

GENERACIÓN DE MUTACIONES ASOCIADAS A LAS FASE ESTACIONARIA EN CÉLULAS DE *BACILLUS SUBTILIS* DEFICIENTES EN EL GEN *mutSB*

Luis Alberto Rodríguez Martínez¹, Mario Pedraza Reyes²

RESUMEN

En células de *B. subtilis* que no se dividen, la carencia del sistema GO indujo la síntesis diferencial de la proteína MutSB, un parálogo de la proteína MutS del sistema de reparación de bases mal apareadas (MMR). Por otra parte, un estudio reciente mostró que el gen *mutSB* se expresa mayoritariamente durante fase estacionaria. Considerando estos antecedentes en el presente trabajo se investigó si *mutSB* participa en la generación de mutaciones asociadas a la fase estacionaria y su relación con el sistema MMR. Para ello, se construyó una cepa deficiente en el gen *mutSB* y una doble mutante $\Delta mutSL mutSB$ de *B. subtilis*. Los estudios con estas cepas sugieren que *mutSB* participa en la mutación asociada a fase estacionaria solamente cuando falla el sistema MMR.

Palabras Clave

Reparación de ADN, Mutagénesis asociada al estrés, Supervivencia, Evolución

INTRODUCCIÓN

En el genoma de *B. subtilis* se identificó el gen *mutSB* (*yshD*), un parálogo de *mutS* cuyo producto pertenece a la familia de proteínas¹ MutS2 (**Eisen y col., 1997; Eisen, 1998**). Se demostró que MutSB no participa en la corrección de bases mal apareadas en fase de crecimiento, y que además, no interactúa funcionalmente con las proteínas del sistema MMR, MutS o MutL en *B. subtilis* (**Rossolillo y Albertini, 2000**).

Referente a las funciones de MutSB en otros organismos, se sabe que tanto en *Helicobacter pylori* como en *Thermus thermophilus* esta proteína participa en la supresión de la recombinación homóloga así como en la reparación de lesiones genéticas inducidas por estrés oxidativo (**Wang y col., 2005 y Fukui y col., 2011**). Particularmente en *B. subtilis* se encontró que la expresión de *mutSB* ocurre principalmente en fase estacionaria (**Rossolillo y Albertini, 2000**). Un análisis de la síntesis global de proteínas en la fase estacionaria de una mutante deficiente en el sistema de reparación de la guanina oxidada (GO) mostró un incremento en la producción de MutSB. En *B. subtilis*, el sistema GO juega un papel crucial en prevenir y/o

eliminar los daños que genera el estrés oxidativo en el material genético de esta bacteria, estos descubrimientos sugieren la posible participación de *mutSB* en mecanismos asociados a la mutación adaptativa o de fase estacionaria. En el presente trabajo se investigó la contribución de *mutSB* en la producción de mutaciones asociadas a la fase estacionaria, así como la posible interrelación de este con el sistema MMR en la modulación de este proceso biológico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y medios de cultivo. Las cepas de *B. subtilis* y *E. coli*, así como los plásmidos que se utilizaron en este trabajo se listan en la **Tabla 1**. Para el crecimiento se utilizó medio LB (Luria-Bertani) y A3 (Medio Antibiótico 3 DIFCO™. Cuando se requirió los medios fueron suplementados con ampicilina a 100 µg/ml, neomicina a 10 µg/ml y eritromicina a 5 µg/ml.

Tabla 1. Cepas y plásmido utilizados

Cepa o plásmido	Genotipo	Fuente y/o referencia
<i>E. coli</i> DH5α	F ⁻ Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA endA1 hsdR17 supE44 thi-1 gyrA96</i>	Colección de cepas del laboratorio de M. Pedraza-Reyes
<i>B. subtilis</i>		
YB955	<i>B. subtilis</i> <i>hisC952 metB5 leuC427</i>	Colección de cepas del laboratorio de M. Pedraza-Reyes
PERM1227	YB955 Δ <i>mutSB</i> :: <i>LacZ</i> Er ^r .	Este estudio
PERM1239	YB955 Δ <i>mutSB</i> :: <i>Erm</i> ^r Δ <i>mutSL</i> :: <i>Neo</i>	Este estudio
PERMYB151	YB955 Δ <i>mutSL</i> :: <i>Neo</i>	Colección de cepas del laboratorio de M. Pedraza-Reyes
Plásmidos		
pPERM1211	pJET 2.1/Blunt (2.97 kb) conteniendo un fragmento de 427 pb de la región 5' del ORF del gen <i>mutSB</i> (nucleótidos, 961-1355) con sitios de restricción EcoRI y BamHI; Amp ^r	Este estudio
pPERM1217	pMutin4 conteniendo un fragmento EcoRI/BamHI de 427 pb proveniente de pPERM1211; Er ^r	Este estudio

Técnicas de genética y biología molecular. La preparación de células competentes de *E. coli* y *B. subtilis*, y su transformación con ADN plasmídico se efectuaron de acuerdo a los métodos descritos por Boylan y col (1972) y Sambrook y Russel (2001), respectivamente.

Ensayos de mutación adaptativa. El procedimiento para efectuar estos análisis fue previamente descrito (Sung y Yasbin, 2002; Pedraza-Reyes y Yasbin, 2004; Vidales y col., 2009; Débora-Duarte y col., 2011; Sung y col., 2002; Ross y col., 2006; Pybus y col., 2010). Los experimentos se repitieron al menos 3 veces; cada experimento se realizó por sextuplicado.

RESULTADOS

Obtención de cepas de *B. subtilis* deficientes en los genes *mutSB* y/o *mutSL*.

Con el objetivo de determinar si el gen *mutSB* participa en la generación de mutaciones adaptativas en *B. subtilis*, se generó una construcción para interrumpir dicho gen. Para tal fin, se amplificó por PCR un fragmento de 427 pb del marco de lectura abierta del gen *mutSB*, a partir de ADN cromosómico de la cepa *B. subtilis* 168 (WT). El fragmento de *mutSB* se clonó en el vector

integrativo pMUTIN4 (Vagner y col., 1998. La construcción obtenida, se corroboró mediante análisis de restricción y se denominó pPERM1217 (Fig. 1).

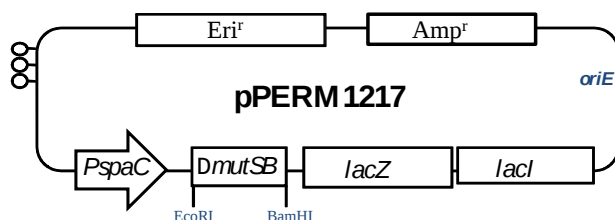


Figura 1. Diagrama del plásmido pPERM1217. Un fragmento interno del marco de lectura abierto de *mutSB* se clonó en los sitios EcoRI y BamHI del vector integrativo pMUTIN4 y se amplificó en células de *E. coli*. El plásmido resultante contiene el fragmento *mutSB* fusionado al gen reportero *lacZ*, además posee un gen de resistencia a eritromicina para su selección en *B. subtilis*.

El plásmido pPERM1217 se utilizó para transformar células competentes de la cepa parental YB955 (*his*, *met*, *leu*) y PERMYB151 (*mutSL*) generando cepas de *B. subtilis* con fondo genético YB955, deficientes en MutSB y MutSB MutSL, respectivamente; dichas cepas fueron caracterizadas molecularmente, y denominadas, *B. subtilis* PERM1227 y 1239, respectivamente.

Efecto de la pérdida de los genes *mutSB* y/o *mutSL* en la producción de mutaciones asociadas a la fase estacionaria de *B. subtilis*.

El sistema de reparación de bases erróneamente apareadas (MutSL) juega un papel crucial en la generación de mutaciones asociadas a la fase estacionaria ya que su inactivación genética propició un incremento significativo en el número de revertantes His⁺, Met⁺ y Leu⁺ en la cepa YB955 (Pedraza-Reyes y Yasbin, 2004). Sin embargo, la sobreexpresión del operón *mutSL* no suprimió completamente la producción de mutantes durante fase estacionaria en *B. subtilis* (Pedraza-Reyes y Yasbin, 2004) sugiriendo que existen factores y/o mecanismos celulares adicionales que promueven la formación de mutantes adaptativas en *B. subtilis*. Uno de los factores que podría favorecer la generación de mutaciones asociadas a fase estacionaria es el gen *mutSB*, ya que un estudio previo reveló que la síntesis de la proteína codificada por este, i.e., MutSB, incrementó en fase estacionaria en un mutante deficiente del sistema GO. Para corroborar esta hipótesis se determinó la frecuencia de producción de colonias revertantes con fenotipos His⁺, Met⁺ o Leu⁺ en las cepas *B. subtilis*, YB955 (parental), Δ *mutSB* (PERM1227), Δ *mutSL* (PERM YB151) y Δ *mutSL mutSB* (PERM1239) en condiciones que restringen el crecimiento. Los resultados de este análisis revelaron que, la falta del gen *mutSB* no produjo un aumento o disminución significativa en la frecuencia de mutación en los tres alelos en referencia a la cepa parental YB955 (Fig. 2). Como se había

demostrado, la carencia de MutSL incrementó la frecuencia de reversión de los tres alelos probados (**Fig. 2**); de manera relevante, se observó que en la doble mutante $\Delta mutSL mutSB$ hubo un incremento significativo en el número de revertantes His^+ , Met^+ y Leu^+ comparada con la cepa $\Delta mutSL$. En el alelo de *his* la reversión en la cepa $\Delta mutSL mutSB$ (PERM 1239) incrementó 100 veces con respecto al número de revertantes producidas por la cepa YB955, Mientras que para la cepa $\Delta mutSL$ (PERM YB151), los valores de reversión mostraron un incremento de aproximadamente 40 veces con respecto a la cepa parental (**Fig. 2**). Para el caso del alelo *met* y *leu* la reversión en la cepa $\Delta mutS mutSB$ (PERM 1239) incrementó entre 6 y 7 veces con respecto al número de revertantes producidas por la cepa YB955; en tanto que para la cepa $\Delta mutSL$ (PERMYB151), dichos valores incrementaron en aproximadamente 4 veces con respecto a la cepa parental (**Fig. 2**).

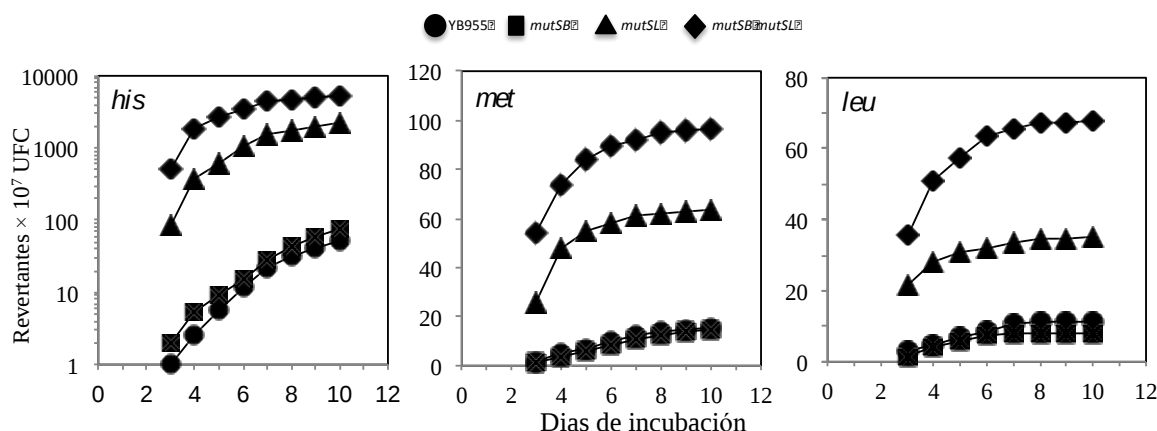


Figura 2. Frecuencias de reversión en fase estacionaria para los alelos *his*, *met* y *leu* de las cepas YB955, $\Delta mutSB$, $\Delta mutSL$ y $\Delta mutSL mutSB$ de *B. subtilis*.

Las cepas se crecieron en medio A3 a 37°C, hasta 90 min después de iniciada la fase estacionaria; se sembraron alícuotas del cultivo en cajas conteniendo medio mínimo carente de His, Met o Leu, respectivamente. Los resultados mostrados en cada grafica son representativos de tres experimentos independientes efectuados por sextuplicado $\pm$ DS.

En resumen, los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que cuando el sistema MMR se encuentra inactivo o saturado por la acumulación de bases mal apareadas, la proteína MutSB participa en prevenir las mutaciones que se generan en células de *B. subtilis* carentes de división celular. En estudios futuros será necesario investigar el tipo de lesiones sobre las que MutSB opera y que contribuyen en generar mutaciones adaptativas en esta bacteria.

CONCLUSIONES

En ausencia de un sistema MMR funcional MutSB juega un papel relevante en modular la producción de mutaciones en células de *B. subtilis* carentes de división celular.

BIBLIOGRAFÍA

- BOYLAN R.J., MENDELSON N.H., BROOKS D. y col., (1972), Regulation of the bacterial cell wall: analysis of a mutant of *Bacillus subtilis* defective in biosynthesis of teichoic, J. Bacteriol. 110: 281-290.
- DÉBORA-DUARTE B., VIDALES L., RAMÍREZ R., RAMÍREZ M., ROBLETO E., YASBIN R., Y PEDRAZA-REYES M. (2011). Mismatch Repair Modulation of MutY Activity Drives *Bacillus subtilis* Stationary-Phase Mutagenesis. Journal of Bacteriology. 193(1):236-245.
- EISEN JA, KAISER D Y MYERS R.M. 1997. Gastrogenomic delight: a movable feast. Nature Medicine 5: 1076-1078.
- EISEN JA. 1998. A phylogenomic study of the MutS family of proteins. Nucleic Acids Res 26: 4291-4300.
- FUKUI K, NAKAGAWA N, KITAMURA Y, NISHIDA Y, MASUI R y col. 2008. Crystal structure of MutS2 endonuclease domain and the mechanism of homologous recombination suppression. J Biol Chem 283: 33417-33427.
- PEDRAZA-REYES, M Y YASBIN RE. 2004. Contribution of the mismatch DNA repair System to the Generation of Stationary-Phase-Induced Mutants of *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 186: 6485-6491.
- PYBUS C., PEDRAZA-REYES M., ROSS C., MARTIN H., ONA K., YASBIN R., Y ROBLETO E. (2010). Transcription-Associated Mutation in *Bacillus subtilis* Cells under Stress. J. Bacteriology. 192(13):3321-3328.
- ROSSOLILLO P Y ALBERTANI AM. 2000. Functional analysis of the *Bacillus subtilis* yshD gene, a mutS paralogue. Mol Gen Genet 264: 809-818
- ROSS C., PYBUS C., PEDRAZA-REYES M., SUNG H., YASBIN R., Y ROBLETO E. (2006). Novel Role of mfd: Effects on Stationary-Phase Mutagenesis in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology. 188(21):7512-7520
- SAMBROOK J. Y RUSSEL D.W. (2001), *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N. Y.
- SUNG H-M Y YASBIN RE. 2002. Adaptive, or stationary-phase, mutagenesis, a component of bacterial differentiation in *Bacillus subtilis*. J.Bacteriol. 184: 5641-5653.
- VIDALES L., CÁRDENAS L., ROBLETO E., YASBIN R. Y PEDRAZA-REYES M. (2009). Defects in error prevention GO system potentiate stationary-phase-mutagenesis in *Bacillus subtilis*. Journal of Bacteriology. 191:506-513.
- WANG G, ALAMURI P, HUMAYUN MZ, TAYLOR DE, MAIER RJ. 2005. The *Helicobacter pylori* MutS protein confers protection from oxidative DNA damage. Mol Microbiol 58: 166-176.

Agradecimientos

El presente trabajo fue apoyado por el CONACyT (subsídios, 205744 y 221231) y la Universidad de Guanajuato (subsidio, DAIP-324-2013). Luis A. Rodríguez agradece la beca otorgada por la Universidad de Guanajuato para realizar este proyecto de investigación. Los autores agradecen a Martha Gómez Marroquín por el valioso apoyo técnico y co-asesoría durante la realización de este proyecto.