

PAPEL DE MFD EN LA REPARACIÓN POR ESCIACIÓN DE BASES DURANTE LA ESPORULACIÓN DE *BACILLUS SUBTILIS*

Guerrero-Zavala Alejandro (1), Pedraza-Reyes Mario (2)

1 Lic. Químico Farmacéutico Biólogo, Universidad de Guanajuato | agz_ag@hotmail.com

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

Resumen

En células carentes de división, la proteína Mfd de *B. subtilis* ha sido involucrada en la mutagénesis asociada a la transcripción; así como en la reparación de ADN acoplada a la transcripción (TCR) en células esporulantes de este microorganismo. Un reporte reciente reveló que una mutante de *B. subtilis* deficiente en Mfd presentó defectos en la esporulación incluso en ausencia de agentes externos dañinos para el ADN, sugiriendo que las lesiones espontáneas de ADN, generadas en el esporangio, pueden activar la vía dependiente de TCR. Las bases oxidadas, sitiosapurínicos/apirimidínicos (AP) así como las roturas de cadena dobles y sencillas pueden ser generadas espontáneamente como producto del ataque del ADN por especies reactivas de oxígeno (ROS); dichas lesiones son procesadas por el sistema GO (MutM, MutY y MutT) así como por las AP endonucleasas Nfo, ExoA y Nth (Sistema BER). Un estudio reciente mostró que la carencia de Mfd afectó la eficiencia de esporulación de *B. subtilis* sugiriendo que las lesiones espontáneas, promovidas por ROS que interfieren con la transcripción son procesadas con la participación de esta proteína y las AP endonucleasas Nfo, ExoA y Nth. Para investigar esta hipótesis, esporangios de *B. subtilis* carentes de Mfd y las proteínas del sistema BER fueron tratadas con una DL₅₀ de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) que es un agente promotor de ROS; después de una hora de tratamiento, se calculó el porcentaje de supervivencia para cada una de las cepas tratadas y no tratadas. Se encontró que los esporangios deficientes en Nfo, ExoA y Nth así como Nfo, ExoA, Nth y Mfd fueron más susceptibles al tratamiento con H₂O₂ que las células esporulantes de la cepa silvestre. En conjunto, nuestros resultados sugieren que en células esporulantes de *B. subtilis* que no replican su genoma, Mfd y el sistema BER coordinan la eliminación de las lesiones promovidas por ROS y que comprometen el programa transcripcional que regula la esporulación.

Abstract

In non-growing vegetative cells of *B. subtilis* the Mfd protein has been involved in transcription-associated-mutagenesis as well as in transcriptional-coupling of DNA repair in sporulating cells of this microorganism. A recent report revealed that a Mfd-deficient mutant of *B. subtilis* presented defects in sporulation even in the absence of external DNA damage suggesting that spontaneous DNA lesions, generated in sporangia, may activate the TCR-dependent pathway. Oxidized bases, apurinic/apyrimidinic (AP) sites and single and double strand breaks are side products resulting from attack of DNA by radical oxygen species (ROS). These lesions are processed with aid of the GO system (MutM, MutY and MutT) as well as by the AP endonucleases Nfo ExoA and Nth. We report here that *B. subtilis* sporangia deficient for Mfd increased its Spo- phenotype following genetic inactivation of the Nfo, ExoA, Nth-encoding genes, strongly suggesting that spontaneous ROS-promoted lesions that interfere with transcription are eliminated by Mfd and Base Excision Repair (BER). To further investigate this notion, *B. subtilis* sporangia lacking Mfd and the BER proteins (Nfo ExoA Nth) were treated with a LD₅₀ of the ROS-promoter agent hydrogen peroxide (H₂O₂) and the survival fraction of sporangia from each strain were calculated after 1 h. Notably, sporangia deficient for Nfo ExoA Nth and Nfo ExoA Nth Mfd were more susceptible to H₂O₂ treatment than sporulating cells of the wild type strain. Altogether, our results suggest that in non-replicating sporulating *B. subtilis* cells Mfd and the BER system concertedly coordinate the elimination of ROS-promoted DNA lesions that compromise the transcriptional program that drives sporulation.

INTRODUCCIÓN

Cuando las condiciones nutricionales y ambientales son poco favorables para su crecimiento vegetativo *Bacillus subtilis* es capaz de emprender un proceso de diferenciación celular que da lugar a la formación de una endospora. Este proceso, que consta de ocho etapas, inicia con un evento de división celular asimétrica que da como resultado la formación de dos compartimentos, la célula madre y la pre espora, cada uno conteniendo una copia cromosomal idéntica [1]. La esporulación en *B. subtilis* es regulada en gran medida por una cascada de factores sigma (σ) que se unen a la RNA polimerasa, permitiendo así la expresión espacial y temporal de genes requeridos para la formación de la espora [2]. Además de los factores sigma, el factor transcripcional Spo0A juega un papel crucial en el proceso de esporulación ya que regula directa o indirectamente, varios cientos de genes que participan en este evento de diferenciación [2][3]. Las esporas de *B. subtilis* son resistentes a un gran número de condiciones ambientales extremas, incluyendo el calor, la abrasión, la desecación extrema, la exposición a agentes químicos, la exposición al ataque de otros organismos, a enzimas degradativas y a la prolongada exposición a la radiación solar [1][4][5][6]. Además, las esporas poseen la habilidad de permanecer en latencia por largos periodos de tiempo y germinar cuando perciben condiciones de crecimiento favorables [2][4]. Se han identificado varios factores importantes en la resistencia de las esporas de *B. subtilis*, incluyendo las condiciones de esporulación, particularmente la temperatura, las cubiertas de la espora, la relativa impermeabilidad, bajo contenido

de agua y un alto nivel de minerales en el centro de la espora ("core"), saturación del DNA de la espora con las proteínas pequeñas ácido-solubles (SASP) del tipo α/β ; además de los sistemas de reparación que se encuentran durante la germinación de las esporas [4][5][6].

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) formadas en la célula ya sea como producto del metabolismo celular o por agentes externos, tienen la capacidad de reaccionar con lípidos, proteínas y con el ADN. De acuerdo a esto, se ha mostrado que cuando el DNA es atacado por ROS, resulta en la formación de bases oxidadas como 8-oxo-adenina y 8-oxo-guanina (8-oxo-G), entre otras; así mismo este ataque puede generar sitiosapurínicos/apirimidínicos (AP) [7]. Las lesiones no voluminosas o que no distorsionan la cadena incluida la 8-oxo-guanina (8-oxo-G) y el uracilo son procesados por la vía de reparación por escisión de bases (BER), la cual requiere la participación de diferentes DNA glicosilasas y al menos una endonucleasaapurínica/apirimidínica (AP). *B. subtilis* posee un sistema de prevención/reparación dedicado exclusivamente a evitar los efectos mutagénicos de la 8-oxo-G; dicho sistema denominado GO, está conformado por las proteínas MutM, MutY y MutTA [8]. *B. subtilis* además cuenta con tres proteínas diferentes que poseen actividad de AP-endonucleasas, denominadas Nfo, ExoA y Nth para eliminar éstas lesiones genotóxicas [7].

Se ha reportado que la vía de reparación acoplada a la transcripción (Mfd) juega un papel importante en eliminar lesiones espontáneas durante la esporulación [1]. En apoyo de esta observación, se encontró que la sola ausencia de Mfd afectó dicho proceso, sugiriendo que las lesiones espontáneas que ocurren en células esporulantes, como la 8-oxo-G y los sitios AP, podrían afectar la expresión

de genes que son específicamente requeridos para llevar a cabo de manera eficiente la formación de la spora [1]. Utilizando un enfoque genético-molecular, en el presente trabajo se investigó una posible interconexión entre Mfd y la ruta de reparación BER en el procesamiento de lesiones de ADN que tienen el potencial de afectar el proceso de la esporulación en *B. subtilis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

En la Tabla 1 se muestran las cepas de *B. subtilis* utilizadas en este estudio. Todas las cepas fueron construidas en nuestro laboratorio y son derivadas de la cepa silvestre *B. subtilis* 168 (*trp*). Las cepas se crecieron en medio DSM (Difco, específico para inducir la esporulación de *B. subtilis*). La esporulación de las cepas se monitoreo mediante microscopia de contraste de fases.

Tabla 1. Cepas de *B. subtilis* usadas en este estudio.

Cepa	Genotipo
168	Wild type (<i>Trp</i> ⁻)
PERM1309	$\Delta mfd::spc$ (<i>Spc</i>)
PERM1307	$\Delta nfo::neo$ $exoA::tet$ $nth::eri$ (<i>Neo Tet Eri</i>)
PERM1310	$\Delta nfo::neo$ $\Delta exoA::tet$ $\Delta nth::eri$ $\Delta mfd::spc$ (<i>Neo Tet Eri Spc</i>)

Experimentos de eficiencia de esporulación

Las cepas de *B. subtilis* fueron crecidas en medio DSM a 37 °C durante 24 h. Para determinar la eficiencia de esporulación se realizaron diluciones seriadas en PBS y se plaquearon alícuotas del cultivo en medio LB sólido, las unidades formadoras de colonias (ufc) fueron contadas después de 16 horas de incubación.

Experimentos de resistencia a peróxido de hidrógeno

Las cepas de *B. subtilis* fueron crecidas en medio DSM a 37 °C y se monitoreó la densidad óptica a 600 nm hasta encontrar T_0 (tiempo en el cual la pendiente de la fase logarítmica y la fase

estacionaria se interceptan), después de 4.5 h los cultivos fueron divididos en dos, dejando uno como control y otro expuesto a tratamiento con peróxido de hidrógeno (20 mM). Los cultivos fueron incubados durante 1 h más. Para determinar la sobrevivencia al tratamiento se realizaron diluciones seriadas en PBS y se plaquearon alícuotas de ambos cultivos en medio LB sólido, las (ufc) fueron contadas después de 16 h de incubación a 37 °C.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto de la pérdida de las proteínas Nfo, Nth, ExoA sobre la eficiencia de esporulación de una mutante de *B. subtilis* deficiente en Mfd.

Para investigar si Mfd y el sistema BER contribuyen en la reparación del daño genético espontáneo generado durante la esporulación de *B. subtilis*, se indujo la esporulación de las cepas carentes de Mfd y/o el sistema BER y se determinó la eficiencia de esporulación para cada una de ellas en relación con una cepa silvestre. Los resultados de este análisis (Figura 1) muestran que la ausencia de Mfd afectó a la esporulación en un nivel muy similar al observado en la mutante carente de Nfo ExoA Nth; sin embargo, se puede observar que dicho efecto se potencia en la cuadruple mutante (Figura 1). Estos resultados sugieren que Mfd y las AP endonucleasas Nfo ExoA y Nth juegan papeles cruciales en la eliminación de lesiones genéticas que se producen espontáneamente durante el proceso de esporulación de *B. subtilis*.

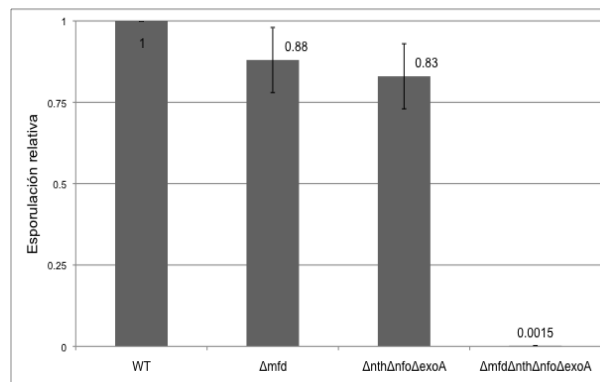


Figura 1 Esporulación relativa de las cepas deficientes en el sistema BER y en Mfd-BER en comparación con la cepa silvestre.

Efecto del peróxido de hidrógeno durante la esporulación de cepas de *B. subtilis* deficientes en Mfd y/o Nfo, ExoA, Nth.

Para investigar si Mfd y el sistema BER contribuyen en la reparación del daño genético causado por el estrés oxidativo durante la formación de esporas, los esporangios de *B. subtilis* carentes de Mfd y/o el sistema BER colectados 4.5 horas después de iniciado el proceso de esporulación, fueron tratados con H₂O₂ (20 mM) durante una hora. Los resultados de este análisis (Figura 2) mostraron que en referencia a la cepa parental silvestre, la carencia de las AP-endonucleasas Nfo, ExoA, Nth incrementó de manera significativa la susceptibilidad de los esporangios de *B. subtilis* al tratamiento con el agente oxidante. Es de resaltar, que la eliminación de las cuatro funciones no aumentó la susceptibilidad a H₂O₂ con respecto a las cepas Δmfd y $\Delta nfo\ exoA\ nth$ (Figura 2). Este resultado sugiere fuertemente que Mfd y las tres AP endonucleasas forman parte una misma vía durante la eliminación de lesiones de ADN promovidas por estrés oxidativo.

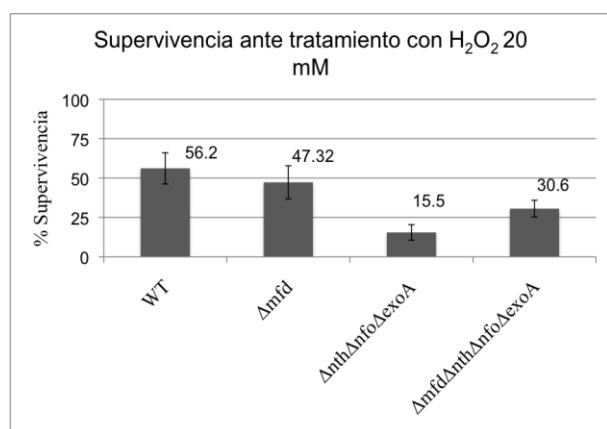


Figura 2 Porcentaje de supervivencia de esporangios de distintas cepas de *B. subtilis*. Las células fueron tratadas con H₂O₂ 20 mM, 4.5 h después de iniciada la esporulación.

CONCLUSIONES

Mfd y las AP-endonucleasas Nfo ExoA y Nth eliminan lesiones genéticas espontáneas o promovidas por el estrés oxidativo con un impacto directo en la supervivencia y morfogenénesis de las esporas de *Bacillus subtilis*.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue apoyado por el CONACyT (Subsidios 205744 and 221231) y la Universidad de Guanajuato (subsidiarios DAIP-324-2013 y 602-2015). A. Guerrero Zavala agradece la beca de licenciatura otorgada por el CONACyT.

REFERENCIAS

- [1] Ramirez, F., Barajas, R., Ayala, V., Robleto, E., Pedraza-Reyes, M. (2013), "Transcriptional coupling of DNA repair in sporulating *Bacillus subtilis* cells", *Molecular Microbiology*, 90: 1088-1099.
- [2] Errington, J. (2003). Regulation of endospore formation in *Bacillus subtilis*. *Nature Reviews in Microbiology*, 1: 117-126.
- [3] Fawcett, P., Eichenberger, P., Losick, R. & Youngman, P. (2000). The transcriptional profile of early to middle sporulation in *Bacillus subtilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 97: 8063-8068.
- [4] Nicholson, W. L., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J. & Setlow, P. (2000). Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments. *Microbiological and Molecular Biology Reviews* 64: 548-572.
- [5] Setlow, P. (2006). Spores of *Bacillus subtilis*: their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. *Journal of Applied Microbiology* 101: 514-25.
- [6] Pedraza-Reyes M, Ramírez-Ramírez N, Vidales-Rodríguez LE, Robleto EA. 2012. Mechanisms of bacterial spores survival, p 73-84. In Abel-Santos E (ed), *Bacterial spores: current research and applications*. Caister Academic Press, Wymondham, United Kingdom.
- [7] Barajas, R., Ramirez, F., Juárez, R., Ayala, V., Robleto, E., Yasbin, R., Pedraza-Reyes, M. (2014), "Error-Prone Processing of Apurinic/Apyrimidinic (AP) Sites by PolX Underlies a Novel Mechanism That Promotes Adaptive Mutagenesis in *Bacillus subtilis*", *Journal of Bacteriology* 196 (16): 3012.
- [8] Vidales, LE., Cárdenas LIC. Robleto, E., Yasbin, RE., and M. Pedraza-Reyes. (2009). "Defects in the Error Prevention Oxidized Guanine System Potentiate Stationary-Phase Mutagenesis in *Bacillus subtilis*". *Journal of Bacteriology* 191: 506-513.