

Diseño molecular de una mutante deficiente en el gen *codY* de *Bacillus subtilis*

Molecular design of a mutant deficient in the *codY* gene of *Bacillus subtilis*

Ivan Jair Patraca López.¹, Andrea Cantador Gámez.¹, Mario Pedraza Reyes.^{1*}

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

(*pedrama@ugto.mx)

Resumen

CodY es un regulador transcripcional global ampliamente conservado en bacterias Gram positivas como *B. subtilis*. Este factor actúa como un sensor metabólico cuya actividad depende de los niveles intracelulares de GTP, modulando la expresión de genes relacionados con la esporulación, el metabolismo alternativo y la respuesta a condiciones nutricionales desfavorables. Durante el estrés, la acumulación de guanosin penta/tetra fosfato [(p)ppGpp] reduce los niveles de GTP, lo que disminuye la actividad represora de CodY y permite una mayor flexibilidad adaptativa. A su vez, el segundo mensajero c-di-AMP regula indirectamente la síntesis de (p)ppGpp a través de su interacción con una de las proteínas que regulan su síntesis, DarB y, en consecuencia, influyen de forma indirecta en la actividad de CodY. Estudios previos han demostrado que los niveles de c-di-AMP impactan la mutagénesis adaptativa de *B. subtilis*. Dado que el c-di-AMP afecta la actividad del regulador transcripcional CodY a través del bucle de señalización que comparte con el (p)ppGpp, el presente estudio tiene como objetivo generar una mutante deficiente en el gen *codY* para entender el papel que juega este represor en la generación de mutaciones que ocurren en células de *B. subtilis* sujetas a estrés nutricional y carentes de división,

Palabras clave: *Bacillus subtilis*, CodY, mutagénesis adaptativa

Introducción

B. subtilis es una bacteria Gram-positiva que frente a variaciones nutricionales activa una serie de mecanismos de adaptación cuya regulación está, en su mayoría, bajo el control de CodY un regulador transcripcional que modula la expresión de numerosos genes implicados en el metabolismo secundario, la esporulación y la respuesta a condiciones nutricionales desfavorables actuando como un represor (Delabroux y Swanson, 2012; Abundiz-Yáñez y col., 2023; Pedraza-Reyes y col., 2024). La actividad represora de CodY se ve estimulada mediante su interacción con el efector guanosín trifosfato (GTP); cuando este abunda, CodY permanece activo y reprime la expresión de genes asociados con rutas de supervivencia o diferenciación celular. Por el contrario, cuando hay escasez de nutrientes su actividad disminuye y permite la expresión de dichos genes facilitando así la adaptación celular (Handke y col., 2008; Delabroux y Swanson, 2012; Anderson y col., 2021).

La actividad represora de CodY depende del estado energético de las células, pero, además, este se encuentra sujeto a regulación por segundos mensajeros, i.e., moléculas intracelulares pequeñas que funcionan como intermediarios en la transducción de señales que permiten a las bacterias responder rápidamente a los cambios que ocurren en su entorno (Hengge y col., 2023; Hengge, 2023).

Las alarmonas guanosin tetrafosfato y pentafofosfato ((p)ppGpp) son segundos mensajeros cuya síntesis es catalizada por la enzima RelA bajo condiciones de inanición, por lo tanto, un incremento en los niveles de estos mensajeros comunica a las bacterias la escasez de nutrientes (Krüger, 2021; Hengge & col., 2023; Hengge, 2023). En *B. subtilis*, el (p)ppGpp regula respuestas genéticas específicas que alteran la homeostasis celular, y, la síntesis de estos mensajeros ocurre a expensas de una disminución en los niveles de GTP y trifosfato de adenosina (ATP) (Delabroux y Swanson, 2012; Anderson y col., 2021; Hengge & col., 2023; Hengge, 2023). La disminución en los niveles intracelulares de GTP afecta en consecuencia a factores reguladores que dependen de este nucleótido como CodY (Delabroux y Swanson, 2012; Krüger, 2021; Hengge, 2023). Por lo tanto, el aumento de (p)ppGpp durante el estrés limita la disponibilidad de GTP, reduciendo la actividad represora de CodY (Delabroux y Swanson, 2012).

Por otro lado, el (p)ppGpp comparte un bucle de señalización cruzado con el segundo mensajero c-di-AMP. En *B. subtilis*, uno de sus efectores es la proteína DarB, que en su forma libre (sin c-di-AMP) se une a RelA, incrementando la síntesis de (p)ppGpp (Krüger, 2021). Sin embargo, el complejo c-diAMP-DarB impide su interacción con RelA afectando la síntesis de la alarma y, en consecuencia, influyendo en la actividad del regulador CodY (Delabroux y Swanson, 2012; Krüger, 2021).

Estudios recientes, utilizando la cepa *B. subtilis* YB955, auxótrofa a los aminoácidos *histidina*, *metionina* y *leucina* al portar mutaciones en los genes *hisC952*, *metB25* y *leuC427* (Sung y Yasbin, 2002), mostraron que, en fase estacionaria, el c-di-AMP activa procesos mutagénicos que promueven diversidad genética en esta bacteria (Abundiz-Yáñez y col., 2023). Dado que los segundos mensajeros (p)ppGpp y c-di-AMP son moléculas intracelulares que impactan indirectamente en la actividad de CodY, este estudio tiene como objetivo inactivar a *codY* para determinar el papel que juega este regulador transcripcional en los procesos mutagénicos activados en células de *B. subtilis* estresadas nutricionalmente y bajo condiciones limitantes del crecimiento.

Materiales y métodos

Tabla 1: Cepas bacterianas utilizadas en este estudio

Cepa	Fenotipo, genotipo y descripción	Referencia
<i>B. subtilis</i>		
PERM 2023	<i>Bacillus subtilis</i> YB955 <i>hisC952 metB5 leuC427 xin-1 SP6^{SENS}</i>	Sung & Yasbin, 2002
PERM 2102	<i>Bacillus subtilis</i> YB955 <i>codY::Eri^R</i>	Este estudio
<i>E. coli</i>		
DH5α	<i>F⁻ Φ80d lacZ ΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 delR recA endA1 hsdR17 (rk-mk⁺) supE44 thi-1 gyrA96</i>	Stock de laboratorio
XL10 GOLD	<i>Tet^RΔ(mcrA)183Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac The [F⁺ proAB lacI^qZDM15 Tn10 (Tet^R)Tn5 Amy]</i>	Stratagene®
PERM 2100	<i>E. coli</i> DH5α contenido el plásmido pJET1.2/Blunt más un fragmento interno de ~279 pb del gen <i>codY</i> con sitios de restricción EcoR1 y BamH1 (Amp ^R)	Este estudio
PERM 2101	<i>E. coli</i> XL10Gold contenido el plásmido pMUTIN4 más fragmento interno de ~279 pb del gen <i>codY</i> con sitios de restricción EcoR1 y BamH1 (Amp ^R Km ^R)	Este estudio
Plásmidos		
pJET1.2/blunt	Vector de clonación con resistencia a Amp ^R	Thermo Fisher Scientific
pMUTIN4	Vector de fusión <i>lacZ</i> de integración con resistencia a Amp y Eri (Amp ^R Eri ^R)	Itaya y col., 1989

Tabla 2. Oligonucleótidos usados en este estudio

Oligonucleótido	Secuencia (5' - 3')	Descripción
Directo #1046	CG- <u>GAATTC</u> -GGAGGATTATTTATCATGGC	Oligonucleótido directo que amplifica ~15 pb río arriba del codón de inicio del gen <i>codY</i> . (la secuencia subrayada denota un sitio de corte para la enzima EcoRI)
Reverso #1047	CG- <u>GGATCC</u> -G TTAGAAGATGTTTCAGGGA	Oligonucleótido reverso para amplificar un fragmento de ~264 pb al inicio del ORF del gen <i>codY</i> . (la secuencia subrayada denota un sitio de corte para la enzima BamHI)
Reverso #183	GCAGCAACGAGACGTCAC	Oligonucleótido reverso interno a <i>lacZ</i> para corroborar mutantes de <i>B. subtilis</i> con el plásmido pMUTIN4, abarca 633 pb.

Medios de cultivo

Para el crecimiento de las cepas bacterianas se utilizó el medio de cultivo Luria-Broth (LB), cuando fue requerido, este medio se suplemento con los siguientes antibióticos; Ampicilina (Amp, 100 µg/ml), Eritromicina (Eri, 1 µg/ml), o Kanamicina (Kan, 50 µg/ml). De igual forma, se adiciono Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, 0.25 mM) cuando fue necesario.

Para llevar a *B. subtilis* a su estado de competencia, se usaron los medios GMI el cual se compone de Sales Spizizen [(NH₄)₂SO₄ al 0.2%, K₂HPO₄ al 1.4%, KH₂PO₄ al 0.6%, Citrato de Sodio Dihidratado al 0.1% y MgSO₄ .7H₂O al 0.02%], glucosa al 0.5%, extracto de levadura al 0.1% y casaminoácidos al 0.02% (p/v); y el medio GMII, compuesto por el medio GMI suplementado con CaCl₂ 0.5 mM y MgCl₂ 2.5 mM (Boylan y col., 1972).

Condiciones de cultivos

Los cultivos en medio liquido se incubaron a 37°C en agitación orbital a 250 rpm durante el tiempo necesario para llegar a una DO_{590nm} de 0.5 y/o identificar los tiempos T₀ y T₉₀, utilizando un espectrofotómetro Biochrom (Cambridge, UK). Los pre-inóculos se dejaron crecer durante 12 h a 37°C en agitación a 250 rpm. Los medios solidos se incubaron a 37°C durante 12 h.

Construcción de plásmidos y obtención de cepas bacterianas

Se utilizó ADN genómico de la cepa de *B. subtilis* YB955 como molde para la amplificación de un fragmento del extremo 5' de *codY* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en gradiente utilizando Vent® ADN polimerasa (New England, Biolabs, USA) y los oligonucleótidos 1046 y 1047 (Tabla 2); las reacciones de amplificación se efectuaron en un equipo Mastercycler EPgradient Eppendorf (Hamburg, Germany) a diferentes temperaturas para determinar experimentalmente las condiciones óptimas de alineamiento de los oligonucleótidos. Esto resultó en la obtención de un fragmento de ADN esperado de ~279 pb; determinada la temperatura ideal de alineamiento, se realizó una reacción de PCR con un volumen mayor (50 µl) y el fragmento de *codY* de interés, separado en un gel de agarosa, se purificó mediante el Kit DNA Clean & Concentrator®-5 (Zymo Research, USA).

El producto de PCR de *codY* se ligó en el vector pJET1.2/Blunt. El producto de ligación se utilizó para transformar células competentes de *Escherichia coli* DH5α. Las colonias transformantes se seleccionaron en medio LB suplementado con Amp; se eligieron algunas colonias y posteriormente se les extrajo ADN plasmídico utilizando el kit Gen Elute™ Plasmid Miniprep (Sigma-Aldrich, USA). Para corroborar la correcta ligación del fragmento de interés de *codY*, el ADN plasmídico purificado se sujetó a un ensayo de restricción con las enzimas EcoRI-HF y BamHI-HF (New England Biolabs, USA). Identificada la construcción correcta, a continuación, esta se utilizó para preparar una reacción de restricción con un volumen mayor (200 µl); los productos se separaron en un gel de agarosa de bajo punto de fusión al 1.5% (p/v), y el fragmento de *codY*, se cortó y purifico utilizando el kit GenCatch™ Gel Extraction Kit (Epoch Biolabs, USA).

El fragmento de *codY* se ligó en los sitios EcoRI/BamHI del vector integrativo pMUTIN4. El producto de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* XL10 GOLD. Las colonias transformantes fueron seleccionadas en placas de LB suplementadas con Amp y Kan. Posteriormente, se extrajo ADN plasmídico de algunas transformantes. El ADN plasmídico purificado se sujetó a restricción con las enzimas EcoRI-HF y BamHI-HF (New England Biolabs, USA), para corroborar la correcta integración del fragmento de *codY* de interés en el vector pMUTIN4.

Para la obtención de la cepa mutante $\Delta codY$, se prepararon células competentes de la cepa *B. subtilis* YB955 y estas se transformaron con el plásmido pPERM2101 (pMUTIN4-*codY*). Las transformantes obtenidas se seleccionaron en medio LB suplementado con Eri e IPTG y se corroboraron molecularmente mediante PCR utilizando los oligonucleótidos 1046 y 183 (Tabla 2).

Las reacciones de restricción se efectuaron a 37°C durante 15 minutos, mientras que las reacciones de ligación se llevaron a cabo por 1 h a 22°C. Los productos de las reacciones de PCR, así como de reacciones de restricción, se analizaron en geles de agarosa al 1% (p/v) conteniendo bromuro de etidio al 0.1% (p/v). Todas las cepas generadas en este estudio de almacenaron a ~80°C en glicerol al 50%.

Resultados

Amplificación de un fragmento de *codY* de *B. subtilis* YB955 mediante PCR

Utilizando como molde ADN genómico de la cepa *B. subtilis* YB955 se realizó una PCR en gradiente para determinar la temperatura óptima de alineamiento para la amplificación del fragmento 5' de *codY* con los oligonucleótidos 1046 y 1047 (Tabla 2). Los cuales amplifican ~15 pb río arriba del codón de inicio y ~264 pb del ORF del gen *codY*, respectivamente, generando un producto de amplificación de 279 pb. Se probaron cuatro temperaturas de alineamiento, i.e., 51.0°C, 55.3°C, 59.8°C y 62.0 °C, obteniéndose en todos los casos, únicamente el producto esperado (Fig. 1B). Con el objetivo de obtener cantidades suficientes para purificar el fragmento de 279 pb de *codY*, a continuación, se escaló la reacción de PCR utilizando 55.3°C como temperatura ideal de amplificación (Fig. 1C).

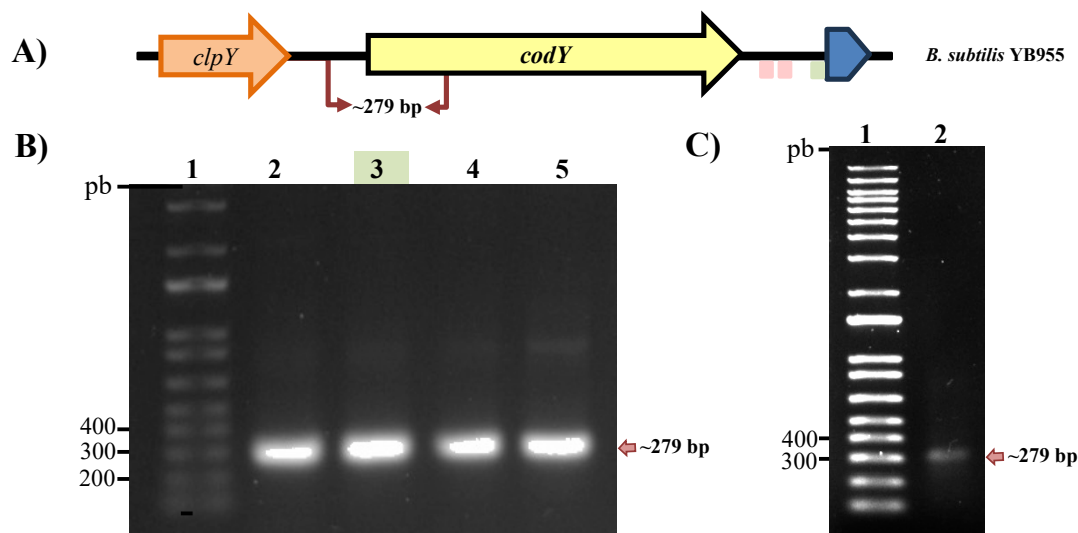


Figura 1. Estrategia para la obtención de un fragmento de *codY* de *B. subtilis* YB955 por PCR. A) Esquema donde se muestra con flechas el fragmento de 279 pb que comprende parte del gen *codY* y un fragmento río arriba de este. B) Productos de amplificación de PCR en gradiente. Carril 1, marcadores de tamaño molecular de ADN de 1 Kb. Carril 2-5, producto de amplificación esperado de ~279 pb; Carril 2, $T_a=51.0^\circ\text{C}$, Carril 3 $T_a=55.3^\circ\text{C}$, Carril 4 $T_a=59.8^\circ\text{C}$ y Carril 5 $T_a=62.0^\circ\text{C}$. C) El producto de amplificación purificado de una reacción de PCR realizada en un volumen de 50 μl . Carril 1, marcadores de tamaño molecular de ADN de 1 Kb. Carril 2, producto de amplificación esperado ~279, $T_a=55.3^\circ\text{C}$. Se utilizó Vent ADN polimerasa en todas las reacciones.

Clonación de un fragmento del gen *codY* de *B. subtilis* YB955 en el vector pJET 1.2/Blunt

Una vez purificado el fragmento del gen *codY* de 279 pb (Fig. 1C), este se ligó en el vector pJET 1.2/blunt utilizando la estrategia mostrada en la Figura 2A. El producto de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α , las transformantes se seleccionaron en placas de medio LB suplementadas con ampicilina y, de estas, se seleccionaron tres colonias transformantes para la extracción de ADN plasmídico, los cuales, fueron sujetas a ensayos de

restricción utilizando las enzimas EcoRI-HF y BamHI-HF. La Figura 2B (carril 2) muestra la obtención positiva del vector pJET 1.2/blunt conteniendo el fragmento del gen *codY* en una de las clonas analizadas. La construcción obtenida se denominó pPERM2100.

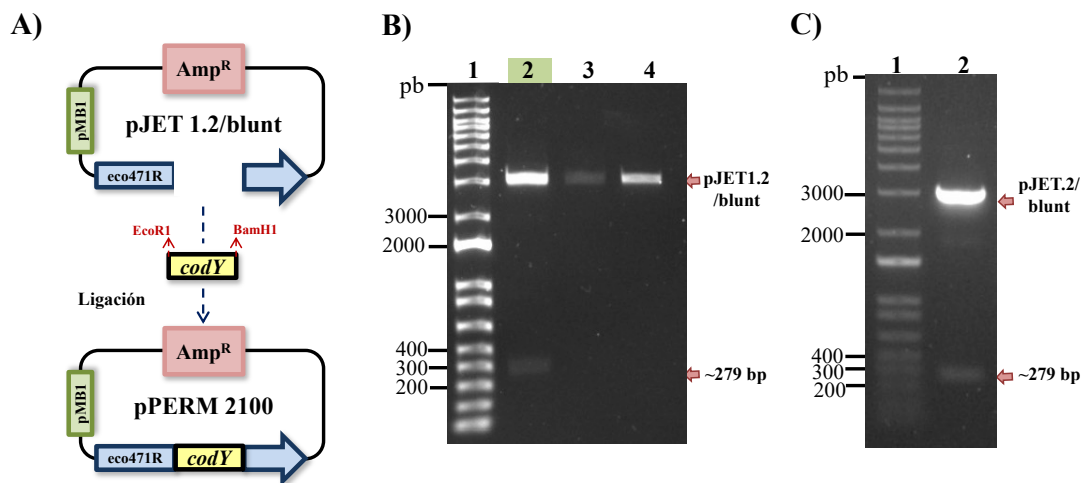


Figura 2. Estrategia de construcción y corroboración enzimática de la construcción pPERM 2100. A) Esquema donde se muestra la estrategia para obtener la construcción pPERM2100. B) Productos de un ensayo de restricción para el estudio de ADN plasmídico de tres clonas *E. coli* DH5α transformadas con el producto de ligación de pJET1.2/blunt + *codY*. Carril 1, marcadores de tamaño molecular de ADN de 1 Kb. Carril 2-4 productos de restricción de tres plásmidos analizados, siendo positiva solo una de las tres clonas analizadas (Carril 2). C) Producto de restricción purificado de una reacción con un volumen de 200 µl. Carril 1, marcadores de tamaño molecular de ADN de 1 Kb. Carril 2, producto de restricción esperado ~279 pb. En todas las reacciones de restricción se utilizaron las enzimas EcoRI-HF y BamHI-HF.

Clonación de un fragmento del gen *codY* de *B. subtilis* en el vector pMUTIN4

El fragmento purificado del gen *codY* (279 pb) se ligó en el vector pMUTIN4 utilizando la estrategia mostrada en la Figura 3A. El producto de ligación se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* XL10GOLD, las transformantes se seleccionaron en placas de medio LB suplementadas con kanamicina y ampicilina y, de estas, se seleccionaron tres transformantes, se purificó el plásmido que estas portaban y este se sujetó a restricción con las enzimas EcoRI-HF y BamHI-HF como se describió en Materiales y métodos. La Figura 3B muestra la obtención positiva del vector pMUTIN4 conteniendo el fragmento del gen *codY*. La construcción obtenida se denominó pPERM2101.

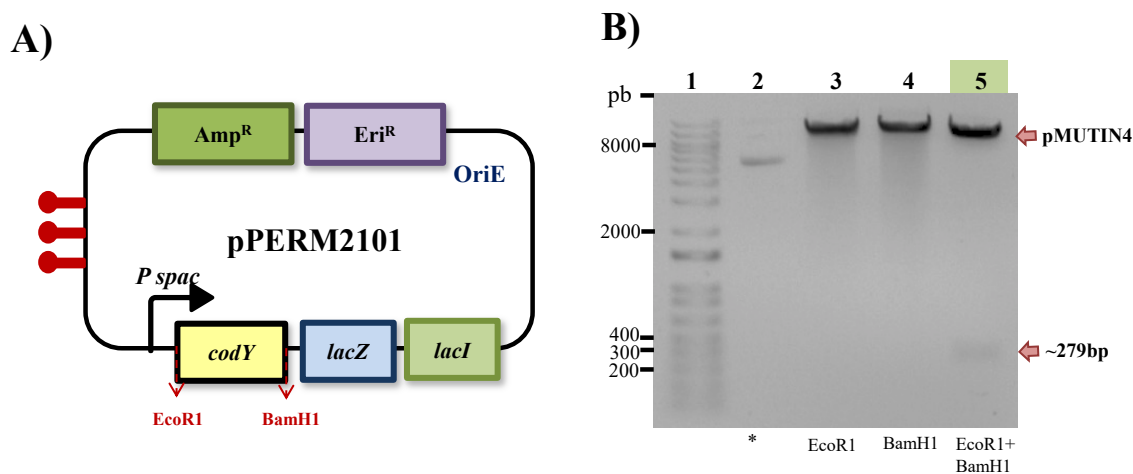


Figura3. Estrategia de construcción y corroboración de la construcción pPERM2101. A) Esquema donde se muestra la estrategia para obtener la construcción pPERM2101. B) Productos de ensayo de restricción del ADN plasmídico obtenido una colonia de *E. coli* XL10GOLD transformada con el producto de ligación de pMUTIN4 + *codY*. Carril 1, marcadores de tamaño molecular de ADN de 1 Kb. Carril 2, ADN plasmídico integro. Carril 3 y 4, DNA plasmídico sujeto a restricción con EcoRI o BamHI, respectivamente. Carril 5, producto de restricción del plásmido pPERM2101 con EcoRI/BamHI que muestra la liberación del fragmento de *codY* de 279 pb.

Obtención de una cepa mutante $\Delta codY$ en el fondo genético *B. subtilis* YB955

Para la inactivación genética de *codY* en el fondo genético *B. subtilis* YB955, se prepararon células competentes de esta cepa y se transformaron con el plásmido pPERM2101 (Tabla 1). Se obtuvieron colonias transformantes en placas de medio LB suplementadas con Eri e IPTG. El evento de recombinación homóloga sencillo hipotético, que da lugar a la interrupción del gen *codY* se muestra en la Figura 4.

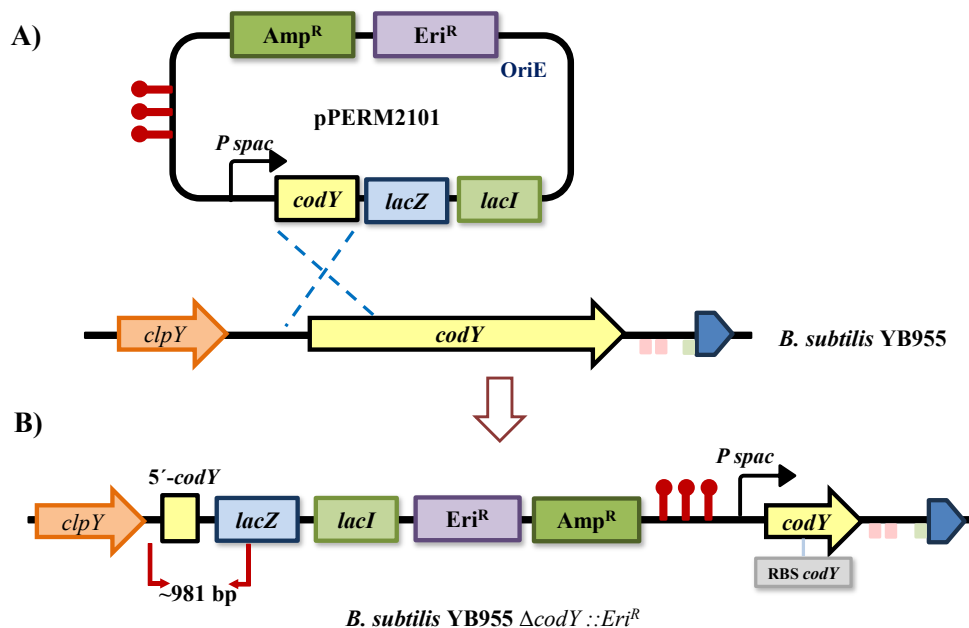


Figura 4. Evento de recombinación homóloga sencilla (A), conducente a la interrupción génica del gen *codY* de *B. subtilis* (B).

La interrupción del gen *codY* se verificará mediante PCR utilizando DNA cromosómico aislado de las transformantes obtenidas, empleando los oligonucleótidos 1046 y 183 (Tabla 2), que alinean desde una región ubicada río arriba del gen *codY* y una región interna del ORF de *lacZ*, respectivamente, como se representa en la Figura 4B.

Conclusiones

- 1) Se generó una cepa transformante de *E. coli* que porta el plásmido integrativo pPERM2101.
- 2) Se obtuvieron colonias de *B. subtilis* YB955 transformadas con el plásmido pPERM2101, las cuales adquirieron resistencia a Eri y presuntamente portan una mutación condicional en el gen *codY*.
- 2) La cepa de *B. subtilis* YB955 deficiente en *codY* se utilizará para estudiar el papel de *codY* en la mutagénesis adaptativa de *B. subtilis*.

Agradecimientos

Trabajo financiado por la Secretaría de Ciencias Humanidades Tecnologías e Innovación (SECIHTI; Subsidio CBF2023-2024-708). Iván J. Patraca López agradece la beca otorgada por la DAIP.

Referencias

- Abundiz, K., Leyva, H.C., Robleto, E.A., & Pedraza, M. (2023). Stress-Associated and Growth-Dependent Mutagenesis Are Divergently Regulated by c-di-AMP Levels in *Bacillus subtilis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(1), 455. <https://doi.org/10.3390/ijms24010455>
- Anderson, B. W., Fung, D. K., & Wang, J. D. (2021). Regulatory Themes and Variations by the Stress-Signaling Nucleotide Alarmones (p)ppGpp in Bacteria. *Annual review of genetics*, 55, 115–133. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-021821-025827>
- Boylan R.J., Mendelson N.H., Brooks, D. & Young, F.E. Regulation of the bacterial cell wall: analysis of a mutant of *Bacillus subtilis* defective in biosynthesis of teichoic acid, *J. Bacteriol.*, 1972, vol. 110, pp. 281-290. <https://doi.org/10.1128/jb.110.1.281-290.1972>
- Dalebroux, Z. D., & Swanson, M. S. (2012). ppGpp: magic beyond RNA polymerase. *Nature reviews. Microbiology*, 10(3), 203–212. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2720>
- Handke, L. D., Shivers, R. P., & Sonenshein, A. L. (2008). Interaction of *Bacillus subtilis* CodY with GTP. *Journal of bacteriology*, 190(3), 798–806. <https://doi.org/10.1128/JB.01115-07>
- Hengge R. (2023). The symbolic power of nucleotide second messengers - or how prokaryotes link sensing and responding to their outside world. *microLife*, 4, uqad036. <https://doi.org/10.1093/femsml/uqad036>
- Hengge, R., Pruteanu, M., Stülke, J., Tschowri, N., & Turgay, K. (2023). Recent advances and perspectives in nucleotide second messenger signaling in bacteria. *microLife*, 4, uqad015. <https://doi.org/10.1093/femsml/uqad015>
- Itaya, M., Kondo, K., & Tanaka, T. (1989). A neomycin resistance gene cassette selectable in a single copy state in the *Bacillus subtilis* chromosome. *Nucleic acids research*, 17(11), 4410. <https://doi.org/10.1093/nar/17.11.4410>
- Krüger, L., Herzberg, C., Wicke, D., Bähre, H., Heidemann, J. L., Dickmanns, A., Schmitt, K., Ficner, R., & Stülke, J. (2021). A meet-up of two second messengers: the c-di-AMP receptor DarB controls (p)ppGpp synthesis in *Bacillus subtilis*. *Nature communications*, 12(1), 1210. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21306-0>
- Pedraza, M., Abundiz, K., Rangel, A., Martínez, L. E., Barajas, R. C., Cuéllar, M., Leyva, H. C., Ayala, V. M., Valenzuela, L. I., & Robleto, E. A. (2024). *Bacillus subtilis* stress-associated mutagenesis and developmental DNA repair. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR*, 88(2), e0015823. <https://doi.org/10.1128/mmb.00158-23>
- 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), 5641–5653. <https://doi.org/10.1128/JB.184.20.5641-5653.2002>