot G, Oliver A, Buckling A, & MacLean RC. (2013). A trade-off between oxidative stress resistance and ADN repair plays a role in the evolution of elevated mutation rates in bacteria. *Proc. R. Soc.* 280: 20130007.
- [5] Cabisco E, Tamarti J, Ros J. (2000). Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *Internal Microbiol.* 3; 3-8.
- [6] Lushchak V. (2001). Oxidative stress and mechanism of protection against it in Bacteria. *Biochemistry (Moscow)*. 66: 476-489.
- [7] Hopkins, R. Z. (2016). Superoxide in biology and medicine: an overview. *Reactive Oxygen Species*, 1(2). 99-109.
- [8] Repetto M, Boveris A & Semprine J. (2012). Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. *INTECH Open*. Cap 1.
- [9] Dwyer DJ, Belenky PA, Yang JH, MacDonald IC, Martell J, Takashi N y col. (2015). Antibiotics induce redox-related physiological alterations as part of their lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 111: 7174-71778.
- [10] Taddei, F., H. Hayakawa, M. Bouton, A. Cirinesi, I. Matic, M. Sekiguchi & M. Radman, (1997). Counteraction by MutT protein of transcriptional errors caused by oxidative damage. *Science* 278:128-130.
- [11] Michaels Mark Leo, H. Miller Jeffrey (1992). The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-Hydroxyguanine (7,8-Dihydro-8-Oxoguanine). *J. Bacteriol.* 174 (20): 6321-6325.
- [12] Miller, J.H., (1972). *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.
- [13] AL Lu, X Li, Y Gu, PM Wright & DY Chang. (2001). Repair of Oxidative DNA Damage: Mechanisms and Functions. *Cell Biochem Biophys*. 35(2): 141-170.
- [14] Castellanos Juárez FX., Álvarez-Álvarez C., Yasbin RE., Setlow B., Setlow P., Pedraza Reyes M. (2006). YtkD and MutT protect vegetative cells but not spores of *Bacillus subtilis* from oxidative stress *J. Bacteriol.* 188: 2285-2289.
- [15] Gómez-Marroquín M., Vidales Luz E., Debora Bernardo N., Santos Escobar Fernando, Obregón Herrera A., Robleto Eduardo A., Pedraza Reyes M. (2015). Role of *Bacillus subtilis* DNA glycosylase MutM in counteracting oxidatively stress *J. Bacteriol.* 11: 1963-71.
- [16] Vidales-Rodríguez, L.E. (2010). Contribución del sistema GO (Guanina Oxidada) en el proceso de mutagénesis en fase estacionaria de *B. subtilis*. Tesis Doctoral. División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología. Guanajuato: Universidad de Guanajuato.
- [17] 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 División de Ciencias Naturales y Exactas, Departamento de Biología. Guanajuato: Universidad de Guanajuato.
- [18] Santos-Escobar, F., Gutiérrez-Corona, J. F., & Pedraza-Reyes, M. (2014). Role of *Bacillus subtilis* error prevention oxidized guanine system in counteracting hexavalent chromium-promoted oxidative DNA damage. *App Envi Microbiol*, 80(17), 5493-5502.
- [19] 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.